

Thèse de Doctorat

* (instructions page en annexe)

Laure MERAMETDJIAN

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Physiologie, biologie des organismes, populations, interactions*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : *INSERM U791*

Soutenue le *16 décembre 2016*

Thèse N° :

Phosphate et minéralisation dentaire Quel rôle pour les transporteurs de phosphate ?

JURY

Rapporteurs :	Anne POLIARD , Professeur des Universités, Université Paris Descartes Guillaume PENEL , Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Université de Lille
Examineurs :	Maria Cristina MANZANARES CESPEDES , Professeur des Universités, Universitat de Barcelona Agnès BLOCH ZUPAN , Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Université de Strasbourg
Invité(s) :	Jérôme GUICHEUX , Directeur de recherche INSERM, Université de Nantes Fabienne PEREZ , Professeur des Universités Praticien Hospitalier, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	Laurent BECK , Chargé de recherche INSERM, Université de Nantes
Co-encadrante de Thèse :	Céline GAUCHER , Maître de Conférences des Universités Praticien Hospitalier, Université Paris Descartes

Remerciements

Si cette thèse est d'abord l'aboutissement de quatre années de travaux – à temps partiel, elle restera également dans ma mémoire comme le souvenir d'une période riche en rencontres, événements, découvertes, changements. Je souhaite ici faire part en quelques mots de mes sentiments à l'égard des personnes qui m'ont entourée et soutenue au cours de cette période.

Je remercie le directeur du laboratoire Pierre Weiss de m'avoir accueillie dès le Master 2 au sein du Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire.

Je remercie également Laurent, mon directeur de thèse, pour m'avoir soutenue et encadrée tout au long de ces cinq années de Master 2 puis de doctorat. J'ai tout appris de la recherche au sein de ton équipe et je te suis reconnaissante de ta patience à cet égard. En plus de ton encadrement scientifique et technique, je te remercie également d'avoir été un directeur de thèse humain et accessible. L'envie de continuer à faire de la recherche, c'est un peu grâce à toi et j'espère pouvoir donc continuer !

Je remercie Céline, ma co-encadrante de thèse, d'avoir accepté de seconder mon directeur de thèse et d'apporter ton expertise sur les tissus minéralisés dentaires pour ma thèse. Nos réunions Skype ne se sont pas limitées à la science et j'espère que nous aurons l'occasion de retravailler ensemble après cette thèse.

Je tiens à remercier les chercheurs qui me font le grand honneur d'avoir accepté de juger ce travail :

Monsieur Guillaume Penel et Madame Anne Poliard pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ;

Mesdames Maria Cristina Manzanares Cespedes et Agnès Bloch Zupand'avoir accepté d'être examinatrices.

Je tiens également à remercier Jérôme de m'avoir accueillie au sein du groupe STEP, scientifiquement et humainement, et Sarah, pour notre collaboration enrichissante sur les souris *Slc20a2*^{-/-} et pour la qualité de nos échanges scientifiques en général. Je remercie aussi le Professeur Fabienne Pérez et toute l'équipe hospitalo-universitaire de la faculté d'odontologie.

Je remercie chaleureusement le personnel technique du laboratoire sans qui rien de ce qui va suivre n'aurait été possible et en particulier Sophie. Tu n'as pas fait que m'accompagner au cours de mes découvertes histologiques, tu as également été une écoute attentive tout au long de cette thèse, ponctuée de hauts et de bas.

Je remercie tout aussi chaleureusement les étudiants en master, thèse, post doctorants, les ingénieurs et chercheurs du LIOAD qui ont grandement contribué à faire de cette thèse une superbe aventure humaine. Je ne peux pas tous vous citer ici mais sachez que vous êtes dans mon cœur. Le LIOAD est une grande famille et je suis tellement heureuse d'en faire partie.

Les derniers mais pas les moindres, je tenais à remercier ma famille de m'avoir soutenue depuis le début, encouragée, supportée même dans les moments les plus difficiles. Sans vous, rien de ceci n'aurait été possible et je vous le dois. Puisse cette thèse être à la hauteur de tout ce que vous avez fait pour moi sans compter. Papa, Maman, Cécilia, si j'en suis là, c'est aussi grâce à vous ! Un remerciement tout particulier pour toi Maman qui est venue si souvent à Nantes pour me seconder et me permettre de travailler en toute quiétude.

Enfin, je tiens à te remercier, Victor, pour ton amour, pour ta confiance, tes conseils, et pour toi, notre fille, Louise, d'avoir donné un nouveau sens à ma vie.

« Je sais pourquoi tant de gens aiment couper du bois. C'est une activité où l'on voit tout de suite le résultat. » Albert Einstein

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
AVANT PROPOS	11
INTRODUCTION.....	13
1 EMBRYOLOGIE ET HISTOLOGIE DES TISSUS DENTAIRES MURINS	15
1.1 LA MORPHOGENESE DE LA COURONNE DE LA PREMIERE MOLAIRES INFERIEURE	18
1.1.1 Stades initiaux : lame et placode.....	18
1.1.2 Stades de la morphogénèse : le bourgeon dentaire	18
1.1.3 Stades de la morphogénèse : le capuchon (ou cupule).....	19
1.1.4 Stades de la morphogénèse : la cloche.....	20
1.2 HISTOGENESE, DIFFERENCIATION TERMINALE DES ODONTOBLASTES ET DES AMELOBLASTES	21
1.2.1 Odontoblastes et dentinogénèse.....	22
1.2.2 Améloblastes et amélogénèse.....	24
1.3 EDIFICATION RADICULAIRE	27
1.4 CEMENTOGENESE	28
1.4.1 Cément acellulaire.....	28
1.4.2 Cément cellulaire.....	28
1.5 LE SAC FOLLICULAIRE ET L'ERUPTION DENTAIRE.....	29
1.6 LA PULPE.....	29
2 STRUCTURE, COMPOSITION ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES TISSUS DENTAIRES MINERALISES	31
2.1 EMAIL.....	31
2.1.1 Structure de l'émail	31
2.1.2 Composition et caractéristiques physico chimiques de l'émail	33
2.2 DENTINE	34
2.2.1 Structure de la dentine	34
2.2.2 Composition et caractéristiques physico chimiques de la dentine	38
2.3 CEMENT.....	39
2.3.1 Structure du ciment.....	39
2.3.2 Composition et caractéristiques physico chimiques du ciment	41
2.4 OS ALVEOLAIRE	42
2.4.1 Structure de l'os alvéolaire.....	42
2.4.2 Composition et caractéristiques physico-chimiques de l'os alvéolaire	42
3 MECANISMES DE BIOMINERALISATION DES TISSUS DENTAIRES	44
3.1 MECANISMES GENERAUX DE BIOMINERALISATION : CONNAISSANCES ACTUELLES	44
3.1.1 Biominéralisation impliquant les vésicules matricielles	46
3.1.2 Biominéralisation sous l'action de précurseurs phosphocalciques amorphes.....	50
3.1.3 Croissance cristalline impliquant des protéines non collagéniques.....	50
3.2 BIOMINERALISATION DES TISSUS MINERALISES DENTAIRES	52
3.2.1 Biominéralisation de l'émail.....	52
3.2.2 Dentine, ciment et os alvéolaire : des phénomènes de biominéralisation similaires	56
3.2.3 Minéralisation pathologique.....	61
4 TRANSPORTEURS DE PHOSPHATE	63
4.1 GENERALITES SUR LE PHOSPHATE.....	63
4.2 IMPORTEURS DE PHOSPHATE SODIUM-DEPENDANT	65
4.2.1 Importeurs de phosphate sodium dépendants haute affinité basse capacité.....	65
4.2.2 Importeurs de phosphate sodium dépendants basse affinité haute capacité.....	75

4.3	IMPORTEURS DE PHOSPHATE SODIUM INDEPENDANT	75
4.4	EXPORTEUR DE PHOSPHATE, XPR1	75
5	EXPRESSION ET IMPLICATION FONCTIONNELLE DES TRANSPORTEURS DE PHOSPHATE DANS L'ODONTOGENESE.....	77
5.1	SLC17A1/NPT1	77
5.2	SLC34A1/NPT2A	77
5.3	SLC34A2/NPT2B	78
5.4	SLC34A3/NPT2C	79
5.5	SLC20A1/PIT1	79
5.6	SLC20A2/PIT2	81
	OBJECTIFS DE THESE	83
	PARTIE EXPERIMENTALE	85
	MATERIEL ET METHODES.....	86
1	SOURIS.....	86
2	PATIENTS	87
3	TISSUS.....	87
4	CULTURE CELLULAIRE	88
4.1	M2H4.....	88
4.2	ALC	89
5	COLORATION AU ROUGE D'ALIZARINE	90
6	QPCR.....	90
7	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> (HIS).....	91
8	IMMUNOHISTOCHEMIE (SLC34A2).....	92
9	COLORATION X GAL	92
10	HISTOLOGIE	92
11	MICRO COMPUTED TOMOGRAPHY (MICRO CT)	93
12	MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB)	93
13	ENERGY DISPERSIVE X-RAY SPECTROMETRY (EDX).....	93
14	CULTURE ORGANOTYPIQUE DE GERMES DENTAIRE ET INVALIDATION PAR ARNI	94
15	TECHNIQUES D'INVALIDATION DES GENES PAR ARN INTERFERENCE (ARNI) : SIRNA ET PROTOCOLE DE TRANSFECTION JET PRIME	95
16	PROTOCOLE DE PRODUCTION DE PARTICULES LENTIVIRALES ET TRANSDUCTION	95
	RESULTATS	96
1	EXPRESSION DES TRANSPORTEURS DE PHOSPHATE <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> LORS DE L'ODONTOGENESE.....	96
2	IMPLICATION FONCTIONNELLE DES TRANSPORTEURS DE PHOSPHATE DANS LA MINERALISATION DENTAIRE.....	97
2.1	ETUDE PRELIMINAIRE <i>IN VITRO</i> DE L'INVALIDATION DE <i>Slc20a1</i> ET <i>Slc20a2</i> DANS DES MODELES DE LIGNEES CELLULAIRES AMELOBLASTIQUE (ALC) ET ODONTOBLASTIQUE (M2H4) MURINES.....	97
2.2	ETUDE <i>EX VIVO</i> DANS UN MODELE DE CULTURE ORGANOTYPIQUE DE GERMES DENTAIRE MURINS.....	97
2.3	ANALYSE DE L'INVALIDATION DE <i>SLC20A2</i> <i>IN VIVO</i>	100

2.4 SOURIS DMP1 – SLC20A1 ET DMP1-SLC20A2.....	113
DISCUSSION ET CONCLUSION	114
DISCUSSION.....	115
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADRH : Hypophosphatémie Rachitique Autosomale Dominante
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adenosine TriPhosphate
BMP : Bone Morphogenetic Proteins
BSP : Bone Sialo Protein
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP1 : Dentin Matrix Protein 1
DSPP : Dentin SialoPhosphoProtein
DSP : Dentin SialoProtein
DPP : Dentin PhosphoProtein
EDX : Electron Dispersive X Ray
FGF : Fibroblast Growth Factor
HA : HydroxyApatite
HHRH : Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria
HIS : Hybridation *in situ*
IHC : ImmunoHistoChimie
KO : Knock-Out
MEB : Microscopie Electronique à Balayage
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MEM : Minimum Essential Medium Eagle
MET : Microscopie Electronique à Transmission
microCT : micro Computed Tomography
MMP : Matrix MetalloProteinase
Npt : Na Pi transporter
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : PhosphatidylEthanolamine
PFA : PhosphonoFormic Acid
Pi : Phosphate inorganique
PiT : Phosphate inorganic Transporter

PPi : pyrophosphate

PPP1 : Protein Phosphatase 1

PTH : Parathyroid Hormone

ShRNA : Short Hairpin RNA

SIBLING : Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein

SiRNA : Small interfering RNA

SLC : Solute Carrier

TGF : Transforming Growth Factor

TNAP : Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase

VM : Vésicule Matricielle

VSMC : Vascular Smooth Muscle Cells

XLH : X Linked Hypophosphatemia

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Coupe histologique d'une première molaire mandibulaire de souris à 4 jours de développement.

Figure 2. Illustration d'une hémimandibule de souris avec une incisive à croissance continue en vue sagittale.

Figure 3. Illustration schématique des différents stades de l'odontogénèse humaine

Figure 4. Coupes histologiques représentatives des étapes de l'odontogénèse murine.

Figure 5. Coupe histologique de tête d'embryon de souris à 11 jours de développement (E11,5).

Figure 6. Coupe histologique de tête d'embryon de souris à 13 jours de développement (E13,5).

Figure 7. Coupe histologique de tête d'embryon de souris à 14 jours de développement (E14,5).

Figure 8. Schéma du stade cloche tardif

Figure 9. Coupe histologique de tête de souris décalcifiée à 3 jours post nataux (P3).

Figure 10. Cycle de vie d'un améloblaste

Figure 11 : Coupe tissulaire représentant une déposition de ciment sur de la dentine radulaire

Figure 12 : Structure cristalline de l'hydroxyapatite

Figure 13 : Structure de l'émail prismatique par microscopie électronique à balayage

Figure 14. Représentation schématique du cristal d'émail

Figure 15 : Structure de la dentine par microscopie électronique à balayage

Figure 16. Terminologie et distribution des différents types de dentine.

Figure 17 : Structure du ciment fibrillaire au niveau de la jonction émail ciment par microscopie électronique à balayage

Figure 18 : Les différents processus de biominéralisation actuellement établis

Figure 19 : Représentation schématique hypothétique de la régulation de la balance Pi/PPi au sein d'une vésicule matricielle

Figure 20 : Représentation schématique de la nucléation et de la croissance des cristaux d'émail

Figure 21 : Structure de l'os lamellaire (a), l'os non lamellaire (b) et la dentine (c) en MET, associée à la représentation schématique de la disposition des fibres de collagène au sein de ces mêmes tissus

Figure 22. Concept de la biominéralisation liée à la stéréochimie du collagène

Figure 23 : Représentation schématique du modèle de minéralisation au niveau de la prédentine et du front de minéralisation

Figure 24. Images microradiographiques de 3èmes molaires humaines atteintes de dentinogenèse imparfaite

Figure 25 : Calcifications pulpaire de taille variable au sein de la pulpe dentaire

Figure 26 : Homéostasie du phosphate

Figure 27 : Représentation schématique des transporteurs de phosphate sodium-dépendant

Figure 28 : Représentation de la distribution et la localisation des transporteurs de phosphate dans le tissu rénal

Figure 29 : Représentation de la protéine SLC20A1

Figure 30 : Photographie des incisives d'une souris *Slc34a1*^{-/-} âgées de 3 semaines

Figure 31 : La surexpression de SLC20A1 entraîne des anomalies amélaire chez des rats transgéniques

Figure 32 : Résumé des résultats obtenus par hybridation *in situ* pour SLC20A2 chez la souris de E14,5 à P14

Figure 33. Schéma représentant le système CreLoxP

Figure 34. Culture organotypique de germe dentaire

Figure 35 : Germe de 1ère molaire mandibulaire de souris prélevé à E16.5 et cultivé 10 jours sur un milieu semi solide BGJb.

Figure 36. Analyse de la répartition de la fluorescence 3D par microscopie à feuille de lumière sur un germe de première molaire mandibulaire de souris sauvage transduit avec des shSLC34A2 *via* un vecteur lentiviral

Figure 37 : Photographie et reconstruction 3D à partir de données microCT d'une tête de souris *Slc20a2*^{-/-} âgée de 8 mois et ayant des incisives fracturées.

Figure 38 : Analyse histologique par coloration Movat sur coupes fines du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-}

Figure 39 : Analyse histologique par coloration Movat sur coupes fines du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-}

Figure 40 : Analyse histologique par coloration Movat sur coupes fines du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-} : tissu inflammatoire en regard de la fracture d'une incisive mandibulaire d'une souris mutante de 8 mois

Figure 41 : Analyse des tissus minéralisés des souris *Slc20a2*^{-/-} par microscopie électronique à balayage

Figure 42 : Analyse par Micro Computed Tomography (microCT) des souris *Slc20a2*^{-/-}

Figure 43 : Analyse du ratio Ca/P par EDX

Figure 44 : Reconstitutions des têtes de souris sauvage et SLC20A2 KO par microCT objectivant les nombreuses calcifications cérébrales de la souris invalidée pour SLC20A2

Figure 45 : Analyse histologique par coloration Masson sur coupes paraffine de têtes décalcifiées de souris *Dmp1 cre Slc20a2 loxlox*.

Tableau I : Composition globale de la dentine

Tableau II. Type, distribution et fonction du ciment

Tableau III. Comparaison des caractéristiques principales des tissus minéralisés

Tableau IV. Dénomination et caractéristiques des cotransporteurs sodium-phosphate

Tableau V. Synthèse des données actuelles concernant les transporteurs de phosphate dans les cellules et tissus dentaires

AVANT PROPOS

Les tissus minéralisés de la sphère oro faciale ont une importance capitale dans la vie animale depuis l'ère cambrienne en permettant d'assurer entre autres des fonctions dans l'alimentation, la phonétique ou l'attaque-défense. La sphère oro-faciale comporte les quatre types de tissus biominéralisés physiologiques, à savoir l'émail, la dentine, le ciment et l'os. Le développement de l'organe dentaire implique l'interaction de ces quatre tissus, présents chez tous les mammifères. Bien que ces tissus minéralisés soient tous composés d'une phase minérale sous forme de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$) et d'une matrice protéique, ils diffèrent sur le plan de la taille des cristaux, de leur forme, de leur orientation, de la densité minérale, de la distribution des ions minéraux ainsi que de la nature de la trame protéique et de la proportion entre les composants minéraux et protéiques. Malgré ces différences, les tissus minéralisés se forment à partir de processus similaires impliquant des protéines matricielles, des protéases et des ions minéraux qui régulent collectivement la nucléation, la croissance et l'organisation des cristaux d'hydroxyapatite. Ces processus maîtrisés nécessitent l'intervention régulée, entre autres, de transporteurs de phosphate permettant de concentrer les ions phosphate nécessaires au bon endroit et au bon moment de l'odontogénèse. Les grands acteurs systémiques de l'homéostasie du phosphate et du développement des tissus minéralisés sont bien connus, notamment grâce à l'étude de la physiopathologie humaine et murine. Mais au niveau local, et plus particulièrement au niveau dentaire, nous manquons de données quant aux protéines responsables de l'import/export et de la régulation du phosphate lors du développement et de la minéralisation dentaires.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés lors de cette thèse à l'étude exhaustive des transporteurs de phosphate de haute affinité présents à la membrane cellulaire des mammifères et à leur potentielle implication fonctionnelle au cours du développement et de la minéralisation dentaires.

Nous aborderons dans un premier chapitre de rappels bibliographiques les processus développementaux au cours desquels s'insèrent les phénomènes de biominéralisation dentaire et osseuse, la description histologique et physico-chimique de l'émail, de la dentine, du ciment et de l'os alvéolaire. Nous ferons également le point sur les connaissances actuelles des mécanismes de biominéralisation connus chez les mammifères puis sur les transporteurs de phosphate en général. Enfin nous analyserons les données disponibles sur la minéralisation dentaire et les transporteurs de phosphate.

Les deux chapitres faisant suite à cette introduction seront consacrés à l'étude proprement dite réalisée au cours de cette thèse. Nous avons analysé dans un modèle murin sauvage l'expression de ces transporteurs de phosphate par différentes techniques lors du développement dentaire : analyse ARN par hybridation *in situ* et qPCR, analyse protéique par immunohistochimie. Nous avons comparé ces résultats obtenus dans le modèle murin à ceux obtenus chez l'Homme. Cela nous a permis de distinguer les candidats pour leur potentielle implication fonctionnelle dans les phénomènes de minéralisation dentaire. Nous avons ensuite mis en place plusieurs modèles d'étude de la fonction de ces transporteurs de phosphate chez le rongeur : *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, dans lesquels nous avons invalidé les transporteurs de phosphate précédemment sélectionnés puis analysé l'effet sur le développement et la minéralisation dentaires.

Nous terminerons ce manuscrit de thèse par une discussion générale permettant de mettre en lien les données actuelles de la littérature, les résultats obtenus lors de cette thèse et les perspectives de ce travail.

INTRODUCTION

L'organe dentaire est un système complexe constitué de trois tissus minéralisés et produits par des cellules hautement différenciées (Figure 1). L'émail, le tissu le plus minéralisé de l'organisme, est formé par les améloblastes, cellules d'origine épithéliale, il recouvre la dentine au niveau coronaire. Sous jacente à l'émail et entourant la pulpe, la dentine, est formée tout au long de la vie par les odontoblastes, cellules d'origine mésenchymateuse. Recouvrant la dentine au niveau radiculaire, le cément est un tissu minéralisé formé par les cémentoblastes, d'origine mésenchymateuse. Enfin, l'os alvéolaire soutient la dent dans son alvéole. Il lui est intimement lié et ne se forme que si le germe dentaire, puis la dent, existe et fait son éruption. Il est formé par les ostéoblastes, cellules d'origine mésenchymateuse. La formation de ces tissus se fait par des processus de biominéralisation.

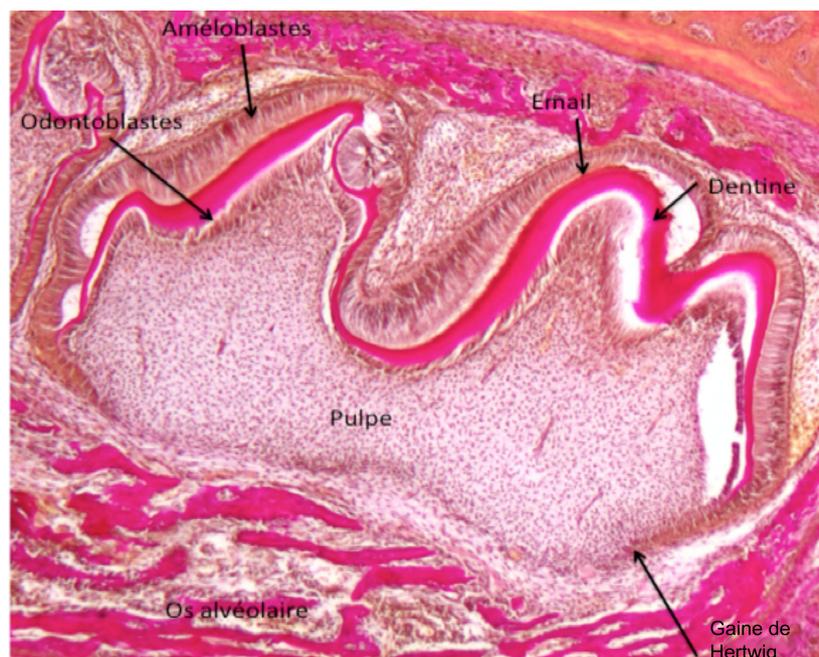


Figure 1. Coupe histologique d'une première molaire mandibulaire de souris à 4 jours de développement. Coloration Van Gieson sur coupe paraffine (Laure Merametdjian)

La biominéralisation est le processus physiologique qui permet aux organismes vivants d'élaborer une structure minérale, le biominéral. Un biominéral se distingue de son équivalent purement minéral par la présence chez les vertébrés de molécules organiques qui lui confèrent des propriétés spécifiques et par sa localisation au sein d'un tissu minéralisé. L'hydroxyapatite, le constituant principal des tissus minéralisés tels que l'os et les dents, est

formé à partir d'ions phosphate et calcium sous la forme $(Ca_5(PO_4)_3(OH)_2)$. Ces processus maîtrisés nécessitent l'intervention régulée de transporteurs de phosphate permettant de concentrer les ions phosphate nécessaires au bon endroit et au bon moment lors de l'odontogénèse.

1 EMBRYOLOGIE ET HISTOLOGIE DES TISSUS DENTAIRES MURINS

Chez les rongeurs, la denture présente un certain nombre de spécificités. Le rongeur est monophyodonte et ne présente donc pas de cycle de remplacement de dents, contrairement à l'homme qui est diphyodonte. Chez la souris, chaque hémi mâchoire mandibulaire et maxillaire comporte une incisive mono cuspidée à croissance continue, et trois molaires multi cuspidées appelées M1, M2 et M3 (Figure 2) alors que l'homme présente une denture temporaire ou lactéale composée de 20 dents (incisives, canines, molaires) et une denture définitive composée de 32 dents (incisives, canines, prémolaires, molaires).

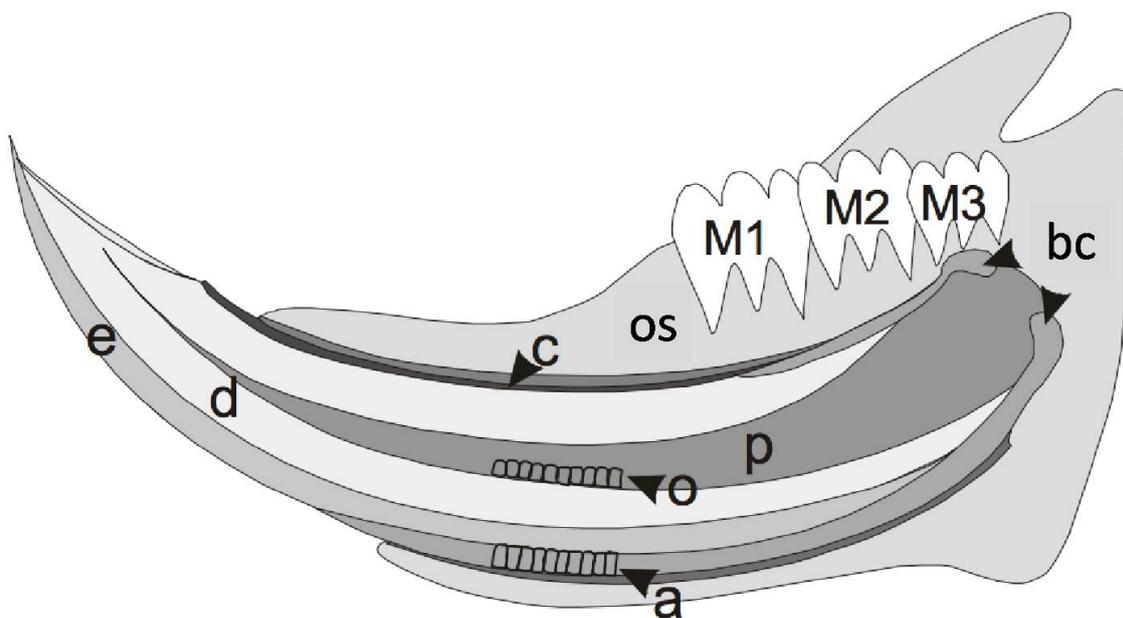


Figure 2. Illustration d'une hémimandibule de souris avec une incisive à croissance continue en vue sagittale.

e, email ; d, dentine ; a, améloblastes ; o, odontoblastes ; p, pulpe ; c, cément ; os ; bc, boucle cervicale ; M1, première molaire ; M2, deuxième molaire ; M3 ; troisième molaire. Traduite de Piette et Goldberg 2001

De plus, la souris possède des incisives à croissance continue ayant un développement

asymétrique avec dépôt de l'émail uniquement sur la partie labiale et une partie linguale analogue de racine. Enfin, la forme générale des dents est différente entre les deux espèces.

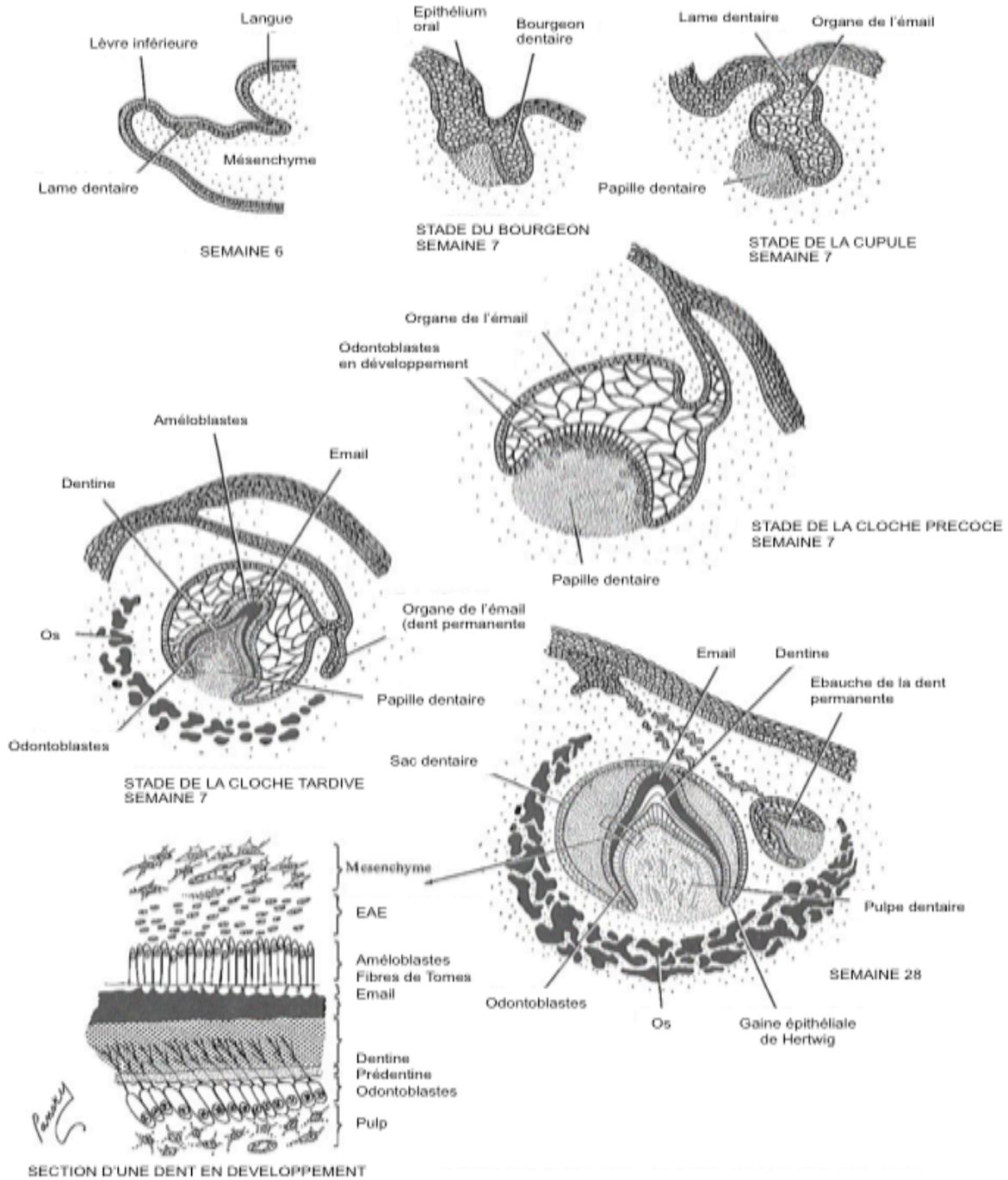


Figure 3. Illustration schématique des différents stades de l'odontogénèse humaine, modifiée à partir de Bansky (Medical Embryology, 1982).

Néanmoins le modèle murin présente de grandes similitudes avec l'Homme dans les processus de formation et de développement dentaire, dans la globalité comme dans le détail.

En effet, la même cinétique d'engagement et les mêmes cascades de communication cellulaire ont été conservées au cours de l'évolution, ce qui permet de considérer la souris comme un modèle pertinent de l'odontogenèse humaine. Le schéma développemental, bien décrit dans la littérature, suit les mêmes stades (Figures 3 et 4) et les phénomènes de minéralisation impliqués sont similaires (Thesleff *et al.* 1987 ; Chen *et al.* 1996 ; Peterkova *et al.* 1996 ; Thesleff 2006 ; Kim *et al.* 2012).

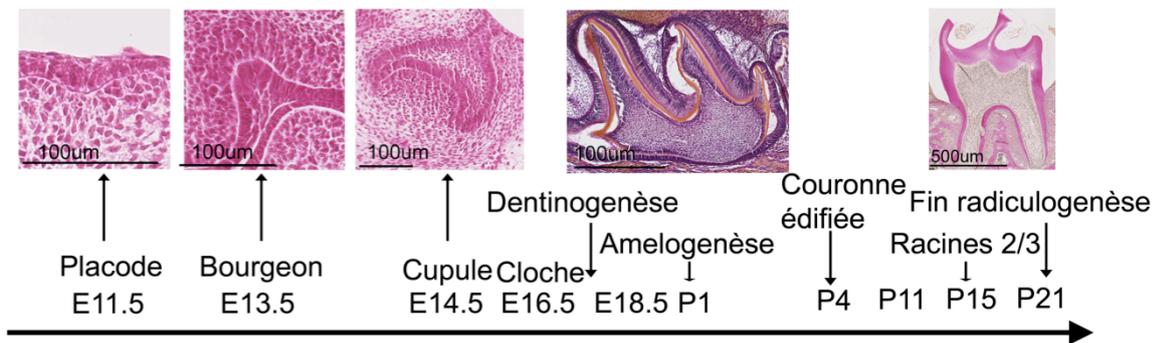


Figure 4. Coupes histologiques représentatives des étapes de l'odontogenèse murine. Coloration HES sur coupes paraffine (Laure Merametdjian)

Les dents sont des organes dont la partie mésenchymateuse dérive des cellules de la crête neurale crânienne ayant migré le long du tube neural vers le premier arc branchial de l'embryon, et dont la partie épithéliale est issue de l'ectoderme du 1^{er} arc branchial (Chai *et al.*, 2000 ; Cho *et al.*, 2003 ; Miletich et Sharpe, 2004 ; Rothova *et al.*, 2011).

Le développement de la dent (Figures 3 et 4) débute par une phase d'initiation déterminant, dans l'arc mandibulaire et maxillaire, des régions spécifiques pour chaque classe de dents et aboutissant à la formation de la lame dentaire. La phase de morphogénèse est caractérisée par différents stades (lame, bourgeon, capuchon, cloche) (Figure 4) et suivie d'une phase de cytodifférenciation lors de laquelle les cellules mésenchymateuses et de l'épithélium dentaire au contact de la membrane basale deviennent respectivement des odontoblastes et des améloblastes. Ces cellules fonctionnelles sécrètent respectivement la prédentine et la dentine pour les odontoblastes (Ruch *et al.* 1995 ; Smith et Lesot, 2001) et les composants de l'émail pour les améloblastes (Robinson *et al.*, 1998). La phase finale est l'édification radiculaire qui se produit à la fin de la formation coronaire. Au contact de la prédentine-dentine, les cémentoblastes se différencient et déposent le ciment (Diekwisch, 2001 ; Bosshardt, 2005). Enfin, l'éruption dentaire fait intervenir des phénomènes de remodelage osseux localisés (Marks et Schroeder, 1996).

1.1 La morphogénèse de la couronne de la première molaire inférieure

1.1.1 Stades initiaux : lame et placode

La première manifestation morphologique du développement de la première molaire au niveau des arcs mandibulaire et maxillaire apparaît au 11^{ème} jour du développement embryonnaire chez la souris (Figure 5). Des zones spécifiques de l'épithélium oral s'épaississent et forment la lame dentaire. Ces zones d'épaississement sont composées de 4 à 5 couches cellulaires appelées placodes dentaire ou odontogène.

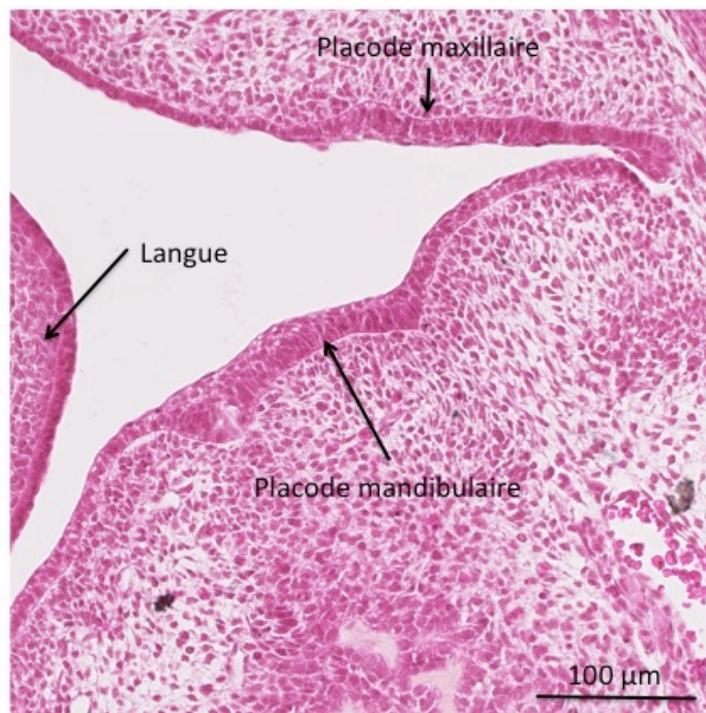


Figure 5. Coupe histologique de tête d'embryon de souris à 11 jours de développement (E11,5). Coloration HES sur coupe paraffine (Laure Merametdjian)

1.1.2 Stades de la morphogénèse : le bourgeon dentaire

Au 13^{ème} jour embryonnaire chez la souris, l'épithélium de la lame dentaire devient plus massif et s'invagine dans le mésenchyme sous-jacent grâce à la prolifération des cellules de la couche basale et aux actions d'enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire mésenchymateuse. En même temps, le mésenchyme sous-jacent se condense du fait de l'augmentation de la prolifération de ses cellules et formera la future pulpe dentaire et le mésenchyme péri-dentaire (Figure 6).

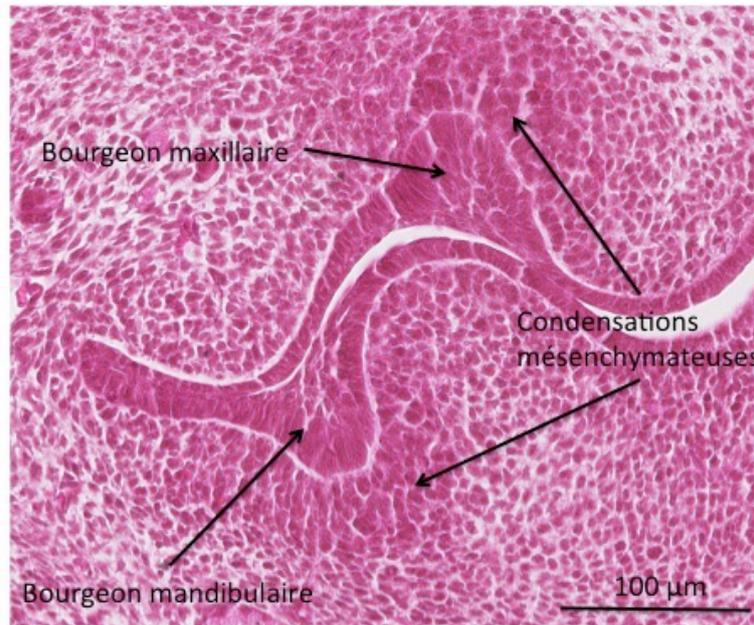


Figure 6. Coupe histologique de tête d'embryon de souris à 13 jours de développement (E13,5). Coloration HES sur coupe paraffine (Laure Merametdjian)

1.1.3 Stades de la morphogénèse : le capuchon (ou cupule)

Au 14^{ème} jour embryonnaire chez la souris, le bourgeon épithélial s'aplatit sur le mésenchyme condensé et prend la forme d'un capuchon (Figures 3-4-7). Les extrémités du capuchon (la lèvre cervicale) prolifèrent activement et vont progressivement délimiter la pulpe dentaire. La progression de l'histogénèse épithéliale conduit à l'apparition de deux couches distinctes l'épithélium dentaire interne (EDI) et l'épithélium dentaire externe (EDE). Les cellules de l'épithélium dentaire interne situées au contact du mésenchyme dentaire sont initialement pseudo-stratifiées. L'épithélium dentaire externe se compose d'une seule couche de cellules cubiques. Progressivement, deux autres zones cellulaires se différencient entre l'épithélium dentaire externe et l'épithélium dentaire interne, le réticulum stellaire (RS) et le *stratum intermedium* (SI). Ces 4 couches cellulaires forment une entité appelée l'organe de l'émail. Le réticulum stellaire s'interpose entre l'épithélium dentaire externe et le *stratum intermedium*. Les cellules de forme étoilée du réticulum stellaire sont séparées les unes des autres par de grands espaces extracellulaires riches en glycosaminoglycanes, qui constituent une réserve énergétique importante pour l'organe de l'émail. Le *stratum intermedium* est formé d'une à deux couches de cellules aplaties en contact étroit avec les cellules de l'épithélium dentaire interne (Coin *et al.* 1999).

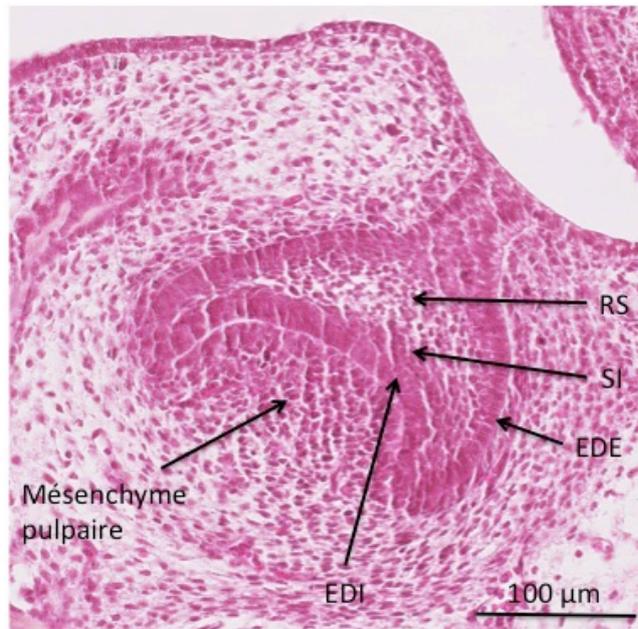


Figure 7. Coupe histologique de tête d'embryon de souris à 14 jours de développement (E14,5). Coloration HES sur coupe paraffine (Laure Merametdjian).

RS : réticulum stellaire ; SI : *stratum intermedium* ; EDE : épithélium dentaire externe ; EDI : épithélium dentaire interne.

1.1.4 Stades de la morphogénèse : la cloche

Au 16^{ème} jour embryonnaire chez la souris (14^{ème} semaine de vie intra-utérine chez l'Homme), la morphogénèse coronaire s'achève et les patrons cuspidiens spécifiques à chaque dent se mettent en place, c'est le stade de la cloche (Figure 8). Au centre de la concavité de l'épithélium dentaire interne apparaît un centre organisateur, le nœud de l'émail, duquel vont partir les cascades de signaux nécessaires à la fin de la morphogénèse spécifique à chaque type de dent. Dans les dents pluri-cuspidées, comme la première molaire mandibulaire, des nœuds de l'émail secondaires apparaissent également au sommet de chaque future cuspid-

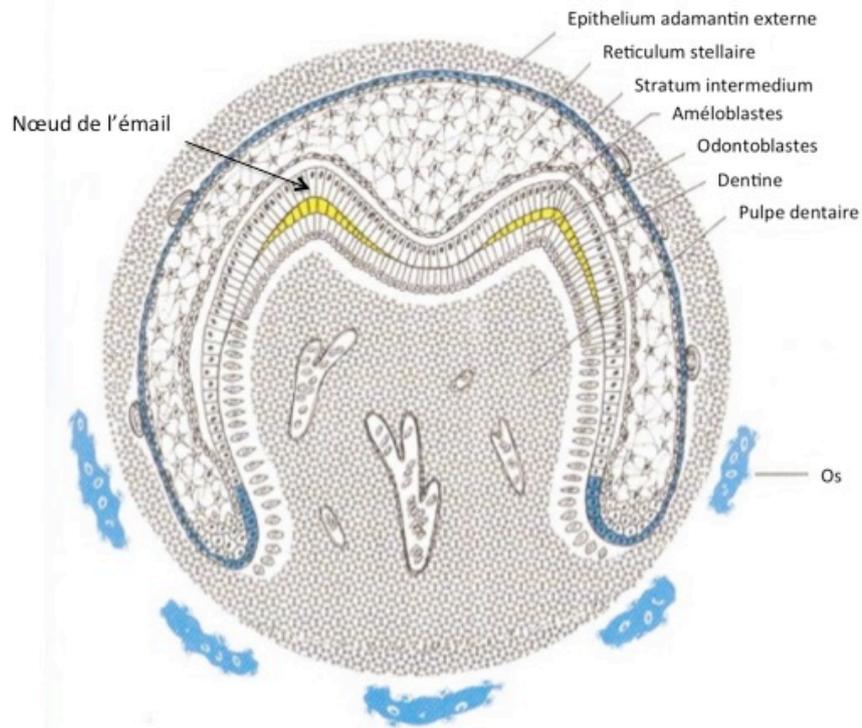


Figure 8. Schéma du stade cloche tardif adapté de James Avery (Essentials of Oral Histology and Embryology, 2000)

1.2 Histogénèse, différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes

La différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes (Figure 9) intervient dans chaque dent selon un patron spatio-temporel spécifique (Lisi *et al.* 2003), elle débute au sommet des cuspidés et progresse en direction apicale formant un gradient de différenciation. La taille et la morphologie coronaire de chaque dent est fonction du nombre d'odontoblastes et d'améloblastes post-mitotiques ainsi que de leur distribution spatiale.

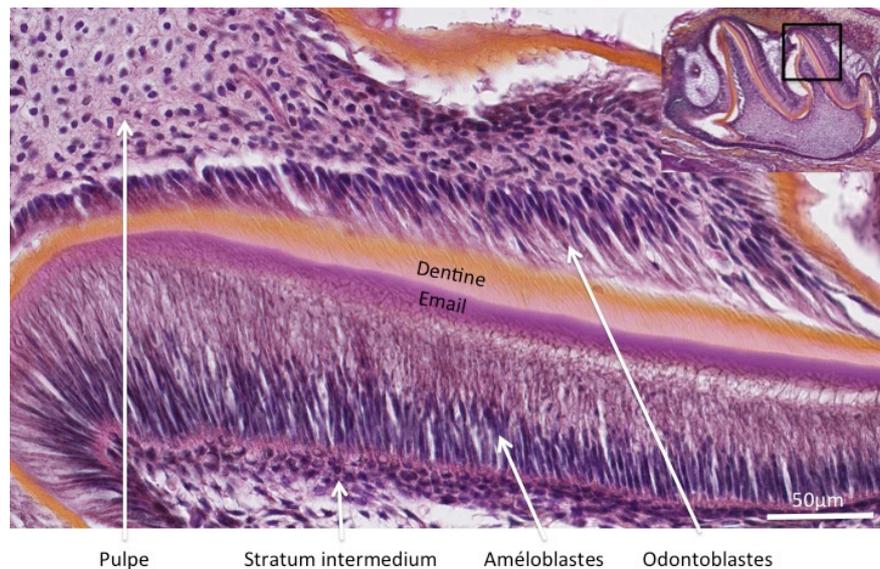


Figure 9. Coupe histologique de tête de souris décalcifiée à 3 jours post nataux (P3). Coloration HES sur coupe paraffine (Laure Merametdjian)

1.2.1 Odontoblastes et dentinogénèse

Dans la première molaire mandibulaire, les premiers odontoblastes fonctionnels apparaissent au sommet des cuspidés principales au 18^{ème} jour de développement embryonnaire chez la souris. Ce sont des cellules post-mitotiques de la pulpe dentaire qui au contact de la membrane basale les séparant de l'épithélium dentaire interne s'allongent et se polarisent (Ruch, 1995). Dans un premier temps, les odontoblastes synthétisent et sécrètent les constituants organiques d'une matrice extracellulaire non minéralisée, la prédentine, tels que la sialoprotéine dentaire (DSP), la phosphoprotéine dentaire (DPP), des collagènes (essentiellement trimère de type I), des protéoglycanes, diverses métalloprotéinases et protéines sériques, divers lipides et facteurs de croissance membres de la famille des TGF-beta (Cam *et al.*, 1990 ; Linde et Goldberg, 1993). La prédentine se transforme progressivement en dentine minéralisée au niveau d'une zone spécifique, le front de minéralisation, où les premières nucléations d'hydroxyapatite au sein des fibres de collagènes vont apparaître. Au fur et à mesure de leurs sécrétions, les odontoblastes reculent aux dépens de la chambre pulpaire mais laissent au travers de la prédentine et de la dentine des prolongements cellulaires ancrés dans un tubule (ou canalicule). Ces prolongements sécrètent des constituants matriciels non collagéniques et des ions qui vont progressivement former une gangue autour du tubule appelée dentine péri-tubulaire. Dans la pulpe dentaire, les odontoblastes alignés sous la prédentine forment la couche cellulaire odontoblastique. Ils sont

reliés entre eux par différentes jonctions membranaires et par des embranchements situés au niveau de leurs prolongements cytoplasmiques (Goldberg *et al.*, 2014). Le statut de cellules différenciées est non seulement conféré à ces cellules par leur morphologie (cellules très allongées et polarisées), mais également par leur capacité à sécréter de la matrice dentinaire. Les odontoblastes présentent donc différentes caractéristiques intracellulaires de sécrétion : ils possèdent un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi développé ainsi que de nombreuses mitochondries et vésicules d'exocytose. En effet, les odontoblastes sécrètent la pré-dentine au niveau de leur pôle apical. La matrice organique encore non minéralisée comporte différents composants protéiques de type collagénique tels que le collagène de type I, V, le trimère de collagène I ; des protéoglycanes (décorine, biglycan, dermatane sulfate, perlecan, kératane sulfate) et des glycoprotéines (Ruchet *et al.*, 1995). Les fibres collagéniques serviront plus tard de trame aux dépôts de cristaux d'hydroxyapatite (mécanisme détaillé dans la prochaine partie de ce chapitre d'introduction). En plus de ces éléments, des protéines non collagéniques, associées à la minéralisation, seront sécrétées : sialoprotéines (ostéonectine, ostéocalcine, ostéopontine (OPN), sialoprotéine dentinaire (DSP), des phosphoprotéines telles que la phosphoprotéine dentinaire (DPP) et la protéine dentinaire matricielle-1 (DMP1). En plus de leur activité de synthèse, les odontoblastes sont également impliqués dans la dégradation de composants organiques par la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Palosaari *et al.*, 2003).

Dans la pulpe dentaire, directement sous la couche superficielle constituée des odontoblastes se trouve une couche de cellules subodontoblastiques, dites cellules de Hoehl. Les odontoblastes et les cellules de Hoehl partagent un même lignage, dérivant des crêtes neurales. Les cellules de Hoehl sont présumées être le résultat de la dernière division cellulaire des pré-odontoblastes. Les odontoblastes forment au départ une couche cellulaire organisée en 4 à 5 rangées de corps cellulaires. Lors de la maturation et du vieillissement dentaire, le nombre d'odontoblastes diminue progressivement et la couche odontoblastique devient unicellulaire. Les odontoblastes sont des cellules post mitotiques hautement différenciées avec une durée de vie limitée. Avec le temps, des lysosomes et des vacuoles autophagiques emplissent les odontoblastes matures qui deviennent finalement des cellules apoptotiques (Couve et Schmachtenberg, 2011). Les cellules de Hoehl renouvellent probablement les odontoblastes âgés, en tant qu'odontoblastes de deuxième génération (Goldberg et Smith, 2004) après l'activation de leur différenciation terminale. Cette hypothèse est renforcée par une étude montrant que les cellules de Hoehl présentent une forte

activité ALP (phosphatase alcaline) et expriment Thy-1, un marqueur de surface des cellules souches et progénitrices (Hosoya *et al.*, 2012), présentant après stimulation par BMP-2 une capacité à se différencier en cellules minéralisantes (formation de nodules de calcification identifiés par coloration au rouge d'alizarine). De plus, si les cellules pulpaires peuvent synthétiser un tissu « dentine-like » dit de réparation, les cellules de la couche sub odontoblastique permettent la formation de dentine dite réactionnelle (cf. paragraphe 2.2.1.3 page 37). Les cellules de Hoehl participent donc aux processus de dentinogénèse formant avec les odontoblastes un complexe minéralisant.

1.2.2 Améloblastes et amélogénèse

L'apparition de ce tissu minéralisé survient généralement à un jour post natal (P1) chez la souris (vers le troisième - quatrième mois *in utero* chez l'Homme). Les améloblastes commencent leur dépôt à l'emplacement de ce qui deviendra les cuspides des dents face à la dentine. La formation de l'émail se poursuit ensuite vers l'extérieur et le bas de la dent, de façon centrifuge. L'amélogénèse démarre systématiquement après l'initiation de la dentinogénèse et requiert le dépôt de la matrice dentinaire.

Les améloblastes, responsables de la formation de l'émail, sont des cellules épithéliales d'origine ectodermique, ayant des caractéristiques morphologiques qui évoluent à chaque stade de développement (améloblastes pré-sécréteurs, améloblastes sécréteurs, améloblastes de maturation à bordure lisse ou en brosse, améloblastes de protection) (Figure 10) jusqu'à disparaître en fusionnant avec l'épithélium oral lors de l'éruption dentaire. Ceci implique que toute altération de l'émail est irréversible chez l'homme (Bei 2009). Lors de l'histogénèse de l'organe de l'émail (Figure 10), de grandes cellules de l'épithélium dentaire interne en forme de colonnes se différencient en pré-améloblastes au contact de la pré-dentine et débutent leur différenciation terminale (Boyde, 1976; Osborn et Ten Cate, 1983 ; Ten Cate, 1994). Ils sortent du cycle cellulaire, se polarisent, s'allongent et sécrètent les composants de l'émail (énameline, amélogénine, améloblastine, tufteline...) et les enzymes impliqués dans l'amélogénèse (Robinson *et al.*, 1998). Ces différenciations cellulaires s'accompagnent de la dégradation de la membrane basale qui séparait les pré-améloblastes des pré-odontoblastes. L'améloblaste pré-sécréteur acquiert progressivement ses fonctionnalités de cellule sécrétrice et devient un améloblaste sécréteur sans prolongement de Tomes (Bei, 2009). A ce stade, l'améloblaste sécrète une fine couche d'émail aprismatique de 10µm d'épaisseur au contact du manteau dentinaire (la première couche de dentine sécrétée par les odontoblastes).

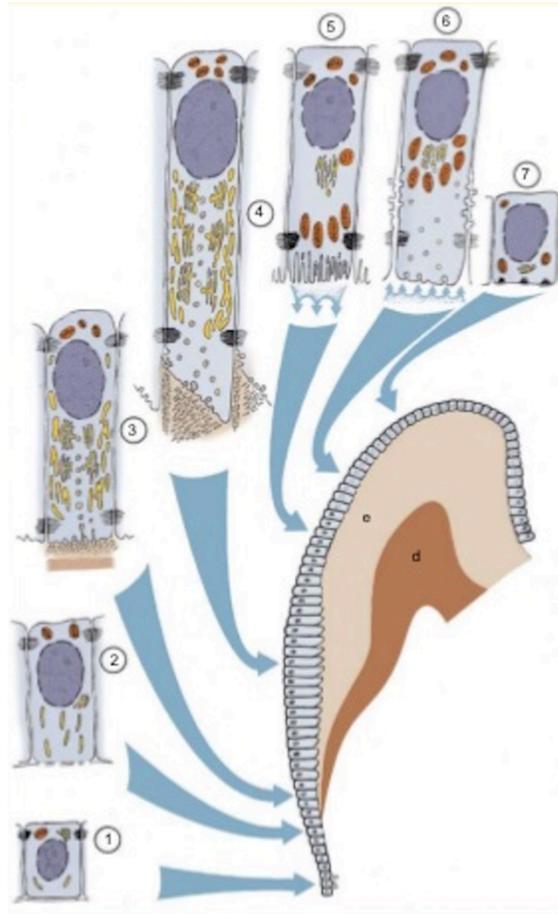


Figure 10. Cycle de vie d'un améloblaste (Oral Histology, Ten Cate)

1. Stade morphogénétique 2. Stade d'histo-différenciation 3. Stade de pré-sécrétion (absence de prolongement de Tomes 4. Stade de sécrétion (prolongement de Tomes) 5. Stade de maturation ruffle-ended 6. Stade de maturation smooth-ended 7. Stade de protection

Cette couche d'émail aprismatique interne participe à la jonction amélo-dentinaire, composée de la matrice minéralisée du manteau dentinaire en contact intime avec des cristaux d'émail. Après sécrétion de cette première strate d'émail, l'améloblaste forme à son pôle distal un prolongement dit de Tomes et devient un améloblaste sécréteur, qui sécrète l'émail prismatique immature. La partie distale du prolongement va donner l'émail prismatique et la partie proximale, l'émail interprismatique. Enfin, l'améloblaste de maturation assure la maturation de l'émail et présente deux types : l'améloblaste à bordure lisse et à bordure en brosse. L'améloblaste de protection protège la surface de l'émail mature jusqu'à l'arrivée de la dent en bouche. Les améloblastes différenciés sont des cellules épithéliales exocrine sécrétoires, organisées en groupe monocouche de cellules (Boyde, 1976). Les améloblastes fonctionnels n'existent que dans les couronnes des germes dentaires chez l'Homme, chez la souris ils persistent au niveau de la face labiale de l'incisive à croissance continue. Ce sont

des cellules uniques responsables de la synthèse des constituants organiques de l'émail des dents. La différenciation terminale des améloblastes est initiée aux sommets des cuspides et se propage en direction apicale (Smith et Nanci, 1995).

1.2.2.1 *Stade de pré-sécrétion*

Les premiers améloblastes post-mitotiques sont observés environ 24 heures après l'apparition des premiers odontoblastes fonctionnels, soit au 19^{ème} jour embryonnaire chez la souris. Les améloblastes forment un complexe fonctionnel avec le *stratum intermedium* pour la sécrétion de l'émail (Lesot et Brook, 2008). Dans les conditions physiologiques, le dépôt d'émail n'est initié qu'en présence de dentine minéralisée et après dégradation de la membrane basale par des protéases synthétisées par les améloblastes pré-sécréteurs.

1.2.2.2 *Stade de sécrétion*

Afin de former la première couche amélaire, les protéines sont déposées directement sur la dentine minéralisée pour former l'émail aprismatique. Cet émail aprismatique forme un moule pour les prolongements de Tomes des améloblastes. En effet, au cours de sa différenciation, l'améloblaste forme une extension cellulaire plus ou moins conique qui organise le développement des prismes de l'émail en sécrétant des granules (Slavkin *et al.* 1976). Ce premier dépôt compose l'émail prismatique immature. Ensuite, la matrice sécrétée forme une structure spécifique en prisme et interprisme liée à la zone, distale ou proximale, de sécrétion du prolongement de Tomes. Il s'agit d'une trame organique qui contient du calcium et du phosphate et qui sera ensuite minéralisée en deux temps avec la formation de cristaux d'hydroxyapatite pendant la phase de maturation. Trente pour cent de la minéralisation de l'émail sera réalisée lors de la phase de sécrétion et le restant lors de la maturation (Oral Histology, Ten Cate). Les ions calcium et phosphate auront été extraits de la circulation via l'épithélium dentaire externe puis diffusion et stockage au sein du réticulum étoilé puis concentration via le *stratum intermedium* pour passage aux cellules minéralisantes, les améloblastes.

1.2.2.3 *Stade de maturation*

Ce stade de maturation comprend une disparition du prolongement de Tomes et également une destruction de la matrice organique par la sécrétion de protéases alors que la minéralisation se poursuit (Gibson, 2011). On connaît par exemple MMP-20 qui agit avec KLK-4 pour cliver certaines protéines de l'émail lors de la maturation. Parmi les protéines sécrétées par les améloblastes à ce stade de minéralisation complète, on trouve l'amélogénine

(Fincham et Simmer, 1997), l'améloblastine (Torres-Qintana *et al.*, 2005), et l'énaméline (Hu *et al.*, 2001). Enfin, les cristaux de l'émail vont croître par l'arrivée massive d'ions calcium et d'ions phosphate *via* le *stratum intermedium*.

1.2.2.4 *Stratum intermedium*

Le *stratum intermedium* (strate intermédiaire) est une couche de deux ou trois cellules située entre l'épithélium dentaire interne et les cellules formées du réticulum étoilé (Figure 9). Il apparaît lors du stade de la cloche au début du développement des dents. Ses cellules ne sont pas allongées comme les améloblastes. Le *stratum intermedium* a une activité phosphatase alcaline particulièrement élevée qui lui permet de faire passer les ions du réticulum étoilé dans les améloblastes puis dans l'émail. L'association du *stratum intermedium* et de la palissade améloblastique forme le complexe de formation de l'émail.

1.3 Edification radiculaire

La couronne une fois formée, les interactions épithélio-mésenchymateuses reprennent : dans la partie cervicale de l'organe de l'émail, l'épithélium dentaire externe et l'épithélium dentaire interne fusionnent pour former la gaine de Hertwig. Celle-ci progresse en direction apicale au sein du mésenchyme au fur et à mesure des multiplications cellulaires. Une fois la gaine de Hertwig formée (Figure 1), elle initie rapidement l'édification radiculaire. Une membrane basale sépare de chaque côté la gaine d'Hertwig des mésenchymes pulpaire et folliculaire :

- Du côté pulpaire, la membrane est similaire à celle de la couronne, elle contient des fibrilles d'ancrage riches en fibronectine. Les cellules de l'épithélium dentaire interne initient la différenciation des odontoblastes qui sécrètent la dentine radiculaire.
- Du côté folliculaire, la membrane basale ne porte pas de fibrilles d'ancrage. Au fur et à mesure de la progression de la formation de la dentine radiculaire, la gaine épithéliale de Hertwig se désagrège permettant le contact direct de la dentine avec le mésenchyme folliculaire, ce qui initie la différenciation des cémentoblastes (Diekwisch, 2001; Bosshardt, 2005).

Le sac folliculaire est constitué de trois groupes cellulaires superposés :

- Les cellules de la couche interne : se différencient en cémentoblastes et forment le ciment.
- Les cellules de la couche intermédiaire : forment les fibres parodontales.
- Les cellules de la couche externe : forment de l'os alvéolaire.

1.4 Cémentogénèse

Le cément est un tissu minéralisé recouvrant la dentine radiculaire (Figure 11) qui intervient dans l'attachement et l'ajustement de la position post éruptive de la dent (Zhao *et al.* 2016).

Il existe deux types distincts de cément en terme de localisation et de fonction, le cément acellulaire et cellulaire, dont la formation et la fonction seront traitées ci-après. La cémentogénèse est un processus encore non complètement compris à ce jour.

1.4.1 Cément acellulaire

Le premier type de cément à se former est le cément acellulaire. Il se forme préalablement à l'éruption des dents et est situé dans la partie coronaire des racines. Les fibres du ligament alvéolo-dentaire s'y fixent et créent un ancrage souple et résistant entre la dent et l'os alvéolaire, nécessaire à la bonne fonction masticatoire.

1.4.2 Cément cellulaire

Le cément cellulaire se développe après l'éruption de la dent sur l'arcade. Il est situé plus apicalement le long des racines et possède un rôle d'ajustement de la position de la dent lors de son éruption et de sa fonction. Le cément cellulaire est formé par les cémentoblastes qui s'emmurent dans la matrice minéralisée pour devenir des cémentocytes, de manière similaire à ce qui se passe dans l'os avec les ostéocytes, mais à la différence des odontoblastes ou améloblastes qui forment une palissade toujours extérieure au tissu minéralisé formé. Cependant, contrairement aux ostéocytes agissant en tant que mécanorécepteurs et modulateurs de l'homéostasie osseuse, le rôle précis des cémentocytes n'a pas encore été élucidé (Zhao *et al.* 2016). L'origine des cémentoblastes reste controversée. L'hypothèse classique suggère qu'ils proviennent des cellules ecto-mésenchymateuses du follicule dentaire. Une hypothèse alternative supporte l'idée que les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig subissent une transformation épithélio-mésenchymateuse et donnent les cémentoblastes (Bosshardt 2005).

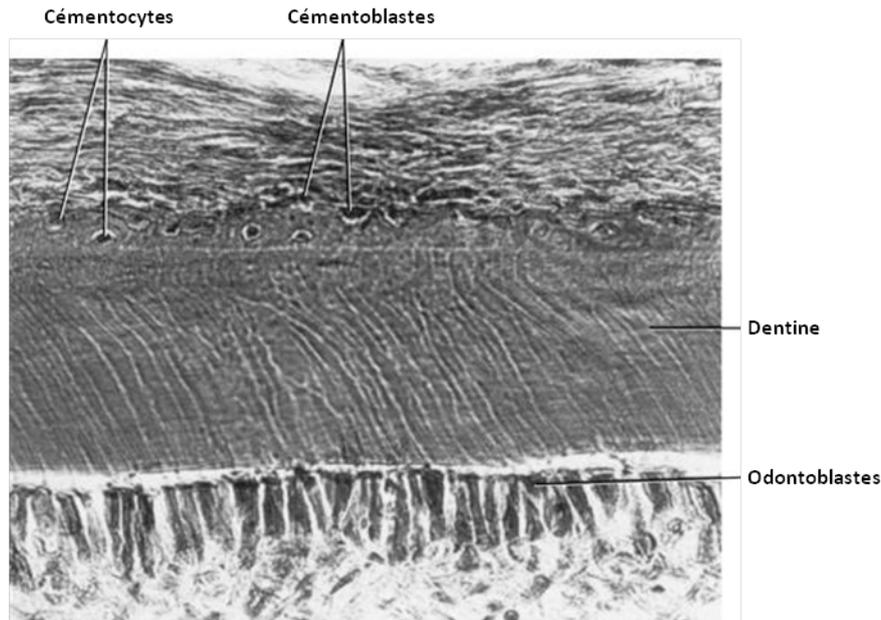


Figure 11 : Coupe tissulaire représentant une déposition de ciment sur de la dentine radiculaire. Certains cémentoblastes sont emmurés dans la matrice cémentaire et deviennent des cémentocytes (Oral Development, James Avery. 2002)

1.5 Le sac folliculaire et l'éruption dentaire

Le sac folliculaire ou sac dentaire enveloppe l'organe de l'émail et la papille mésenchymateuse. Dans un premier temps le sac folliculaire va avoir pour rôle d'une part de protéger le germe dentaire au cours de son développement et d'autre part de fournir à l'organe de l'émail les éléments nutritionnels nécessaires au cours de l'amélogénèse par l'intermédiaire de sa vascularisation. Ultérieurement, au cours de l'édification des racines, c'est au sein du sac folliculaire que se produiront les processus de cyto-puis histodifférenciation qui aboutiront à la mise en place des tissus parodontaux: l'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire et le ciment. Enfin le sac folliculaire est également important pour l'éruption dentaire *via* des phénomènes d'apposition/résorption osseuse dont la dynamique et la signalisation précises ne sont pas encore élucidées à ce jour.

1.6 La pulpe

La pulpe dentaire est la forme mature de la papille mésenchymateuse. C'est un tissu conjonctif lâche qui occupe la partie centrale de la dent. L'espace occupé s'appelle la cavité pulpaire. Elle est divisée en deux régions : la portion coronale (chambre pulpaire coronaire)

et la portion radiculaire (la pulpe canalaire). La chambre pulpaire reproduit la morphologie externe de la couronne, carrée ou rectangulaire pour les dents monocuspidées, avec des extensions en forme de cornes sous les cuspidés pour les dents pluricuspidées. Les canaux de la racine se terminent dans le foramen apical, où la pulpe et le ligament parodontal se rencontrent et par où les principaux nerfs et vaisseaux entrent et sortent de la dent (Takuma et Nagai, 1971).

La pulpe est richement innervée et vascularisée. Elle assure pour la totalité de l'organe dentaire les fonctions de sensibilité, nutrition, défense et cicatrisation. Les principales cellules de la pulpe sont décrites en couches centripètes :

- les odontoblastes qui élaborent les composants matriciels de la dentine,
- les cellules sous odontoblastique (cellules de Hoehl), ayant entre autres une activité dentinogénétique en condition réactionnelle ;
- les autres groupes cellulaires : les fibrocytes, les cellules mésenchymateuses indifférenciées, les histiocytes, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules dendritiques (Jontell *et al.*, 1998) et plus récemment des cellules progénitrices, appelées Dental Pulp Stem cells (DPSC) décrites par Gronthos et collaborateurs en 2000.

2 STRUCTURE, COMPOSITION ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES TISSUS DENTAIRE MINERALISES

La part minérale des tissus dentaires est composée exclusivement d'hydroxyapatite biologique polysubstituée. L'hydroxyapatite (HA) est une structure cristalline hexagonale (Figure 12) suivant la formule $(Ca_5(PO_4)_3(OH))_2$ pour les HA stœchiométriques soit un cristal calcium-phosphate (ou apatite) hydroxylé.

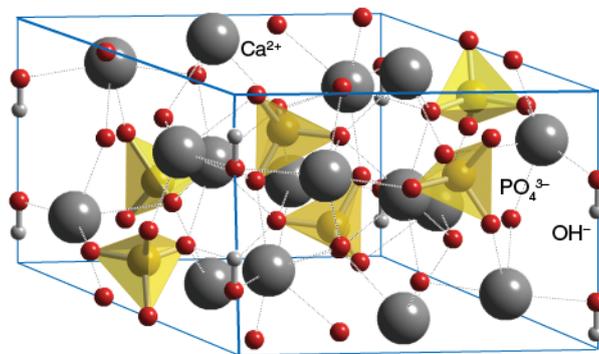


Figure 12 : Structure cristalline de l'hydroxyapatite (Weller et al. 2014)

2.1 Email

2.1.1 Structure de l'émail

L'émail est le seul tissu minéralisé d'origine épithéliale, ce sont les améloblastes qui sont responsables de la sécrétion de sa matrice organique. L'émail est par définition une structure et non un tissu car il ne contient pas de cellules (acellulaire), pas de vaisseaux (avasculaire) et pas d'innervation. A la fin de l'amélogenèse, les améloblastes perdent leur activité sécrétoire et leur prolongement, déposent une dernière couche d'émail (la couche aprismatique), et ils disparaissent après l'éruption dentaire (Bartlett *et al.* 2006). L'émail recouvre la totalité de la couronne et ne se renouvelle plus après la formation de cette dernière. Pour compenser cette limitation, l'émail a acquis une organisation structurale complexe et un haut degré de minéralisation, rendu possible par l'absence quasi-totale de matrice organique dans son état mature. L'émail prismatique est formé par des cristaux d'hydroxyapatite, groupés sous forme de « rods » (prismes) et « interrods » (substance interprismatique) d'émail

(Arends et Jongebloed, 1979) (Figure 13).

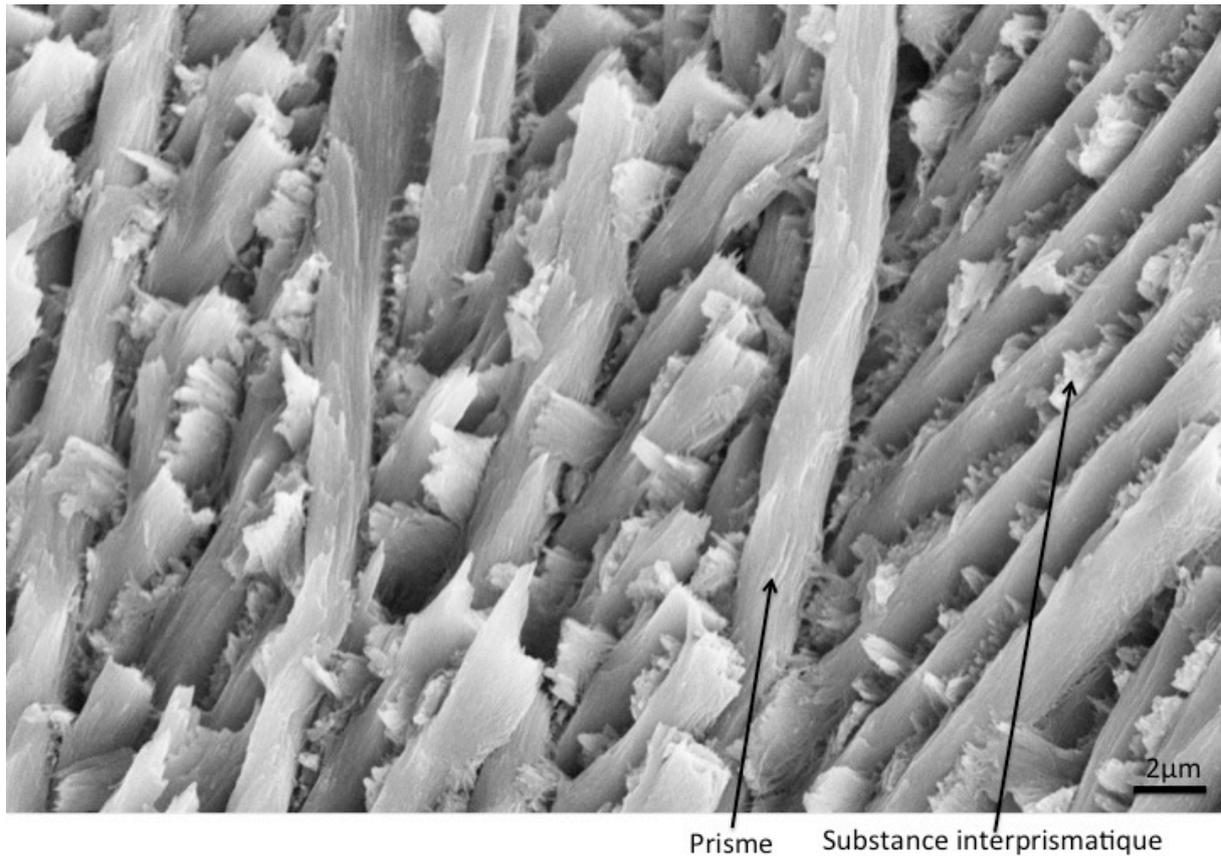


Figure 13 : Structure de l'émail prismatique par microscopie électronique à balayage (grossissement 3000 fois) chez une souris sauvage de 1 mois (Laure Merametdjian)

Les prismes sont organisés en faisceaux. Ils ont un trajet sinueux et obliques dans les 2/3 internes de l'émail. Dans le 1/3 externe, ils sont rectilignes, parallèles ou perpendiculaires à la surface de la dent. Cette organisation des prismes permet d'optimiser les propriétés mécaniques de l'émail.

Le rythme de l'amélogénèse est de 4 µm d'émail par jour (chez l'Homme) avec une phase de synthèse active et une phase de repos pendant laquelle il y a un peu moins d'émail sécrété. Ces phases de repos de l'amélogénèse sont marquées par une bande noire régulière visible sur une coupe d'émail observée en microscopie photonique et par une constriction du prisme en microscopie électronique à balayage. Ces striations (stries de Retzius, ligne néonatale, périkymaties de surface) et ces strictions marquent le rythme circadien de l'amélogénèse (Zheng *et al.* 2013).

2.1.2 Composition et caractéristiques physico chimiques de l'émail

L'émail mature est la structure la plus minéralisée du corps avec 96% de matière minérale (en poids de matière sèche, ou 89% en volume) (William et Elliott, 1989 ; Berkovitz *et al.*, 2002) constituée de très petits cristaux d'hydroxyapatite, 4% de matière organique et d'eau. Elle ne présente pas de charpente collagénique, ce qui la distingue de tous les autres tissus minéralisés (os, dentine, ciment dentaire) (Margolis *et al.* 2006)

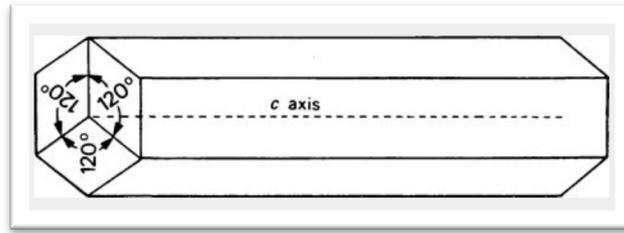


Figure 14. Représentation schématique du cristal d'émail

L'unité élémentaire de l'émail est le cristal d'hydroxyapatite en forme de ruban de section hexagonale, qui fait 60-70 nm de largeur, 25-30 nm d'épaisseur et dont la longueur selon l'axe C (Figure 14) peut dépasser 1 mm (Moradian-Oldak 2012), certains chercheurs suggèrent même que le ruban d'émail pourrait être unique sur toute l'épaisseur de l'émail.

L'ion OH^- de l'hydroxy apatite est fréquemment substitué dans le cas des apatites biologiques non stœchiométriques présentes dans les tissus minéralisés tels que l'émail, la dentine et l'os. Des ions carbonates (CO_3^{2-}), ou d'autres ions tels que le strontium, le magnésium, le plomb ou le fluor (le Ca^{2+} par Sr^{2+} et le PO_4^{3-} par du CO_3^{2-} ou du F^-), sont capables de s'incorporer dans les cristaux d'apatite, s'ils sont présents pendant leur formation. Ces incorporations d'éléments étrangers affectent la formation et les propriétés physico-chimiques de l'hydroxyapatite (Boskey 2003). La substitution la plus importante en masse est celle des ions carbonates, très importante dans l'os (jusqu'à 8 % en masse), alors qu'elle est moindre dans l'émail (de l'ordre de 3 % massique). Le faible taux de substitution au sein de l'émail comparé à celui important au sein de l'os a plusieurs répercussions connues sur l'apatite amélaire, comme celle d'augmenter la solubilité ou encore de diminuer la taille des cristaux (Posner 1985). Une telle composition est en accord avec le ratio Ca/P moyen des apatites osseuses mesuré dans la littérature (1,5 selon Brown, 1966), valeurs sensiblement inférieures à celle de 1,67 d'une apatite stœchiométrique (Posner 1985), alors que le ratio Ca/P moyen de l'émail en est plus proche (1,62 selon Eanes, 1979). Ce ratio Ca/P est variable selon la zone étudiée et selon l'âge (il augmente avec l'âge – Pellegrino et Blitz, 1968).

Les cristaux d'HA de l'émail sont environ 1000 fois plus longs que ceux retrouvés dans l'os. Les cristaux d'HA de l'émail ne sont pas formés sur une matrice collagénique et présentent moins d'impuretés que ceux trouvés dans l'os, le ciment ou la dentine (Bonar *et al.* 1991). Chaque prisme d'émail a environ le même diamètre qu'un améloblaste et semblerait être le produit d'une seule cellule (Moradian-Oldak 2012).

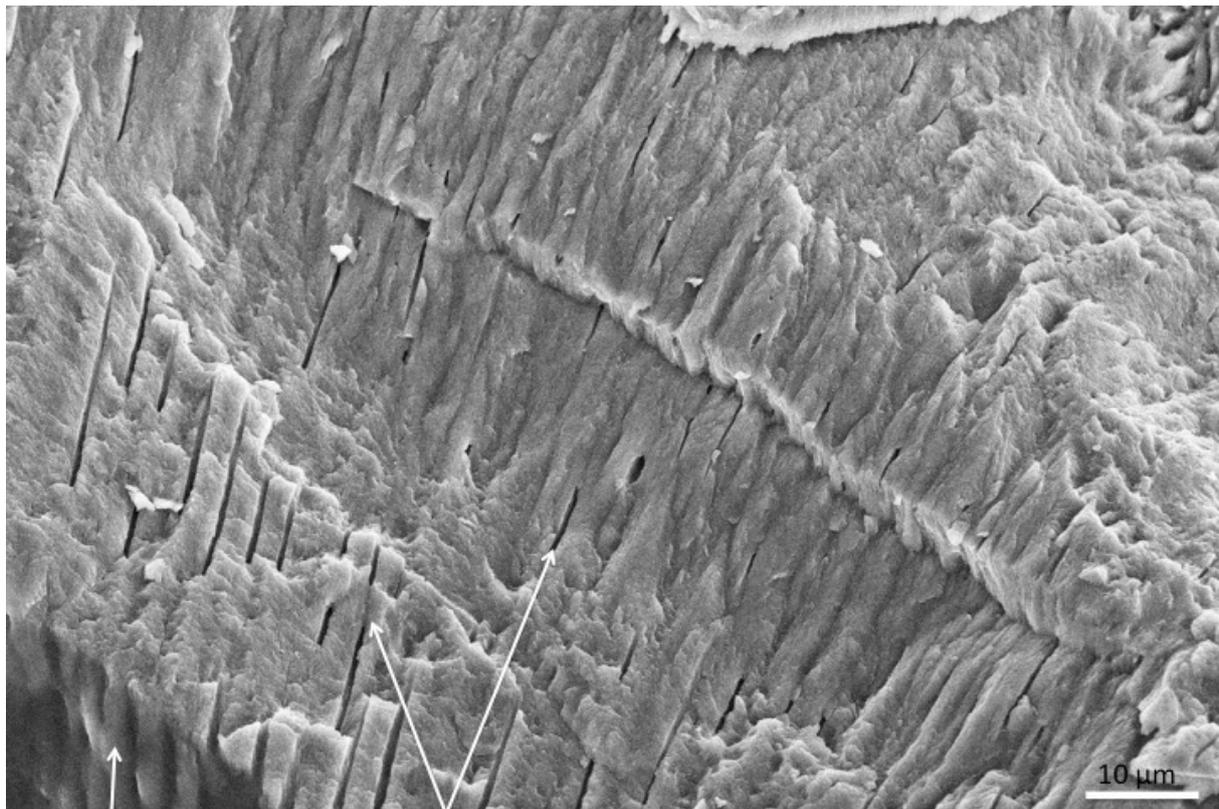
Lors de l'amélogénèse, la majeure partie de la matrice organique de l'émail est dégradée et réabsorbée par les améloblastes au stade de maturation (Fincham *et al.*, 1999). Rappelons qu'à la différence des autres tissus durs dentaires, l'émail est un tissu acellulaire. Ces caractéristiques font de l'émail le tissu le plus dur de tout l'organisme, capable de supporter les forces masticatoires tout en diminuant le taux d'attrition dentaire (Berkovitz *et al.*, 2002). Seul, l'émail est pourtant cassant et a une faible résistance à la traction ; combiné à une couche plus souple et moins minéralisée, soit la dentine sous jacente, le risque de fracture est diminué (Berkovitz *et al.* 2002).

Le degré de minéralisation de l'émail diminue de la surface externe de la couronne dentaire et en direction de la jonction émail-dentine (JED). Cette jonction émail-dentine est établie dès que ces deux tissus commencent à se former. Avant que l'émail ne se forme, quelques processus odontoblastiques s'étendent jusque dans la couche des améloblastes, et, une fois que l'émail a commencé à se former, ces processus se retrouvent emprisonnés (tiges d'émail). La jonction émail-dentine est constituée de plusieurs séries de crêtes (ridges), ce qui augmente probablement la cohésion entre la dentine et l'émail (Kerebel *et al.*, 1979). Ces crêtes sont plus prononcées dans la région coronale de la dentine où le stress mécanique occlusal est le plus élevé. La forme et la nature de la jonction empêchent les fractures de l'émail pendant la fonction dentaire.

2.2 Dentine

2.2.1 Structure de la dentine

La dentine est la portion minéralisée du complexe pulpo-dentinaire, elle est plus dure que l'os et plus souple que l'émail. C'est un tissu traversé par les tubules (Figure 15) contenant les prolongements cytoplasmiques provenant des odontoblastes.



Front de minéralisation Tubuli

Figure 15 : Structure de la dentine par microscopie électronique à balayage (grossissement 2500 fois) chez une souris sauvage de 1 mois (Laure Merametdjian). Les trajets des prolongements cytoplasmiques (tubuli) sont bien visibles sur cette image issue d'une cryofracture.

Les corps cellulaires des odontoblastes sont alignés contre la couche de prédentine, où ils forment la limite avec le reste de la pulpe (Sigal *et al.* 1984). De manière centrifuge, on trouve la prédentine, la dentine circum pulpaire (ou orthodentine), le manteau dentinaire. Il peut exister également une dentine tertiaire, dite réactionnelle (Figure 16).

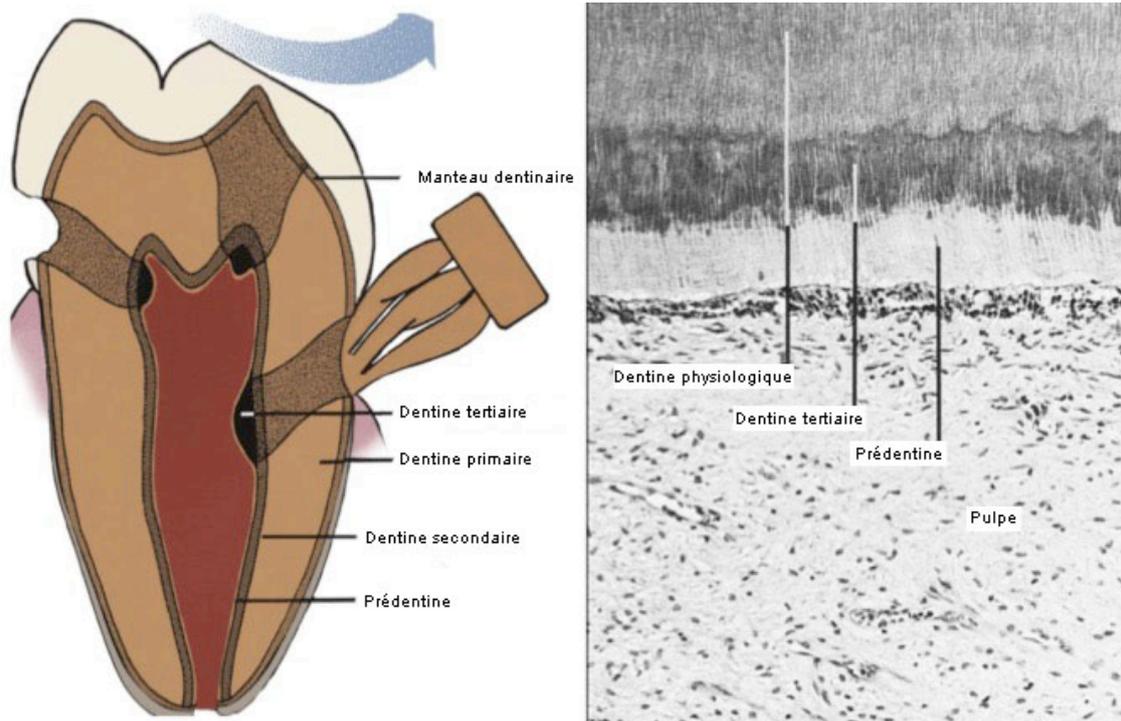


Figure 16. Terminologie et distribution des différents types de dentine. Traduit de Ten Cate, Oral Histology 6^{ème} édition.

2.2.1.1 Structure de la dentine : Prédentine

La prédentine est la matrice non minéralisée tout juste formée par les odontoblastes. La dentine est constituée principalement par du collagène et des protéines non collagéniques. L'épaisseur de la prédentine varie de 10 à 50 μ m (chez l'Homme) selon sa localisation et selon l'âge de l'individu mais son épaisseur à un point donné est constante car la quantité de dentine calcifiée est égale par addition à la matrice non minéralisée nouvellement synthétisée. L'interface entre la prédentine, non minéralisée, et la dentine, minéralisée, est appelée front de minéralisation. La prédentine est similaire à l'ostéoïde pour l'os.

2.2.1.2 Structure de la dentine : Dentine primaire

La dentine primaire est formée pendant le développement de la couronne dentaire et jusqu'à la fin de l'apexogénèse (Goldberg et Smith, 2004) selon un rythme circadien, comme l'émail. La dentine limite les contours de la chambre pulpaire et de la pulpe canalaire. Au niveau coronaire la couche la plus externe s'appelle le manteau dentinaire (ou dentine primordiale) ; elle est formée par les premiers odontoblastes différenciés qui n'ont pas encore développé leurs processus odontoblastiques et sont tout juste polarisés. La dentine primordiale est une fine couche (7 à 30 μ m chez l'Homme), située au niveau de la jonction émail-dentine, elle ne contient pas de tubuli. Cette couche contient des fibres de collagène

essentiellement de type 1. La minéralisation de cette couche est quasi instantanée, elle est moins minéralisée (-4%) que le reste de la dentine circumpulpaire, ce qui lui confère des propriétés plus élastiques permettant un rôle mécanique d'amortisseur. Elle permet d'établir le « patron » de l'organe dentaire et est formée rapidement (4µm par jour chez l'Homme). La dentine primaire est déposée par des odontoblastes totalement différenciés et matures, qui sécrètent une matrice plus riche en lipides, phospholipides et phosphorines (Linde et Goldberg, 1993). De plus, à cette étape, les capillaires migrent entre les odontoblastes permettant ainsi d'augmenter les échanges. A la fin de la dentinogenèse, les capillaires se retirent. La dentine primaire est formée jusqu'à la fin de l'apexogénèse. Au niveau radiculaire, le manteau dentinaire se prolonge par la couche hyaline de Hopewell-Smith, jouxtant le ciment (Goldberg *et al.* 2012). Les marques de fluctuation périodique de la minéralisation de la dentine sont appelées lignes de Von Ebne.

2.2.1.3 *Structure de la dentine : Dentine secondaire*

La dentine secondaire est formée après que l'édification radiculaire soit terminée et ce, toute la vie durant, de façon physiologique. Elle est moins minéralisée que la dentine primaire. Elle est également déposée par les odontoblastes, mais de manière lente (0,4µm/jour chez l'Homme) et continue. Cette dentine a une structure tubulaire en continuité avec celle de la dentine primaire mais les tubuli changent d'axe à la jonction dentine primaire-secondaire. La dentine secondaire n'est pas déposée de la même manière tout autour de la chambre pulpaire. La plus grande déposition de dentine secondaire se fait au niveau du plancher de la chambre pulpaire, ce qui amène à une réduction asymétrique de la taille et de la forme de la pulpe. Les tubuli de la dentine secondaire se sclérosent avec le temps, plus facilement que les tubuli de la dentine primaire. Ce processus tend à réduire la perméabilité de la dentine, ce qui protège la pulpe (Linde et Goldberg, 1993).

La composition chimique et la structure histologique des dentines primaire et secondaire sont identiques et donc le passage de l'une à l'autre n'est pas matérialisable (Goldberg et Smith 2004), hormis le changement d'axe des tubuli. Entre le manteau dentinaire et la prédentine, la zone la plus large de la dentine est appelée dentine circumpulpaire. Elle est subdivisée en dentine inter-tubulaire et péri-tubulaire. La dentine inter-tubulaire est la dentine située entre les tubuli dentinaires tandis que la dentine péri-tubulaire est la dentine délimitant les parois des tubuli dentinaires. L'épaisseur de cette dernière varie entre 0,5 et 1,5 µm chez l'Homme. Elle est hyperminéralisée du fait de

l'absence de trame collagénique et d'une structure cristalline différente de celle de la dentine intertubulaire, plus riche en magnésium et en carbonate.

2.2.1.4 *Structure de la dentine : Dentine tertiaire*

La dentine tertiaire est produite en réponse à divers stimuli ou agressions, comme l'attrition, les caries, l'érosion etc. La dentine tertiaire est produite seulement par les cellules directement atteintes par les stimuli, elle est donc produite localement et en regard du site d'agression. La qualité et la quantité de cette dentine est en relation avec la réponse cellulaire initiée par les stimuli, qui dépend de la durée et de l'intensité de ces derniers.

La dentine tertiaire peut avoir des tubuli en continuité avec ceux de la dentine secondaire, mais ils seront mal organisés, et non fonctionnels. Cette dentine est déposée beaucoup plus rapidement que les autres dentines (Magloire *et al.* 2001).

Selon l'intensité de l'agression, la dentine tertiaire sera réactionnelle ou réparatrice et sera produite par des types cellulaires différents. En cas d'agression iatrogène de faible intensité, sans destruction des odontoblastes, ces cellules peuvent sécréter de la dentine réactionnelle à un rythme de 8 $\mu\text{m}/\text{jour}$ chez l'Homme. Cette matrice dentinaire peut aussi être sécrétée par des odontoblastes réactivés issus de la couche sous odontoblastique de Hoehl. Sa morphologie diffère de la dentine primaire et secondaire car elle est peu ou pas tubulaire du fait du rythme très rapide de sécrétion (Goldberg et Smith 2004). En cas d'agression de forte intensité, les couches cellulaires odontoblastique et sub odontoblastiques sont altérées. Si la lésion n'entraîne pas de destruction rapide du tissu pulpaire, celui-ci peut réagir par la mise en place d'une barrière dentinaire, appelée dentine de réparation. La présence de cellules souches multipotentes au sein de la pulpe permet de fournir des cellules qui vont se différencier en cellules « odontoblast-like » pour remplacer les cellules détruites et générer ce pont dentinaire au même rythme que la dentine primaire. Cependant, les cellules ainsi que les processus de différenciation qui conduisent à la formation de cette dentine de réparation ne sont pas encore clairement identifiés (Farges *et al.* 2015), néanmoins il semblerait que l'inflammation pulpaire résultant de la lésion joue un rôle primordial dans ce phénomène (Goldberg *et al.* 2015).

2.2.2 Composition et caractéristiques physico chimiques de la dentine

La dentine mature est composée de 70% de matière inorganique (hydroxyapatite), de 20% de matière organique (30% de collagène de type I, III et V avec des inclusions de lipides

et de protéines de la matrice non collagénique) et de 10% d'eau (Goldberg et Septier, 1996). En cela, elle présente de nombreuses similitudes avec l'os. Elle est moins minéralisée que l'émail (96% de minéral en poids), mais plus que l'os ou le ciment (environ 65% de minéral en poids). La dentine tertiaire est plus minéralisée que les dentines « physiologiques » (Magloire *et al.* 2001). La composition globale de la dentine est détaillée dans le tableau 1. Sa phase organique est majoritairement constituée de collagène de type I (90%) et de protéines non collagéniques (10%), dont notamment les SIBLING, des protéoglycanes, des protéines non phosphorylées (MGP, OCN) et des facteurs de croissance (Kawashima et Okiji, 2016). Certains de ces composants participent activement au processus de minéralisation. Contrairement au tissu osseux, la dentine est un tissu non vascularisé, qui ne subit pas de phénomène de remodelage, et qui par conséquent n'intervient pas dans l'homéostasie phosphocalcique.

Tableau 1 : Composition globale de la dentine, tableau adapté de Goldberg *et al.*, 2012

Phase minérale	70% en poids	40-45% en volume
Matrice organique	20% en poids	30% en volume
Eau	10% en poids	20-25% en volume

Les cristaux de la dentine, comme ceux de l'os et du ciment, sont déposés de manière ordonnée sur une trame collagénique. Cette apatite cristallise selon une maille hexagonale. Ce sont les cristaux biogéniques les plus petits connus (ils font 2–6 nm d'épaisseur, 30–50 nm de largeur et 60–100 nm de longueur) (Landis *et al.* 1996).

2.3 Cément

2.3.1 Structure du ciment

C'est un tissu minéralisé avasculaire qui recouvre la dentine radiculaire et qui ne subit pas de phénomène de remodelage en condition physiologique à la différence du tissu osseux. Il existe deux formes de ciments qui ont des caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes. Le ciment acellulaire (Figure 17), qui attache le ligament parodontal à la racine dentaire et le ciment cellulaire qui a un rôle d'adaptation en réponse aux mouvements et à l'usure de la dent (Diekwisch, 2001).

Tableau II. Type, distribution et fonction du cément. Traduite de Ten Cate Oral Histology, 6^{ème} édition

TYPE	ORIGINE DES FIBRES	LOCALISATION	FONCTION
Acellulaire (primaire)	Extrinsèques (et initialement des fibres intrinsèques)	De la limite cervicale au tiers apical	Ancrage
Cellulaire (secondaire)	Intrinsèques	De la moitié au tiers apical et dans les furcations	Adaptation et réparation
Hétérogène (couches alternées de cément acellulaire)	Intrinsèques et extrinsèques	Portion apicale et furcations	Adaptation
Acellulaire afibrillaire	-	Eperons et plaques sur l'émail et la dentine au niveau de la jonction émail-cément	Pas de fonction connue

Le cément se classifie en fonction de trois facteurs :

- le temps de formation (primaire ou secondaire)
- la présence ou l'absence de cellules (acellulaire ou cellulaire)
- l'origine des fibres de collagène de la matrice : les fibres intrinsèques résultent des cémentoblastes, alors que les fibres extrinsèques résultent de l'incorporation des fibres du ligament parodontal sécrétées par les fibroblastes. Le cément acellulaire comprend des fibres de collagène de type I synthétisées par des fibroblastes (fibres extrinsèques dites de Sharpey). Ces fibres sont partiellement minéralisées et orientées selon le grand axe de la racine et elles contribuent à l'attache dento-alvéolaire. Le cément cellulaire comprenant des fibres de collagène de type I synthétisées par les cémentoblastes, entièrement minéralisées, et non orientées.

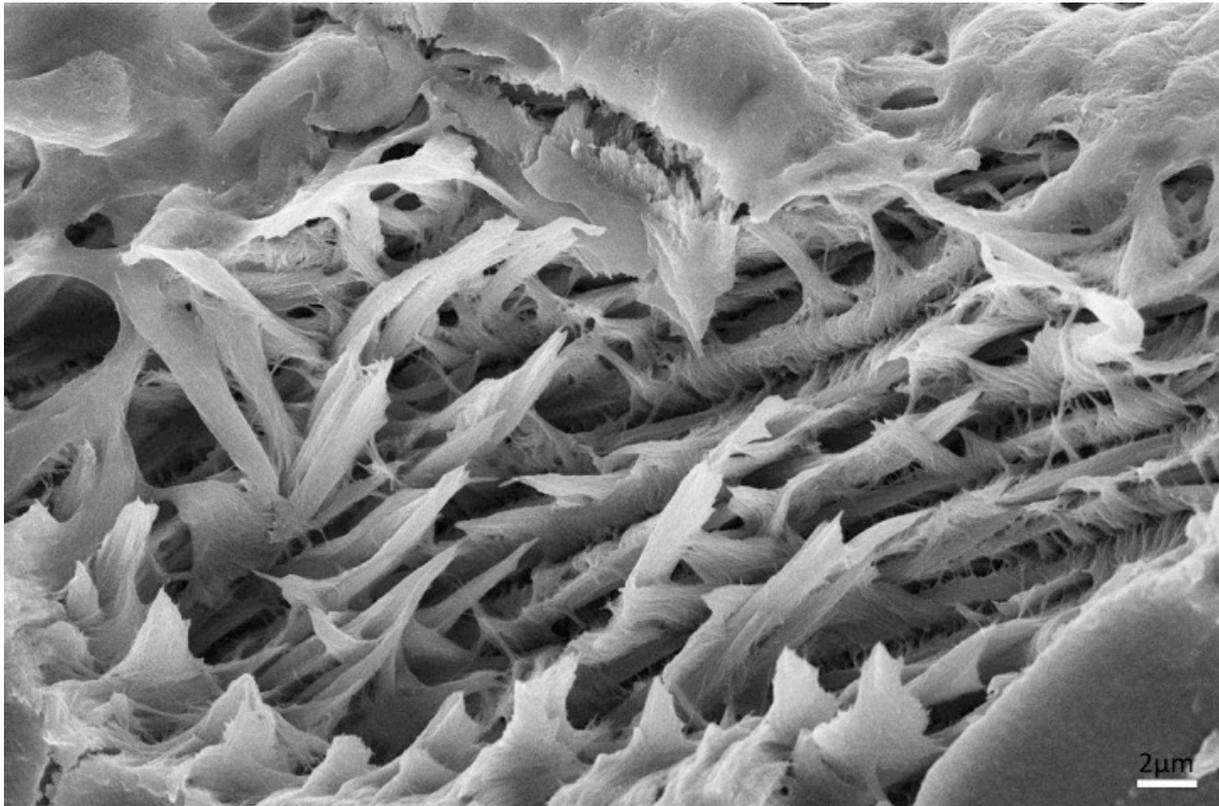


Figure 17 : Structure du ciment fibrillaire au niveau de la jonction émail ciment par microscopie électronique à balayage (grossissement 2500 fois) chez une souris sauvage de 1 mois (Laure Merametdjian)

2.3.2 Composition et caractéristiques physico chimiques du ciment

Le ciment est le tissu le moins minéralisé de l'organe dentaire. Le ciment contient en volume 45 à 50% de phase minérale, 33% de phase organique et 22% d'eau (Ten Cate Oral Histology).

Les cristaux d'hydroxyapatite sont fins en forme de plaque, tout comme ceux de l'os. Ces cristaux ont environ une largeur de 55nm et une épaisseur de 8 nm (leur longueur n'a pas pu être déterminée pour des raisons de quantité de matériel à étudier) chez l'Homme. Comme pour l'émail la concentration des éléments trace a tendance à être plus importante à la surface externe. Le ciment est le tissu minéralisé contenant la plus grande concentration en fluor dans son hydroxyapatite substituée.

La phase organique est composée en majorité de collagène. Ce collagène est à 90% de type I. Les éléments non collagéniques du ciment sont supposés être similaires à ceux de l'os mais étant donné la difficulté à obtenir des quantités suffisantes de matériel, peu d'informations existent sur ce point. Néanmoins, parmi les molécules importantes et présentes

au sein du ciment, nous retrouvons la Bone SialoProtein (BSP), l'Ostéopontine (OPN) et probablement quelques éléments spécifiques au ciment qui seraient impliqués dans le réattachement parodontal et/ou la reminéralisation, comme la cementum protein-1 (Arzate *et al.* 2015).

2.4 Os alvéolaire

2.4.1 Structure de l'os alvéolaire

Il est constitué d'une corticale externe, recouverte d'une couche fibreuse adhérente à la gencive, d'une corticale interne et d'os médullaire en profondeur, qui est moins calcifié, moins dur et plus vascularisé que l'os cortical. Il repose sur l'os basal mandibulaire ou maxillaire. La corticale externe est constituée de systèmes de Havers, tandis que la corticale interne (également appelée lamina dura ou lamina cryptée), est constituée d'une portion d'os lamellaire et d'os fibreux qui doit sa structure au fait que les principales fibres du ligament alvéolo-dentaire s'y insèrent. Du fait du remaniement constant de l'os alvéolaire, la couche corticale primitivement constituée par du tissu osseux lamellaire est remplacée par de l'os haversien, et présente donc une structure complexe.

Les septa inter-dentaires et inter-radiculaires sont constitués d'os trabéculaire, renfermant des canaux nutritifs perforants de Hirschfeld et Zukerkandl.

La corticale interne présente une organisation structurelle et une composition semblable au ciment acellulaire (McCulloch *et al.* 2000), où l'ostéopontine semble guider la minéralisation localement de manière à ce que l'attache entre l'os et le ligament alvéolo-dentaire se fasse de manière optimale (McKee *et al.* 2013).

2.4.2 Composition et caractéristiques physico-chimiques de l'os alvéolaire

L'os alvéolaire présente une composition organique et inorganique similaires à tout os de l'organisme, à savoir en poids 67% de minéraux, 33% de trame organique (28% de collagène de type I et 5% de protéines non collagéniques).

La part minérale est composée principalement de cristaux de phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite, tandis qu'une fraction se trouve sous forme amorphe, ou sous différentes formes cristallines notamment du phosphate tricalcique. Il existe d'autres éléments tels que le carbonate de calcium, phosphate de magnésium, sodium et certains éléments sous forme de traces tels le zinc et fer (Landis *et al.* 1996). La morphologie des cristaux d'apatite

osseuse, observée au microscope électronique à balayage révèle une petite plaque de forme irrégulière et de taille nanométrique. Cette morphologie diffère de celles qui peuvent être observées par synthèse *in vitro*, qui conduisent généralement à une morphologie sous forme d'aiguilles ou de bâtonnets (Pasteris *et al.* 2008). La plupart de ces plaquettes d'hydroxyapatite sont logées dans les interstices de la trame collagénique.

Tableau III. Comparaison des caractéristiques principales des tissus minéralisés (adaptée de Ten Cate Oral Histology)

		EMAIL	DENTINE	CEMENT	OS
Matrice	Protéines structurelles	Amélogénines (9 isoformes)	Collagène (type I majoritaire)		
	Protéines autres	Non-amélogénines : améloblastine, énameline, tufteline, protéines sulfatées	Non- collagéniques : DSP, DMP1, BSP, OPN, ostéocalcine, ostéonectine, MEPE	Non- collagéniques : BSP, OPN, ostéocalcine, ostéonectine	Non- collagéniques : BSP, OPN, ostéocalcine, ostéonectine, DMP1, DSPP, MEPE
	Protéases matricielles	MMP20, EMSPI	Collagénases etc		
Minéral	Hydroxy-apatite	>90% en long rubans	67% sous forme de plaquettes	45 à 50% sous forme de plaquettes	50 à 60% sous forme de plaquettes
	Localisation	Entre les nanosphères d'amélogénines	Entre ou autour des fibrilles de collagène		
Cellules minéralisantes		Améloblastes (durée de vie limitée/ disparition lors de l'éruption)	Odontoblastes	Cémentoblastes	Ostéoblastes
Cellules résorbantes		Non concerné	Odontoclastes	Odonto/ cémentoclastes	Ostéoclastes

3 MECANISMES DE BIOMINERALISATION DES TISSUS DENTAIRE

3.1 Mécanismes généraux de biominéralisation : connaissances actuelles

La biominéralisation est un phénomène extrêmement répandu; les six règnes taxonomiques contiennent des membres qui sont capables de former des sels minéraux, et plus de 60 minéraux différents ont été identifiés dans les organismes. Deux grands types de processus de minéralisation par le vivant ont initialement été proposés : la biominéralisation dite induite, qui regrouperait des formes passives de biominéralisation ne nécessitant pas de machinerie biologique dédiée, et la biominéralisation contrôlée, quand des gènes, des cellules et des processus spécialisés sont nécessaires pour produire et contrôler la production organisée de couches de cristaux au sein d'une matrice extracellulaire organique. Nous nous intéresserons uniquement à la biominéralisation contrôlée dans notre exposé, c'est à dire celle ayant été démontrée chez les mammifères et nous laisserons de côté la biominéralisation passive, dont l'existence n'est pas démontrée et qui reste biologiquement peu plausible. La biominéralisation peut être physiologique (odontogénèse, ostéogénèse) ou pathologique (calcifications rénales, pulmonaires, vasculaires ou pulpaires). L'un des objectifs majeurs des études portant sur la biominéralisation osseuse physiologique est de comprendre comment se déroule le dépôt du minéral (ou calcification) au sein de la matrice extracellulaire; alors que dans le même temps, aucun minéral ne se dépose au sein des tissus non-minéralisés. Cette question se pose à juste titre car les tissus minéralisés (os, dentine, émail...) et les tissus non-minéralisés (le tissu pulmonaire par exemple) sont tous baignés par un fluide extracellulaire similaire (Glimcher, 1990), contenant la quantité suffisante et nécessaire pour élaborer des cristaux d'hydroxyapatite (Nancollas *et al.* 1989). Cette différence entre tissus mous et tissus durs se réalise par des mécanismes d'inhibition de la biominéralisation pour les uns et des mécanismes de promotion pour les autres, qui seront détaillés ci après.

La base de la biominéralisation, qu'elle soit physiologique ou pathologique, repose sur l'assemblage de macromolécules et de phases minérales en formation. Les macromolécules jouent un rôle considérable dans ces processus en contrôlant notamment la formation des phases minérale, la forme des particules minérales et leur organisation (Beniash *et al.* 2005). Les deux phases organiques et minérales sont étroitement intriquées l'une dans l'autre au niveau moléculaire, rendant leur séparation en terme de structure ou de fonction quasi impossible. Ces macromolécules sont donc extrêmement importantes pour le maintien des propriétés mécaniques des tissus minéralisés (Baldassarri *et al.* 2008). Les mécanismes

exacts impliqués dans la formation des cristaux d'hydroxyapatite dans les tissus durs des vertébrés, et particulièrement le processus qui précède la propagation du minéral sur la matrice extracellulaire, restent mal connus et controversés. Ceci peut être expliqué d'une part par la taille, de l'ordre du nanomètre, des cristaux d'apatite (bien qu'aujourd'hui les techniques d'exploration aient beaucoup évoluées), d'autre part, par le fait que lors de sa croissance le minéral est imbriqué de manière très intime du début à la fin du processus avec la matrice organique, ce qui complique fortement son observation et donc l'étude de sa formation et de son organisation tridimensionnelle. D'autre part, aucun modèle *in vitro* ne sait à ce jour reproduire ces processus dans leur complexité. Enfin, le tissu osseux, le tissu minéralisé le plus décrit, est soumis à un processus de remodelage physiologique, contrairement à la dentine ou à l'émail. En conséquence, dans l'os, les propriétés physico-chimiques du minéral sont hétérogènes dans le temps et l'espace (Glimcher 1987).

Le sérum sanguin contient des concentrations de calcium (calcémie normale chez l'homme entre 2,2 et 2,6 mmol/L) et de phosphate (phosphatémie normale chez l'homme 0,89 à 1,44 mmol/L) susceptibles de fournir les ions nécessaires aux processus de biominéralisation, soit la condition *sine qua non* de la biominéralisation. Cependant, les voies par lesquelles ces ions sont transportés du sérum vers les sites de minéralisation au sein de la matrice extracellulaire, ainsi que l'implication précise des cellules dans ces processus de minéralisation ne sont pas clairement définies.

Plusieurs mécanismes de minéralisation de la matrice organique extracellulaire par les cristaux d'hydroxyapatite ont été proposés pour les tissus minéralisés précédemment cités (Figure 18):

- une initiation impliquant des vésicules matricielles (mécanisme cellule-dépendant)
- la déposition de précurseurs phosphocalciques amorphes (processus dépendant des mitochondries)
- une croissance cristalline impliquant des protéines non collagéniques chargées (mécanisme cellule-indépendant)

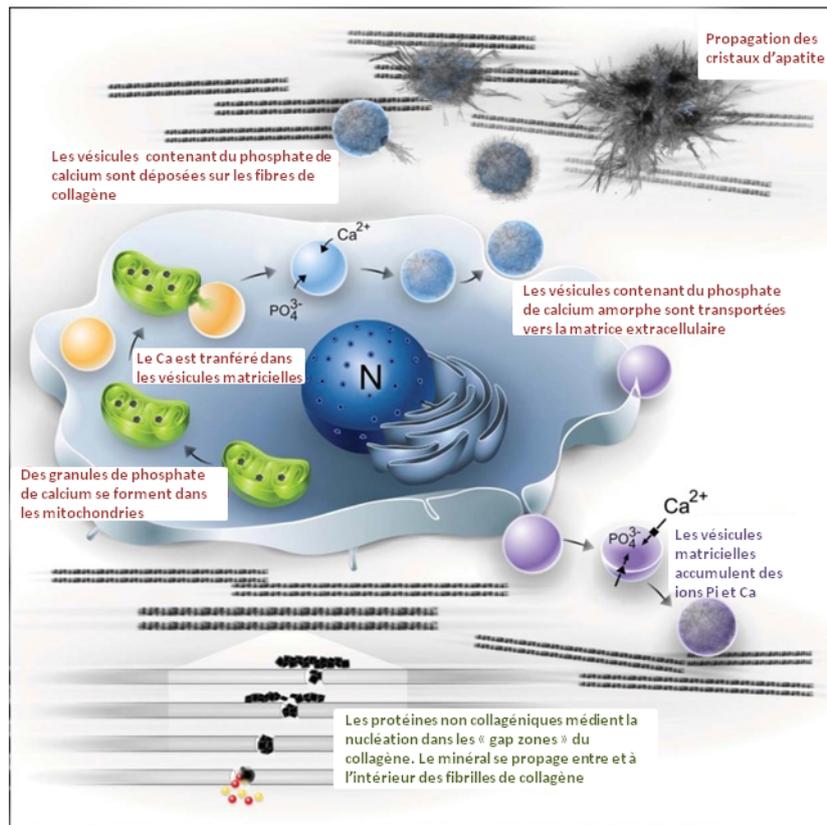


Figure 18 : Les différents processus de biominéralisation actuellement établis. Traduit de Boonrungsiman *et al.* 2012

3.1.1 Biominéralisation impliquant les vésicules matricielles

En 1969, une étude a mis pour la première fois en évidence la présence de cristaux d'apatite et une forte expression de la phosphatase alcaline tissulaire non spécifique (TNAP) dans les vésicules matricielles (Anderson *et al.* 2004). Les vésicules matricielles sont des structures membranaires de forme sphérique d'environ 50 à 200 nm de diamètre, générées par invagination de la membrane de certaines cellules minéralisantes (odontoblastes, chondrocytes hypertrophiques, ostéoblastes, cellules vasculaires musculaires lisses), formant un sous-ensemble de la famille des vésicules extracellulaires (Anderson, 1969; Anderson *et al.*, 2005; Wuthier et Lipscomb, 2011). La phosphatase PHOSPHO1 localisée dans la lumière des vésicules matricielles, génère du phosphate inorganique (Pi) par hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) et de la phosphatidyléthanolamine (PEA) dérivant des phospholipides membranaires (Roberts *et al.*, 2004). Le calcium entrant *via* les annexines, et le Pi généré dans la vésicules matricielles par PHOSPHO1, sont concentrés dans l'espace réduit de la vésicules matricielles engendrant par réaction physicochimique la nucléation d'un cristal phospho-calcique. Un intermédiaire, l'octacalcium phosphate est créé avant de se

transformer en hydroxyapatite qui est moins soluble et qui est ensuite stabilisé grâce à l'action de l'anhydrase carbonique (Cui *et al.* 2016). À ce mécanisme serait ajouté l'entrée de Pi extracellulaire qui proviendrait du pyrophosphate (PPi), généré par NPP1 à partir de nucléotides phosphate et clivé en Pi par la TNAP (Figure 18) et d'autre part la phosphatase alcaline et la NPP-1, qui hydrolysent de l'ATD, ADP ou du PPi et permettraient la génération de Pi à l'extérieur des vésicules, tout en diminuant en parallèle la concentration de PPi. Outre la question de l'identité d'un éventuel transporteur de Pi dans les vésicules matricielles, il est aussi intéressant de s'interroger sur le rôle du Pi extracellulaire dans le mécanisme de formation des cristaux d'apatite médié par les vésicules matricielles (Figure 18). Selon ce schéma, et les hypothèses en cours dans la littérature, le pyrophosphate, composé de deux molécules de phosphate, sert en effet de « source » de Pi extracellulaire, nécessaire à la formation des cristaux dans les vésicules matricielles. Cependant, au vu des concentrations de PPi existantes et des quantités de Pi requises, il est plus raisonnable de considérer le PPi dans son rôle de puissant inhibiteur de la formation de cristaux phosphocalciques, plutôt que d'une source essentielle de Pi. Ce rôle est connu depuis longtemps et s'évalue plus particulièrement en prenant en compte le ratio Pi/PPi, un déterminant majeur de la minéralisation du squelette (Terkeltaub, 2001). Les conditions optimales pour la formation de cristaux d'hydroxyapatite apparaissent lorsque le ratio Pi/PPi est supérieur à 140 (Buchet *et al.* 2013; Thouverey *et al.* 2009).

Le modèle mécanistique de minéralisation dépendante des vésicules matricielles, présent dans des dizaines de publications, indique que le transporteur permettant l'entrée du Pi dans les vésicules matricielles est le transporteur Slc20a1. Si cette hypothèse dérive du fait que Slc20a1 (et Slc20a2) sont exprimés à la membrane des cellules minéralisantes, il est toutefois important de noter qu'aucune étude n'a formellement décrit l'identité de ce (ou ces) transporteur(s) dans les vésicules matricielles. Afin de tester la possibilité que Slc20a1 puisse représenter ce transporteur, notre laboratoire en collaboration avec celui de José Luis Millan à Stanford, a croisé des souris *Phospho1^{lox/lox}* avec des souris *Slc20a1^{lox/lox}*. Les résultats ont indiqué que la délétion *in vivo* de *Slc20a1* et *Phospho1* dans les chondrocytes par l'intermédiaire de la souris Col2-Cre engendrait un phénotype très semblable à celui de la délétion de *Phospho1* seul, démontrant que la participation de *Slc20a1* dans la minéralisation était mineure, voire négligeable (Yadav *et al.*, 2016).

Si ces résultats remettent en cause la présence de Slc20a1 dans les vésicules

matricielles et y agissant comme transporteur de phosphate, ils ne permettent pas d'invalider l'idée d'un transport de Pi de l'extérieur vers l'intérieur des vésicules matricielles par l'intermédiaire d'un autre transporteur. Compte-tenu des caractéristiques de transport de Pi mesurées dans les vésicules matricielles (Guicheux *et al.*, 2000), le transporteur Slc20a2, orthologue de Slc20a1, apparaît comme un candidat évident.

Ces éléments permettent de considérer les vésicules matricielles comme un espace confiné permettant une accélération de la nucléation cristalline en se servant du Pi intravésiculaire généré par PHOSPHO1 et du calcium véhiculé par les annexines, sans que le Pi extracellulaire ne soit nécessairement un élément essentiel. Après dépôt des vésicules matricielles sur les fibres de collagène, celles-ci se rompent, libérant ainsi les cristaux d'apatite qui se propageront le long des fibres de collagènes (Hale et Wuthier, 1987). A ce stade, l'action de NPP1 (production de PPi) et de la TNAP (dégradation de PPi) prend alors tout son sens en déterminant le ratio Pi/PPi extracellulaire et en contrôlant ainsi la *croissance* cristalline le long des fibres de collagène. Le mécanisme conduisant à la libération de ces nanocristaux au sein des fibres de collagène suscite des interrogations. Il semblerait que les cristaux d'hydroxyapatite augmentent rapidement de taille au sein de ces vésicules par épitaxie pour finalement transpercer leurs membranes et entrer en contact les uns avec les autres, propageant ainsi le front de minéralisation (Goldberg *et al.* 2012). A ces mécanismes il est important d'ajouter l'existence d'un système de rétro-contrôle négatif médié par la NPP-1 et ANK qui génèrent du PPi induisant l'expression de l'OPN, qui vont tous deux inhiber la propagation du cristal et sa croissance (Figure 19)

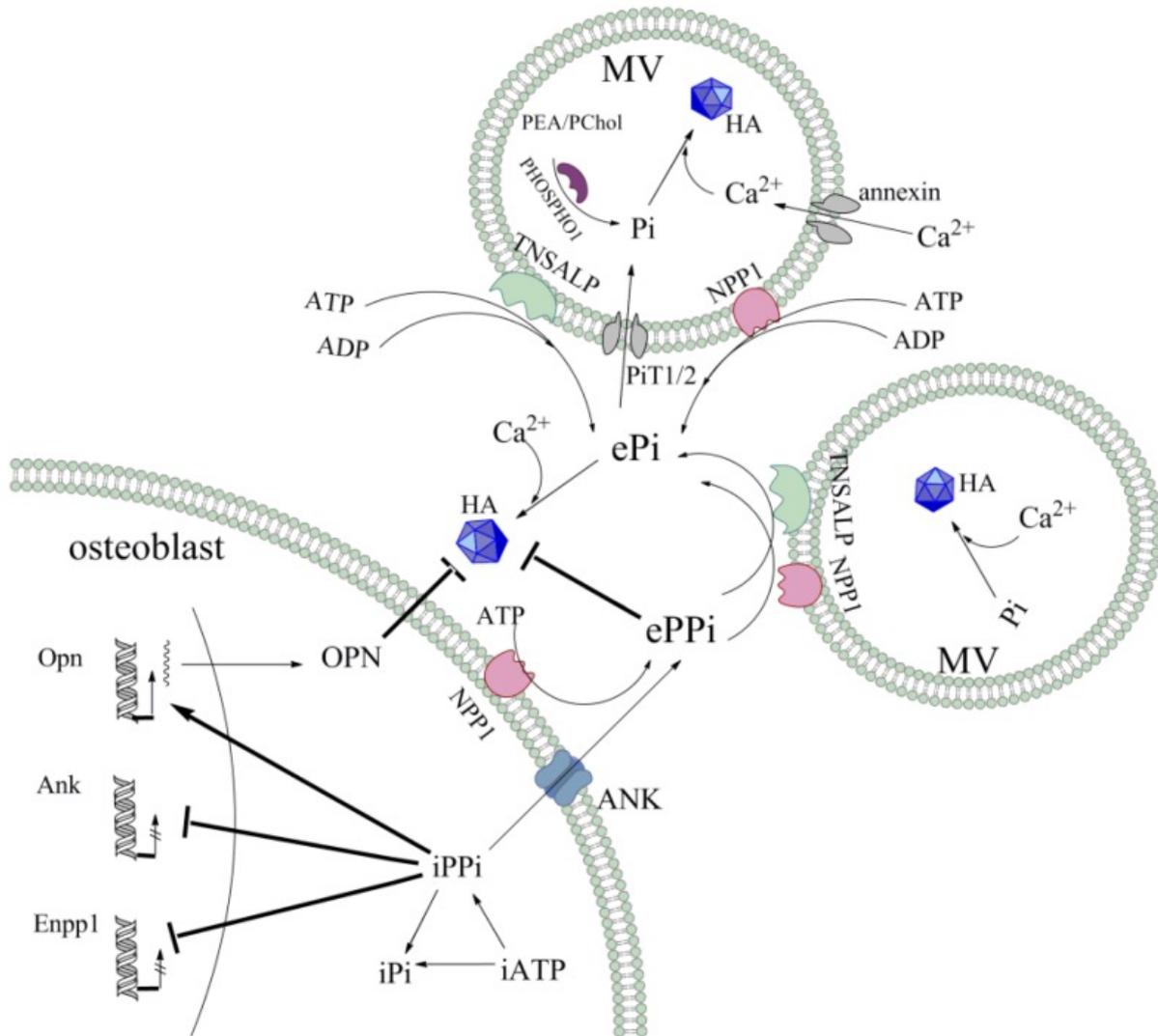


Figure 19 : Représentation schématique hypothétique de la régulation de la balance Pi/PPi au sein d'une vésicule matricielle (VM). Figure issue de Zhou *et al.* 2012 Les cristaux d'HA sont composés de Ca^{2+} et de Pi . Dans les VM, le phosphate est généré par le transport de *Slc20a1* et *Slc20a2*, ainsi que par l'hydrolyse des monophosphoesters PEA et Pchol par la phosphatase PHOSPHO1. Le transport de calcium est réalisé par les canaux d'annexines qui permettent le flux au sein des VM. Le pool de Ppi extracellulaire dérive à la fois de la production catalytique d'ATP extracellulaire par NPP1 et par l'export intracellulaire par ANK au niveau des membranes chondrocytaires et ostéoblastiques. Pour TNSALP et NPP1, l'ATPase, l'ADPase et la Ppiase contribuent au pool du Pi extracellulaire, bien que la TNSALP est plus efficace que NPP1 au niveau des VM. De plus, une boucle de rétrocontrôle négatif existe en intracellulaire. Le PPI, produit par NPP1 et transporté par ANK, inhibe l'expression d'Enpp1 et Ank. Le PPI, avec son rôle inducteur de l'expression d'OPN, inhibe la propagation et la croissance cristallines.

3.1.2 Biominéralisation sous l'action de précurseurs phosphocalciques amorphes

Chez la souris, il a été montré que les ostéoblastes, sont capables de séquestrer dans des vésicules intracellulaires, les ions Pi et Ca sous forme de granules d'environ 80 nm de diamètre (Mahamid *et al.* 2011), considérés comme des précurseurs amorphes de cristaux d'apatite (Rohde et Mayer, 2007). Les ostéoblastes seraient capables de sécréter directement par exocytose ces précurseurs amorphes sur le site de minéralisation où ils s'organiseraient en cristaux d'apatite matures au sein de la matrice collagénique. L'organisation en cristal ne se produit pas au sein des vésicules intracellulaires due à la fixation d'une partie du Ca aux phospholipides qui composent la membrane vésiculaire (Wuthier *et al.*, 1985). La présence de précurseurs de cristaux phosphocalciques amorphes sur les fibres de collagène – en absence de vésicules membranaires extracellulaires - a également été mise en évidence au cours de la minéralisation de l'émail des incisives de souris (Beniash *et al.* 2009). Une étude a d'ailleurs montré que les fibres de collagène étaient suffisantes à la nucléation et la croissance des cristaux d'apatites sans présence des protéines non collagéniques (Wang *et al.*, 2012).

3.1.3 Croissance cristalline impliquant des protéines non collagéniques

Il est intéressant de remarquer que certains tissus tels la peau, pourtant constituée de collagène de type I, ne sont pas minéralisés. Ceci s'explique par l'absence de cellules minéralisantes et par la présence, entre autres, dans la matrice extracellulaire, de protéines non collagéniques qui régulent et contrôlent la minéralisation des tissus minéralisés. Ces protéines semblent jouer un rôle majeur dans la formation du minéral, incluant la déposition du minéral (nucléation et croissance), le contrôle de la morphologie des cristaux, l'inhibition de la croissance du minéral, et enfin le coalignement des cristaux (George et Veis 2008). On suppose donc qu'il existe préalablement des clusters de prénucléation avec une structure cristalline (autrement dit si ce sont des germes d'apatite en croissance) ou amorphe (si ce sont des germes d'une phase précurseur intermédiaire qui vont se transformer ultérieurement en apatite). Des études menées chez différents modèles animaux ont montré la présence de phases précurseurs métastables (phosphate de calcium amorphe (ACP), phosphate octocalcique (OCP), brushite (DiCalcium Phosphate Dihydrate) *in vivo*, qui pourraient être stabilisées grâce à l'action de certaines protéines non collagéniques. L'association des fibres de collagènes avec les phosphoprotéines non-collagéniques faciliterait la nucléation des cristaux d'apatite (Glimcher, 1989). Deux approches permettent de déterminer la fonction de ces molécules. La première consiste à étudier des animaux transgéniques invalidés pour un ou plusieurs composants de la matrice extracellulaire. Bien que des effets significatifs sur les

tissus minéralisés aient été constatés, aucun de ces animaux n'a présenté une inhibition complète de minéralisation, ce qui suggère une redondance dans les fonctions de ces protéines. Par ailleurs, ces protéines cumulent souvent d'autres fonctions en plus de leur rôle dans la minéralisation. Et l'invalidation d'une protéine peut conduire à de multiples changements dans l'organisme, qui peuvent résulter directement ou indirectement en une modification de la minéralisation (Boskey *et al.* 2005). La seconde approche utilisée pour comprendre le rôle des molécules non collagéniques dans le processus de minéralisation est d'utiliser les expériences *in vitro*. Les minéraux formés *in vitro* en présence de peptides polyanioniques ressemblent à ce qui peut être observé *in vivo*, avec une phase initiale de minéral amorphe qui se transforme en cristaux d'hydroxyapatite avec le temps (Nudelman *et al.* 2013).

Selon leur nature et leur concentration dans le tissu, ces protéines régulatrices peuvent se conduire soit en promoteurs, soit en inhibiteurs de la minéralisation. Ainsi, par exemple, la famille des Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLING), qui intègre différents membres tels que la DMP-1 (dentin matrix protein), la DSPP (dentin sialophosphoprotein), ou l'OPN (ostéopontine), joue un rôle crucial dans la minéralisation des tissus osseux et dentaires. Ces protéines sont exprimées à la fois par des tissus minéralisés (os, dent) et des tissus mous (glandes salivaires, reins). Elles possèdent un motif ASARM (acidic serine- and aspartate-rich motif), qui semble jouer un rôle prépondérant dans la minéralisation. Ce sont particulièrement les modifications de ce motif, *via* un clivage enzymatique et des phosphorylations, qui gouvernent sa fonction (Staines *et al.* 2012).

Plus de deux cents protéines non collagéniques ont été recensées. Nous ne décrirons succinctement que trois d'entre elles, abordées dans la partie expérimentale de cette thèse.

DMP1 (Dentin Matrix Protein 1)

DMP1 a au départ été décrite comme spécifique à la dentine (odontoblastes), mais son expression a été trouvée plus tard dans les ostéocytes, les ostéoblastes, les améloblastes, les cémentoblastes, mais également dans des tissus mous comme le rein ou le cerveau. DMP1 est une protéine multifonctionnelle impliquée dans la biominéralisation de l'os et de la dentine : en raison de son grand nombre de domaines acide, DMP1 peut se lier au calcium, régulant ainsi la minéralisation de la matrice (Ling *et al.* 2005, Lu *et al.* 2007, Qin *et al.* 2004), l'homéostasie du phosphate (Feng *et al.* 2006), et la différenciation des odonto et ostéoblastes (Almushayt *et al.* 2006, Narayanan *et al.* 2001). Des mutations autosomiques dans ce gène

sont à l'origine de rachitisme hypophosphatémique (ADRH) (Feng *et al.* 2006, Lorenz-Depiereux *et al.* 2006).

DSPP (Dentin SialoPhosphoProtein)

La Dentin SialoPhosphoProtein (DSPP) est sécrétée par les odontoblastes et clivée en deux protéines, la Dentin SialoProtein (DSP) et la Dentin PhosphoProtein (DPP). Les souris invalidées pour DSPP présentent un phénotype correspondant à la dentinogénèse imparfaite de type II et III chez l'Homme (Zhang *et al.* 2001). DSP semble réguler l'initiation de la minéralisation de la dentine alors que DPP serait plutôt impliquée dans la maturation de la dentine minéralisée (Suzuki *et al.* 2009).

OPN (Osteopontin)

Par sa structure, OPN peut facilement fixer les ions et agit comme un inhibiteur de la minéralisation pour réguler la croissance cristalline (Sodek *et al.* 2000). La protéine OPN est également un substrat pour un certain nombre d'enzymes dont l'action peut moduler la fonction de minéralisation d'inhibition de l'OPN, par exemple PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) (Barros *et al.* 2013), qui est connue entre autres pour ses mutations menant à l'hypophosphatémie liée à l'X (XLH). Outre son rôle dans la régulation de la minéralisation physiologique dans les matrices extracellulaires de l'os et des dents (McKee *et al.* 2000), OPN est également régulée positivement dans des sites de calcifications ectopiques (Steitz *et al.* 2002, Giachelli 1999) - comme par exemple, dans la lithiase urinaire et les calcifications vasculaires – son rôle étant probablement ici d'inhiber la minéralisation de ces tissus mous.

Malgré l'existence de différents mécanismes de minéralisation, ceux-ci ne sont pas mutuellement exclusifs, et les trois processus de minéralisation peuvent être actifs au sein du même tissu (Boskey, 2003).

3.2 Biominéralisation des tissus minéralisés dentaires

3.2.1 Biominéralisation de l'émail

L'émail est une structure ne contenant pas de fibres de collagène, la nucléation des cristaux ne se déroule donc pas sur le même schéma que pour la dentine, l'os ou le ciment et

nécessite la présence de protéines particulières qui seront décrites dans cette section. Ces protéines ne sont néanmoins pas exclusives de l'émail et sont exprimées par d'autres tissus dont la pulpe, l'os ou le ligament parodontal.

La formation de l'émail n'implique pas une étape de pré-émail non minéralisé (comme la pré-dentine), les cristaux d'émail grandissent directement contre la surface de sécrétion des améloblastes. Bien que la matrice formée par les amélogénines solubles puisse constituer un support physique, les protéines de l'émail ne jouent pas un rôle de structure, comme le ferait le collagène dans les os, la dentine et le ciment. Donc, l'organisation tridimensionnelle de l'émail résulte de l'arrangement des cristaux. Les protéines non-amélogénines induisent et guident la formation des cristaux d'émail, alors que les amélogénines régulent la croissance en épaisseur et la largeur des cristaux. Les amélogénines empêchent également la fusion des cristaux pendant leur formation et sont dégradées pendant la maturation de l'émail (Robinson *et al.* 1998).

L'émail est d'abord formé au niveau des cuspides, sa minéralisation nécessite un large flux de minéraux. Les données concernant les flux de calcium sont désormais bien acquises. Le transfert du calcium depuis le sang jusque dans l'émail implique des voies inter- et trans-cellulaire. Le calcium est acheminé à travers les améloblastes dans des stocks de haute capacité, associés au réticulum endoplasmique ce qui empêche l'effet cytotoxique du calcium dans le cytoplasme cellulaire (Robinson *et al.* 1979). Les vésicules n'ont pas été associées à la minéralisation de l'émail, contrairement à celle des tissus minéralisés à l'aide du collagène.

On décrit formation de l'émail en trois étapes : la phase de pré sécrétion (qui est une étape cellulaire uniquement sans minéralisation – voir paragraphe 1.2.2 page 20), la phase de sécrétion (où l'émail atteint son épaisseur totale) et la phase de maturation (où la matrice organique de l'émail est remplacé par les cristaux d'hydroxyapatite) (Hu *et al.* 2007).

3.2.1.1 Phase de sécrétion et rôle des protéines non collagéniques

Pendant la phase de sécrétion, les améloblastes produisent et libèrent des protéines non collagéniques (amélogénines, améloblastine et énaméline) qui contribuent à guider la minéralisation amélaire. Ces protéines vont intervenir dans la nucléation du cristal dans un milieu saturé en calcium et en phosphate. De plus, la fixation de peptides matriciels sur des faces spécifiques de ce cristal en module l'énergie de surface et l'architecture, permettant l'élaboration de cristaux longs et fins, disposés parallèlement entre eux (figure 19). La phase minérale ainsi organisée au stade de sécrétion occupe 10 à 20 % du volume de l'émail

(Margolis *et al.* 2006). Dans un premier temps, les protéines sécrétées par les améloblastes vont s'assembler en nanosphères ou rester sous forme de monomère et vont permettre d'initier la nucléation cristalline en se chargeant de Pi et de calcium. Au cours de l'élongation du cristal, les peptides non amélogénines se positionnent sur le cristal en formation, empêchant sa croissance latérale. La croissance du cristal se fait donc en hauteur. Enfin au stade de la maturation, des protéases sont sécrétées (MMP20 et KLK4) qui vont dégrader les peptides amélaire et permettre la croissance latérale des cristaux (Figure 20).

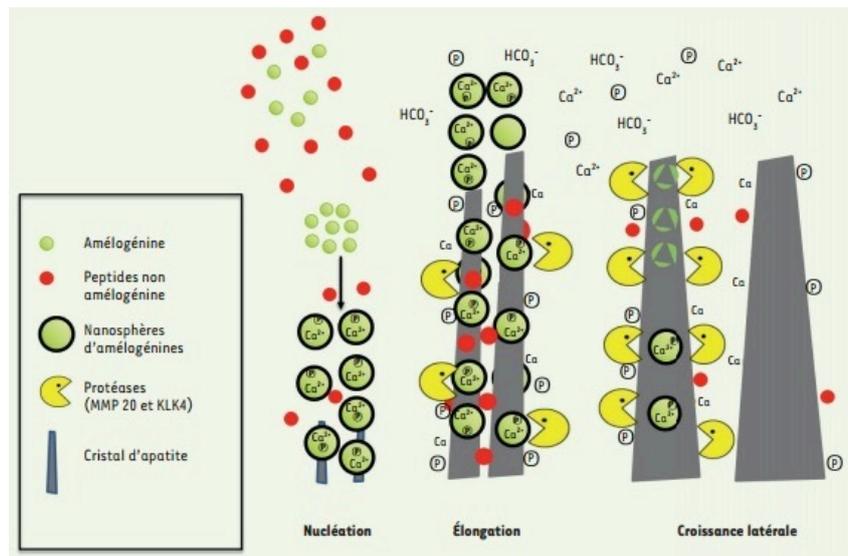


Figure 20 : Représentation schématique de la nucléation et de la croissance des cristaux d'émail. Figure issue de Lignon *et al.* 2015.

Amélogénines

Les amélogénines sont des protéines majeures déterminant la structure de l'émail. Elles constituent plus de 90% du contenu protéique amélaire.

L'amélogénine est nécessaire pour une formation correcte d'émail comme il a été prouvé par des analyses génétiques humaines, ainsi que sur des souris invalidées pour le gène codant pour cette protéine (Lagerstrom *et al.* 1991, Aldred *et al.* 1992, Bailleul Forestier *et al.* 2008, Cho *et al.* 2014). Les différentes stratégies employées pour étudier le rôle de cette protéine (à savoir l'utilisation de souris invalidées pour ce gène ou l'inhibition spécifique de l'expression de l'amélogénine par des ribozymes modifiées chimiquement chez des souris nouveaux-nés) montrent que cette protéine contrôle l'organisation et la croissance des cristaux d'émail. Il est intéressant de noter que chez les souris invalidées pour cette protéine,

la minéralisation de l'émail se produisait encore mais de manière déstructurée, ce qui soutient l'hypothèse que cette protéine n'est pas impliquée dans l'initiation de la minéralisation mais est essentielle pour l'élongation et l'obtention d'une épaisseur adéquate d'émail. Afin d'élucider plus précisément la fonction de cette protéine dans le contrôle de la minéralisation, des études *in vitro* ont été menées, qui ont montré que l'amélogénine peut former différents modules structurels, en micelles, rubans ou nanosphères, mais il n'existe pas de consensus sur sa forme d'auto-assemblage *in vivo*. Ces études ont décrypté les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la minéralisation par ces protéines et montrent le rôle de l'amélogénine dans l'organisation (parallélisme) et la morphologie des cristaux (Moradian-Oldak 2012).

Améloblastine

Les études concernant cette protéine sont relativement limitées du fait de son isolement et de sa purification difficiles *in vivo*. En effet, elle est hydrolysée par la protéine MMP-20 aussitôt qu'elle est sécrétée.

L'améloblastine est la seconde protéine amélaire la plus abondante, constituant 5% des protéines totales présentes dans la partie organique de l'émail. Néanmoins, chez l'Homme, une délétion du gène codant pour l'améloblastine entraîne un phénotype d'amélogénèse imparfaite (Poulter *et al.* 2014). Elle semble être impliquée dans le contrôle de la structure prismatique de l'émail mais cette hypothèse nécessite confirmation. La partie C-terminale de la protéine possède une forte affinité pour le calcium, suggérant une possible implication de cette protéine dans le contrôle de la minéralisation (Yamakoshi *et al.* 2001).

Enameline

L'enameline est exprimée pendant les trois principaux stades de la formation de l'émail, mais son expression se termine avant celle de l'amélogénine. A la différence de l'amélogénine, cette protéine est peu abondante dans la matrice extracellulaire. Cependant, des mutations causales de l'amélogénèse imparfaite humaine ont été décrites sur le gène ENAM (Rajpar *et al.* 2001).

De plus chez la souris *Enam^{-/-}*, la synthèse d'émail n'a pas lieu. Chez les hétérozygotes, la déposition initiale de minéral n'est pas observée, seule une minéralisation pathologique de la matrice extracellulaire se produit, conduisant à un matériel calcifié «indéfini». Les résultats *in vitro* soulignent les propriétés de l'enameline dans le contrôle de la nucléation et de la croissance du cristal (Hu *et al.* 2008 ; Bouropoulos *et al.* 2004).

3.2.1.2 Phase de maturation

Lors de la phase de maturation, la dégradation des protéines matricielles par des enzymes (la métalloprotéase 20 MMP20 et la kallikréine 4 KLK4) autorise une croissance minérale complète (figure 19) (Caterina *et al.* 2002 ; Simmer *et al.* 2009).

3.2.2 Dentine, ciment et os alvéolaire : des phénomènes de biominéralisation similaires

Selon le type de tissu et sa localisation, au moins trois mécanismes physiologiques de minéralisation ont été mis en évidence au sein des tissus dentinaires, cémentaires et osseux (Goldberg *et al.* 2012), impliquant des mécanismes de nucléation homogène (nucléation dans des vésicules matricielles), ou hétérogène (nucléation sur une matrice collagénique). La biominéralisation de ces tissus dépend de la présence de fibres de collagène et de l'action de protéines non collagéniques.

Dès lors que les odontoblastes sont différenciés et fonctionnels, ils débutent la synthèse des constituants de la prédentine (collagène, protéines non collagéniques dont SIBLINGS, etc). Une fois sécrétée, la matrice dentinaire subit un phénomène de maturation, puis elle se minéralise dans la partie la plus éloignée du corps cellulaire, là où la maturation est terminée. Cette première couche de dentine est appelée manteau dentinaire. Les ions phosphates et calcium nécessaires à sa minéralisation sont apportés par des vésicules matricielles issues du prolongement odontoblastique alors que la minéralisation de la prédentine entre les prolongements odontoblastiques se fait par un autre mécanisme (Beniash 2011). La minéralisation débute lorsque la prédentine atteint une épaisseur d'environ 20 à 30 µm au niveau de la couronne et de quelques microns au niveau de la racine chez l'homme.

3.2.2.1 Rôle du collagène dans la biominéralisation de la dentine, du ciment et de l'os

Chez les vertébrés, le collagène est la protéine la plus abondante et est associé à la minéralisation du squelette et de la dentine et du ciment. C'est principalement lui qui apporte l'intégrité structurale, ainsi que la stabilité mécanique et l'élasticité aux tissus conjonctifs *via* son organisation supramoléculaire au sein de la matrice extracellulaire (Yamauchi *et al.* 1989). Vingt neuf types de collagènes ont été identifiés. Ces différents types possèdent des séquences d'acides aminés propres, donc des structures moléculaires et supramoléculaires

propres, afin de répondre aux contraintes mécaniques spécifiques demandées par le tissu dans lequel ils sont incorporés.

L'os, la dentine et le ciment sont composés principalement de collagène de type I (90% des protéines totales), qui est proposé être une charpente pour l'apatite minérale. Bien que les fibres de collagène donnent une base de construction aux tissus de l'os, de la dentine et du ciment, l'organisation et la nature de ces fibres varient au sein de ces tissus, ce qui entraîne des différences dans leurs propriétés fonctionnelles (Landis et Jacquet 2013) (figure 21).

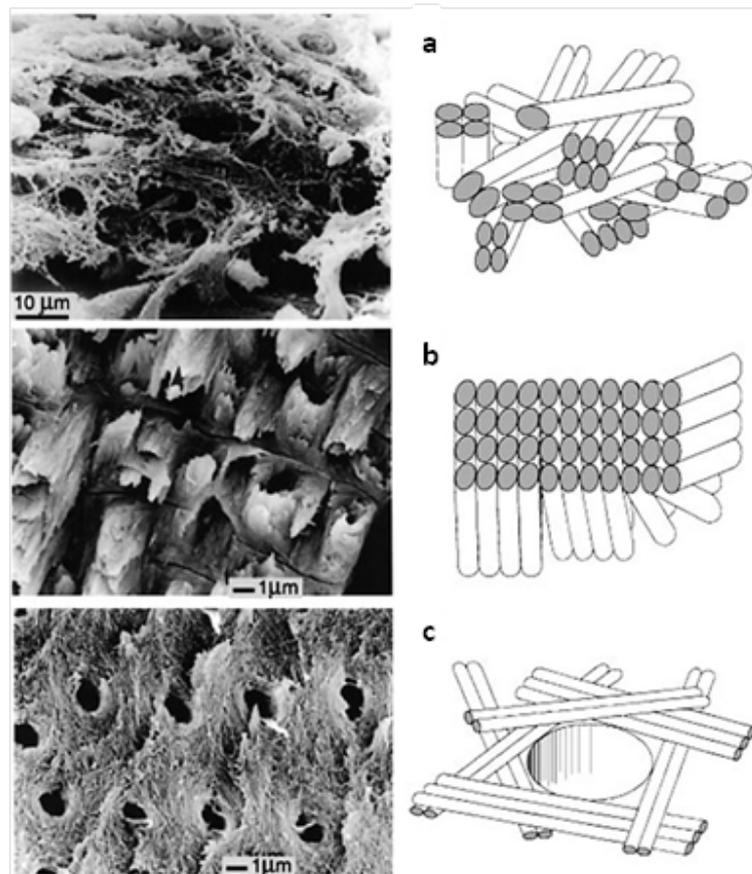


Figure 21 : Structure de l'os lamellaire (a), l'os non lamellaire (b) et la dentine (c) en MET, associée à la représentation schématique de la disposition des fibres de collagène au sein de ces mêmes tissus, issue de Beniash 2011

Des mutations sur le gène du collagène COL1A1 peuvent entraîner chez l'Homme une oséogénèse imparfaite associée à une dentinogénèse imparfaite avec des dents fragilisées et opalescentes dont la chambre pulpaire est totalement oblitérée (De Coster *et al.* 2007).

De plus, les considérations récentes sur l'interaction entre le collagène de type I et les ions calcium et phosphate, qui sont les constituants majeurs des cristaux d'apatite, ont suggéré

que la liaison de ces ions sur certains sites spécifiques au niveau du collagène (les « gap » zones et les zones de chevauchement) dépend de la stéréochimie du collagène et conduit à la nucléation des cristaux (Traub *et al.* 1989 ; Landis *et al.* 1993). Ce concept (figure 22) est fondamental pour comprendre la minéralisation physiologique et pathologique.

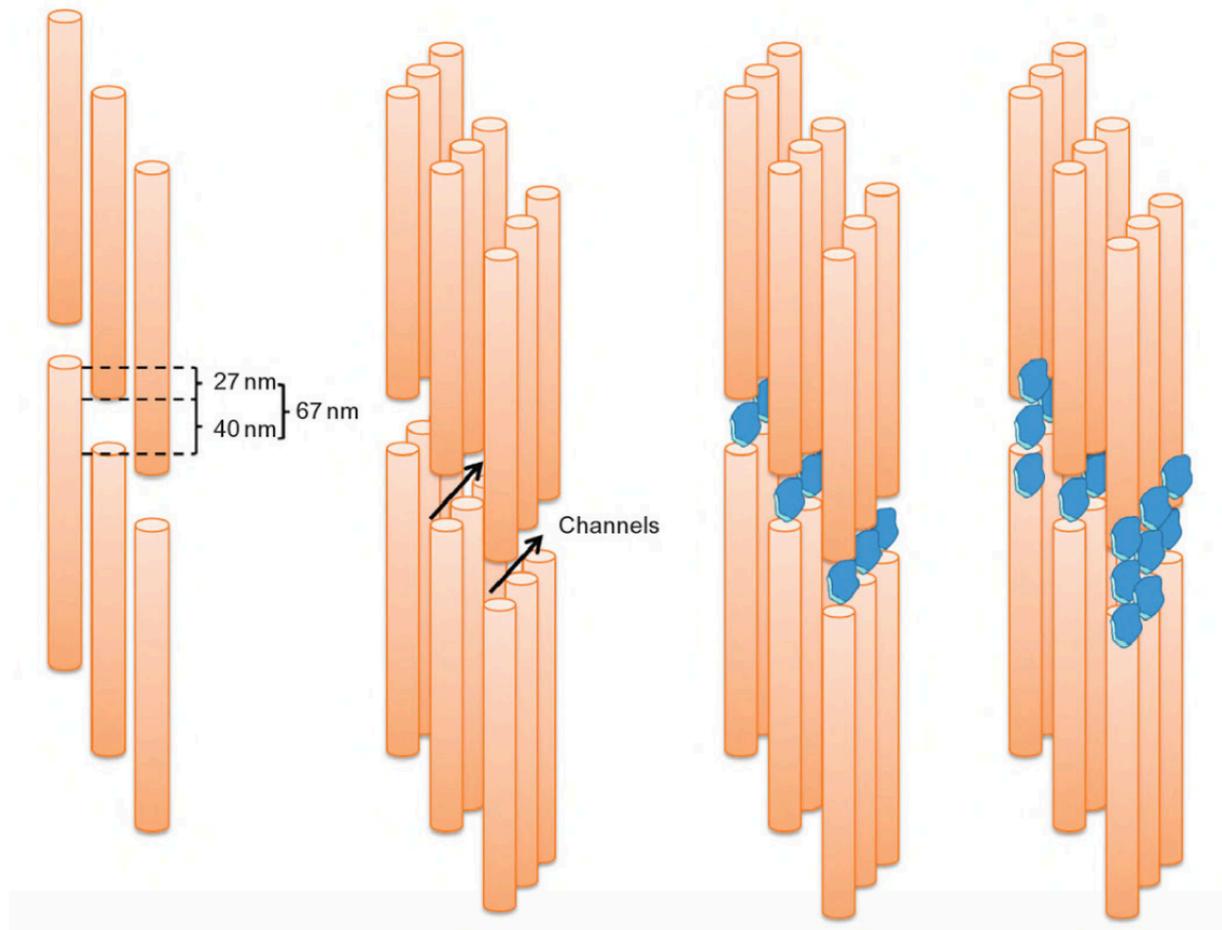


Figure 22. Concept de la biominéralisation liée à la stéréochimie du collagène, tel que proposé par Landis et al. 1993. Issu de Aparicio et Ginebra, 2015.

Le conditionnement des molécules de collagène dans l'os, tel qu'initialement présenté par Hodge et Petruska en 1963, montrent des molécules de collagène, présumées droites et en forme de bâtonnets, qui sont empilées bout à bout avec un espace d'environ 40 nm entre elles, soit une « gap zone » et une zone de chevauchement avec la molécule voisine de 27nm. Ces tunnels facilitent la nucléation des cristaux d'apatite (en bleu) entre les extrémités N et C terminales des molécules de collagène des fibrilles (minéralisation intra fibrillaire) puis la croissance entre les fibrilles (minéralisation inter fibrillaire).

3.2.2.2 Vésicules matricielles

Une autre hypothèse de nucléation cristalline est liée aux vésicules matricielles. Dans

un premier temps, les odontoblastes faiblement différenciés sécrètent des fibres de collagène de type I, et des molécules non collagéniques telles que l'ostéopontine et le TGF- β dans la matrice extracellulaire située en périphérie de la papille mésenchymateuse (future pulpe). Puis la minéralisation du manteau dentinaire est réalisée suite au relargage des vésicules matricielles par les odontoblastes. L'importance des vésicules matricielles a été mise en évidence dans la formation de l'os, du ciment et du manteau dentinaire par Takano *et al* en 2000 .

3.2.2.3 Rôle des protéines non collagéniques dans la biominéralisation de la dentine, du ciment et de l'os

Les protéines non collagéniques de la dentine, du ciment et de l'os sont similaires mais dans des proportions différentes. Elles auront un rôle promoteur ou inhibiteur de la minéralisation de ces tissus (voir chapitre 3.1.3 page 51).

Elle sont sécrétées dans la matrice extracellulaire : ostéoïde pour l'os ou pré-dentine pour la dentine. La pré-dentine est à l'origine de la dentine intertubulaire. Elle est limitée, du côté proximal par les corps cellulaires des odontoblastes et du côté distal par le front de minéralisation et la métadentine (Linde et Goldberg 1993). La métadentine est la zone située au niveau du front de minéralisation où est sécrété un certain nombre de protéines matricielles non collagéniques (SIBLING, phosphoprotéines, lipoprotéine, protéoglycanes) (Figure 23).

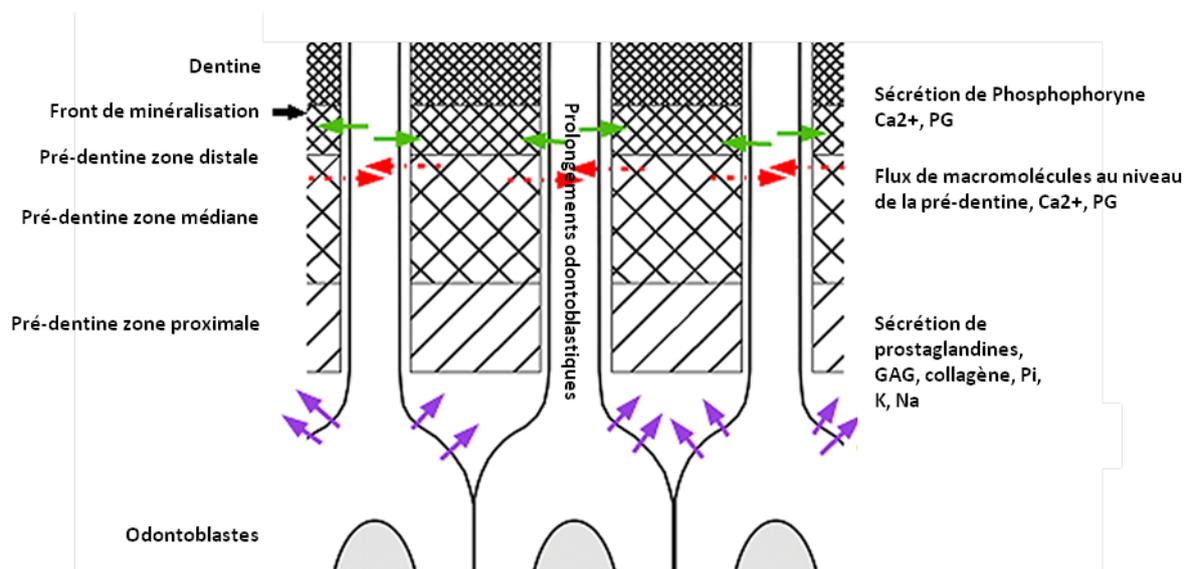


Figure 23 : Représentation schématique du modèle de minéralisation au niveau de la pré-dentine et du front de minéralisation. Les flèches vertes et rouges indiquent les flux de

calcium et d'autres macromolécules entre les prolongements odontoblastiques et la matrice, tandis que les flèches violettes indiquent la sécrétion de collagène et de phosphate par les pôles distaux des corps cellulaires des odontoblastes. Figure adaptée de Beniash, 2011.

Une mutation de ces protéines non collagéniques peut entraîner une dentinogénèse imparfaite, telle que la mutation de *DSPP*, comme la mutation de *COL1A1*, où l'épaisseur de prédentine sera augmentée avec présence anormale de calcosphérites non fusionnées (Figure 24).

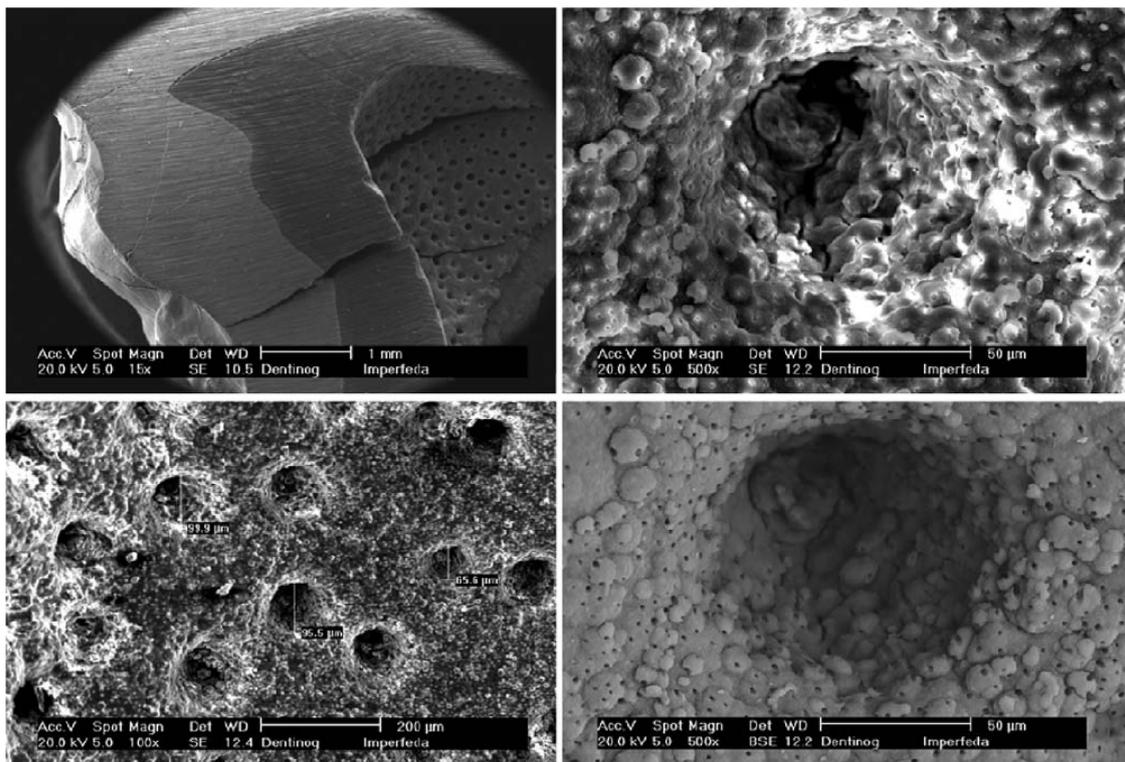


Figure 24. Images microradiographiques de 3èmes molaires humaines atteintes de dentinogénèse imparfaite à un grossissement de 15 à 500 fois. Issu de Teixeira *et al.* 2008

3.2.2.4 Croissance et maturation des cristaux

Les mécanismes de croissance et le développement des cristaux d'apatite, qui suivent l'étape de nucléation initiale (permise, comme vu précédemment, par des interactions spécifiques avec certaines protéines non collagéniques *in vivo*) et qui permettent l'élaboration de cristaux à forme de plaquette, alignés et parallèles les uns aux autres au sein du collagène de type I et dont l'axe C est parallèle au grand axe du collagène auquel ils sont associés, sont encore méconnus. En effet, il n'existe pas de technique permettant d'observer la croissance *in*

situ et *in vivo* du minéral. Enfin, le phénomène de maturation des cristaux d'apatite, observé au cours du vieillissement de l'individu, conduit à une augmentation légère de leur taille, ainsi qu'à une augmentation de leur ratio Ca/P (Termine et Posner, 1966). Les cristaux précédemment déposés peuvent s'associer pour permettre la formation de calcosphérites (ou globules de minéralisation). Ces calcosphérites augmentent de volume et fusionnent les uns avec les autres minéralisant ainsi la dentine de façon homogène (Goldberg *et al.* 2012) sauf en cas de pathologies comme le rachitisme lié à l'X (XLH) où les calcosphérites sont insuffisamment fusionnés (Salmon *et al.* 2014).

3.2.3 Minéralisation pathologique

Au niveau dentaire, les calcifications pulpaire pathologiques (figure 25) existent majoritairement sous deux formes : la première formée par les odontoblastes ou les cellules de Hoehl correspond à une dentine réparatrice (denticles), la seconde, formée par des cellules pulpaire en dégénérescence ou peu différenciées correspond aux pulpolithes (pulp stones). Les pulpolithes peuvent exister librement dans le tissu pulpaire ou être liées à la dentine (Johnson et Bevelander 1956). Les calcifications pathologiques peuvent être isolées ou rattachées à un syndrome systémique. Des calcifications pulpaire ont ainsi été rapportées chez les patients atteints de maladies systémiques ou génétiques tels que la dysplasie dentaire, la dentinogénèse imparfaite et dans certains syndromes tels que le syndrome de Van der Woude (Kantaputra *et al.* 2002). Il faut cependant noter qu'elles peuvent également se retrouver chez des individus sains et que la variabilité inter et intra-individuelle est grande. L'étiologie de calcifications pulpaire chez l'individu sain a été attribuée à des irritants locaux bien connus tels que les caries, les procédures de coiffage pulpaire, les traumatismes dentaires, les restaurations coronaires, la maladie parodontale ou les traitements orthodontiques selon les auteurs (Goga *et al.* 2008).

Malgré un certain nombre d'études microscopiques et histochimiques, l'origine exacte de ces calcifications pulpaire reste largement inconnue mais semble fortement corrélée aux mécanismes de vieillissement. Certaines études (Bernick et Nedelman, 1975 ; Bernick *et al.*, 1967a ; Bernick *et al.* ; 1967b) montrent une localisation préférentielle des calcifications pulpaire à proximité des fibres nerveuses et des vaisseaux.

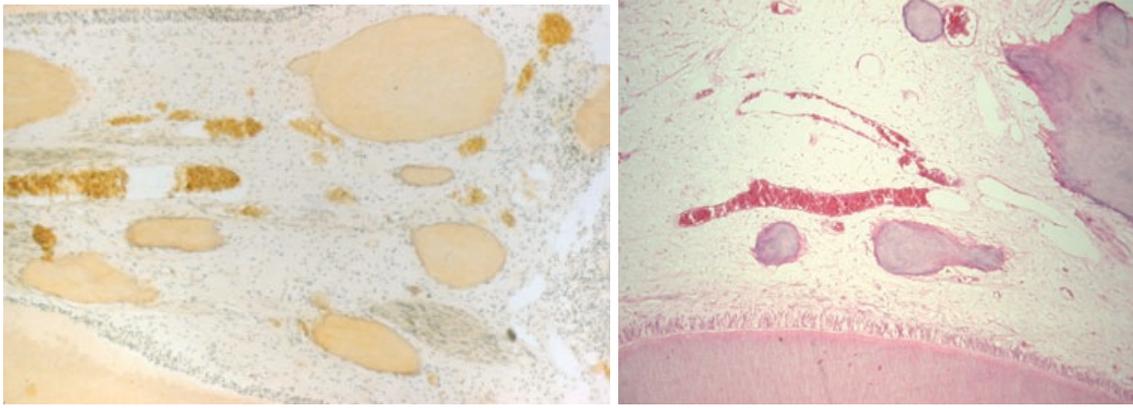


Figure 25 : Calcifications pulpaire de taille variable au sein de la pulpe dentaire. A droite issue de Kardos et Kieser (2006), à gauche issue de Goga *et al.* (2008).

Une équipe a étudié la composition de la matrice organique de pulpolithes humains (Ninomiya *et al.* 2001). Elle présentait en immunohistochimie du collagène mais pas d'ostéonectine ou d'ostéocalcine, et une forte immunocoloration de l'ostéopontine dans la zone périphérique des calcifications pulpaire : ce qui indique que ce processus de minéralisation provient de cellules peu différenciées et probablement de fibroblastes pulpaire plutôt que d'odontoblastes. En effet, l'ostéocalcine est exprimé dans les ostéoblastes matures, et l'expression de l'ostéopontine précède celle de l'ostéocalcine (Sodek *et al.* 1995, Ueno *et al.* 2001). En ce qui concerne l'ostéopontine, ces résultats immunohistochimiques sont semblables à ceux issus de l'analyse des plaques athéroscléreuse et de calculs urinaires (Hirota *et al.*, 1993, Kohri *et al.*, 1993). Plus récemment, une autre équipe a analysé la composition et la structure minérale de calcifications pulpaire (Berès *et al.* 2016) : la structure minérale était désorganisée et les calcifications contenaient des quantités anormalement élevées de zinc et cuivre. Ils ont émis l'hypothèse que la présence de fortes concentrations de cuivre et de zinc, qui ne sont pas observées dans la dentine physiologique, pourrait être liée à une augmentation de l'activité enzymatique superoxyde dismutase (SOD), et ce d'autant plus que les pulpolithes se développent le plus souvent dans un contexte inflammatoire. Dans ces conditions de stress oxydatif, l'inhibition de la minéralisation serait levée au sein des cellules de la pulpe (fibroblastes par exemple), ce qui conduirait à de la calcification pathologique.

Après vous avoir détaillé les mécanismes de biominéralisation dentaire physiologique et pathologique, je vais vous présenter les transporteurs de phosphate potentiellement impliqués dans ces mécanismes.

4 TRANSPORTEURS DE PHOSPHATE

4.1 Généralités sur le phosphate

Le phosphate est le deuxième minéral le plus abondant de l'organisme, après le calcium. Le phosphate est impliqué dans des processus biologiques fondamentaux et est l'un des constituants majeurs des cristaux d'hydroxyapatite comme il a été mentionné dans le chapitre précédent. Environ 85% du phosphate de l'organisme est stocké dans les os et les dents, 14% au sein des cellules et 1% se retrouve dans les fluides extracellulaires. La concentration sérique (phosphatémie) se situe aux alentours de 1 mM chez l'Homme (Gattineni et Friedman, 2005). Cette concentration résulte de la balance entre l'absorption intestinale de phosphate et son excrétion et sa réabsorption par le rein, avec l'os servant de réservoir (figure 26).

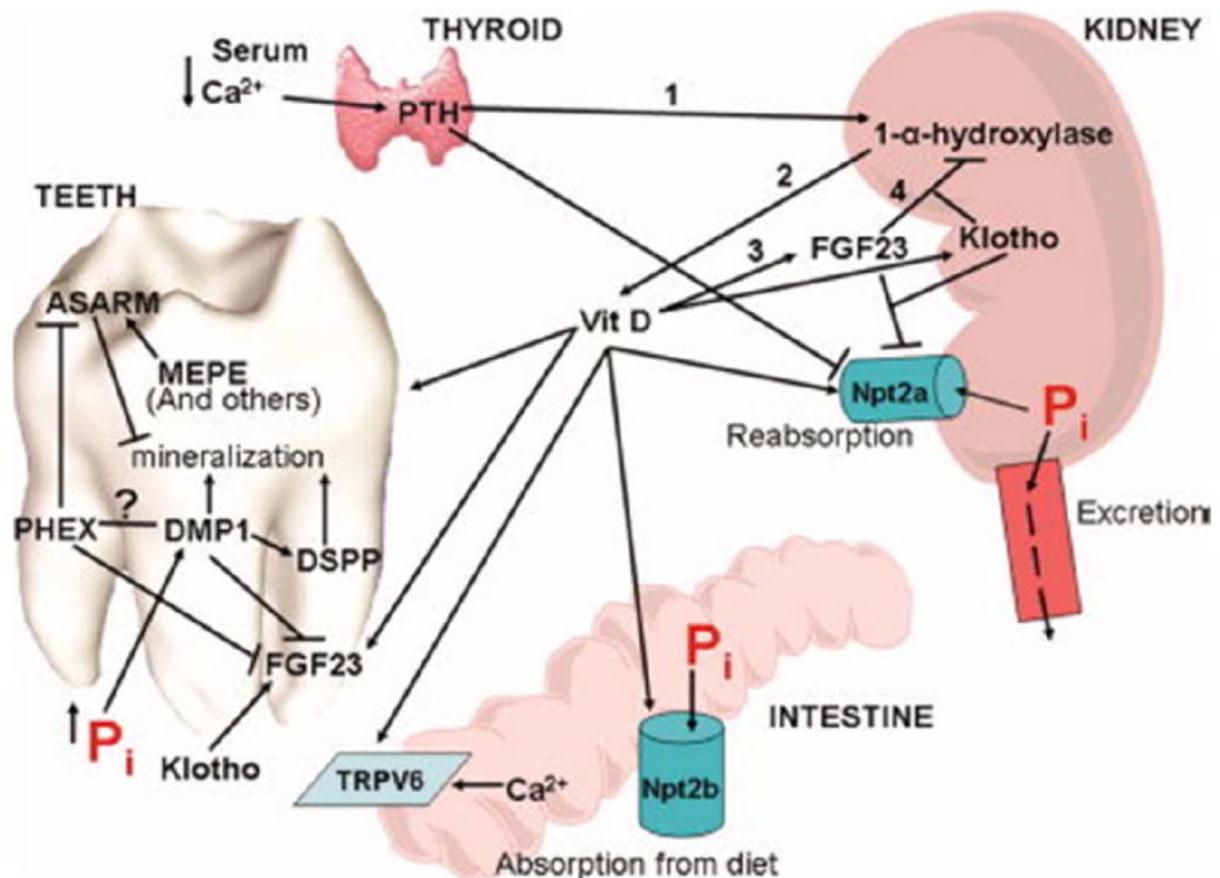


Figure 26 : Homéostasie du phosphate, Foster *et al.* 2008 : les niveaux calcium sérique (Ca^{2+}) et de phosphate (P_i) régulent l'expression des gènes de l'axe parathyroïdes-rein-intestin-dent. Nous voyons ici que ces régulations directes et indirectes sont complexes et multiples

Un déséquilibre de l'homéostasie du phosphate peut avoir des conséquences néfastes sur de nombreux organes. Ainsi, une hypophosphatémie, suite à une mutation sur une endopeptidase matricielle des tissus minéralisés (PHEX) et conduisant au syndrome de rachitisme hypophosphatémique lié à l'X (XLH), révèle, au niveau dentaire, une dentine hypominéralisée avec un défaut de coalescence des calcosphérites, des cornes pulpaire élargies et un taurodontisme (il s'agit d'une malformation radiculaire avec une chambre pulpaire allongée et des racines raccourcies). A l'inverse, une hyperphosphatémie chez des enfants avec des pathologies rénales chroniques entraîne une hypoplasie de l'émail (Davidovich *et al.* 2005). Il existe au niveau des reins, de l'intestin et de l'os des transporteurs de phosphate qui jouent un rôle clef dans l'homéostasie du Pi.

De manière générale, le transport de solutés à travers une barrière cellulaire épithéliale peut se faire de deux manières. Soit les solutés diffusent entre les cellules, il s'agit du transport paracellulaire. Soit les solutés traversent la membrane, diffusent au sein de la cellule et sont sécrétés au pôle opposé de la cellule et il s'agit alors d'un transport transcellulaire.

Au niveau du tissu osseux et dentaire, le transport des ions vers les sites de minéralisation a longtemps été imaginé se faire de manière passive, impliquant une diffusion simple des ions entre les cellules et vers la prédentine ou la bordure ostéoïde. Cependant, les preuves se sont accumulées montrant que ce phénomène est médié par les cellules de manière active, ce qui par ailleurs sous-entend que les cellules sont capables de contrôler dans le temps les mécanismes de minéralisation (Lundquist 2002).

Au sein de la cellule, certains transporteurs vont permettre l'entrée de Pi. Ces transporteurs ont fait l'objet de nombreuses études et sont assez bien caractérisés. En revanche, les systèmes impliqués dans l'export de Pi sont encore peu décrits. L'import de phosphate au sein de la cellule se fait nécessairement contre un gradient électrochimique et de manière secondairement active. Deux groupes d'importeurs ont été décrits remplir ce rôle : les transporteurs de phosphate sodium-dépendant et les transporteurs de phosphate sodium-indépendant.

Nous nous intéresserons ici aux transporteurs de phosphate exprimés à la membrane des cellules des mammifères et décrits comme des importateurs ou des exportateurs de phosphate.

4.2 Importeurs de phosphate sodium-dépendant

Comme mentionné précédemment, l'entrée de phosphate à travers la membrane apicale est couplée énergétiquement au mouvement du sodium. En effet, dans ce transport actif secondaire, l'énergie nécessaire à l'entrée du phosphate contre son gradient résulte du gradient électrochimique du sodium. Ce gradient est créé grâce à l'action du transporteur Na⁺-K⁺-ATPase qui entraîne l'extrusion de sodium au niveau basolatéral de la cellule et permet donc le maintien d'une faible concentration de sodium au sein de la cellule (Gattineni et Friedman).

Les analyses cinétiques ont pu mettre en évidence deux types de transporteurs sodium-dépendant : les transporteurs à faible affinité ($K_m=1.3$ mM), forte capacité ($V_{max}= 1.1$ nmol/s par mg protéines), qui transportent des phosphates divalents, et les transporteurs à forte affinité ($K_m=0.03$ mM), faible capacité ($V_{max}= 0.04$ nmol/s par mg protéines) qui transportent les phosphates mono ou divalents (Bindels *et al.* 1987) (Quamme 1990). La capacité de transport est fortement dépendante du pH. En effet, le pH définit la forme sous laquelle se trouve le phosphate (monovalent ou divalent) et les protons modulent directement la cinétique du transport (Biber *et al.* 2013).

4.2.1 Importeurs de phosphate sodium dépendants haute affinité basse capacité

Chez les mammifères, les cotransporteurs sodium-phosphate (Npt) appartenant à la famille des transporteurs Solute Carrier (SLC) sont classés en trois familles : les transporteurs de phosphate de SLC17 (SLC17A1), les transporteurs SLC34 (SLC34A1, SLC34A2 et SLC34A3) et les transporteurs de phosphate SLC20 (SLC20A1 et SLC20A2), dont la répartition est basée sur leur séquence protéique, leurs caractéristiques de transport et leur expression tissulaire préférentielle (Figure 27).

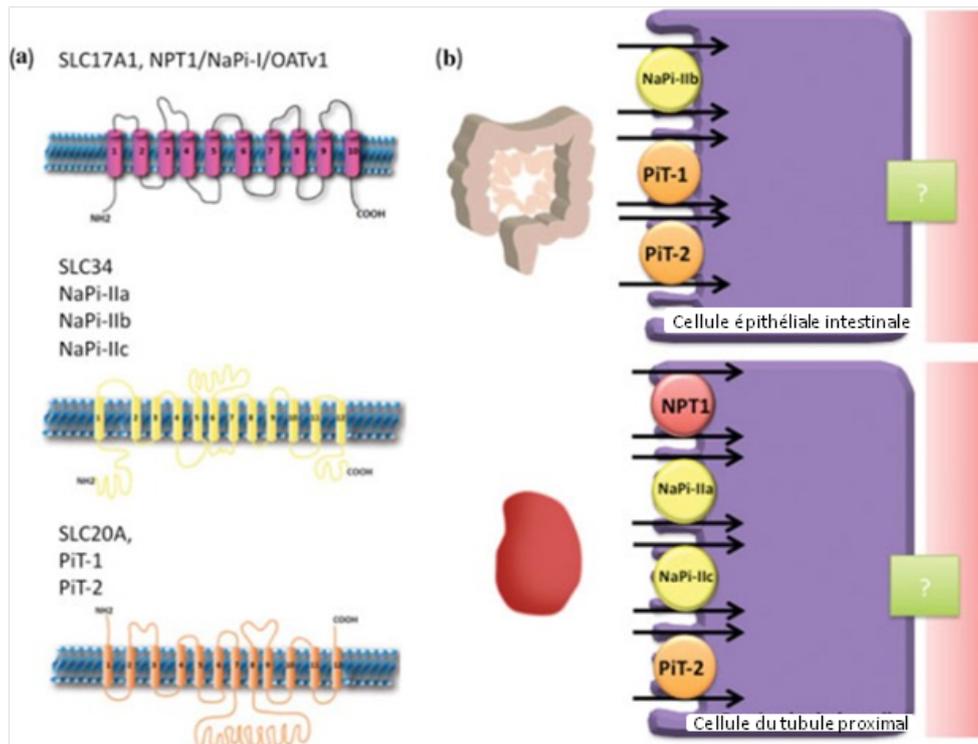


Figure 27 : Représentation schématique des transporteurs de phosphate sodium-dépendant (NaPi) issue de (Miyamoto *et al.* 2011). (a) Représentation de la structure membranaire des trois types de transporteurs NaPi : SLC17A1 (NPT1/NaPi-I), SLC34 (SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3), et SLC20 (SLC20A1/2). (b) Localisation des transporteurs au niveau des cellules rénales et intestinales.

Tableau IV. Dénomination et caractéristiques des cotransporteurs sodium-phosphate (références dans le texte des chapitres suivants)

Nom officiel (HUGO)	Nom commun	Ions transportés	Principales fonctions physiologiques	Facteurs régulateurs majoritaires	Expression tissulaire majoritaire
SLC17A1	Npt1	Na ⁺ , Pi, anions organiques, Cl ⁻	Transport polyanionique	Insuline, Glucose, Glucagon	Rein, Foie
SLC34A1	Npt2a	Na ⁺ , Pi	Réabsorption tubulaire rénale du phosphate	PTH, vitamine D3, FGF-23	Rein
SLC34A2	Npt2b	Na ⁺ , Pi	Absorption intestinale de phosphate.	Vitamine D3	Poumon, intestin, rein, testicules...
SLC34A3	Npt2c	Na ⁺ , Pi	Réabsorption rénale de phosphate (croissance)	FGF-23	Rein
SLC20A1	PiT1	Na ⁺ , Pi	Développement hépatique Homéostasie osseuse du Pi? Prolifération, apoptose Récepteur rétroviral	Pi	Variée
SLC20A2	PiT2	Na ⁺ , Pi	Réabsorption rénale de phosphate ? Absorption intestinale de phosphate ? Récepteur viral	Pi	Variée

4.2.1.1 *SLC17A1/Npt1*

Slc17a1 est le premier co-transporteur sodium-phosphate à avoir été identifié et ce, à partir d'une collection d'ADNc de cortex rénal de lapin (Werner *et al.*, 1991). Ses homologues humains et murins furent découverts peu après (Chong *et al.* 1993 et 1995).

SLC17A1 a une expression préférentielle au niveau du tubule rénal proximal et du foie. Sa fonction physiologique a longtemps été une inconnue quant au phosphate car il pourrait en réalité être dédié au transport de divers anions dont l'urate, le chlorate ou encore des xénobiotiques anioniques, en tant que transporteur anionique polyspécifique voltage dépendant (Miyamoto *et al.* 2011). Concernant le phosphate, il pourrait plus avoir un rôle de modulation du transport de phosphate rénal plutôt que de pur cotransporteur Na⁺/Pi (Miyamoto *et al.* 2011). Dans des études menées dans des ovocytes de xénope, il a été montré

que SLC17A1 produisait un transport électrogène de phosphate mais uniquement en présence de concentrations très élevées de Pi extracellulaire (>3 mM). Son affinité au phosphate est relativement faible et son expression n'est pas modulée par les acteurs clés de l'homéostasie du phosphate tels que l'hormone parathyroïde (PTH) ou la concentration locale en phosphate (Biber *et al.*, 1993).

En revanche, l'expression de SLC17A1 au niveau hépatique semble être liée au métabolisme du glucose (modifications de son expression sous influence de l'insuline, du glucagon et de l'AMPc). Récemment, il a été montré que SLC17A1 est un transporteur d'urate couplé au transport de chlore (Iharada *et al.* 2010), et que des mutations de SLC17A1 sont corrélées à l'apparition de la goutte (Hollis-Moffatt *et al.* 2012, Chiba *et al.* 2015). Afin de comprendre la contribution de SLC17A1 dans la régulation de l'homéostasie du phosphate, des souris invalidées pour le gène *Slc17a1* ont été étudiées. Ces souris présentent des niveaux de calcium et de phosphate plasmatiques physiologiques.

4.2.1.2 Les transporteurs SLC34

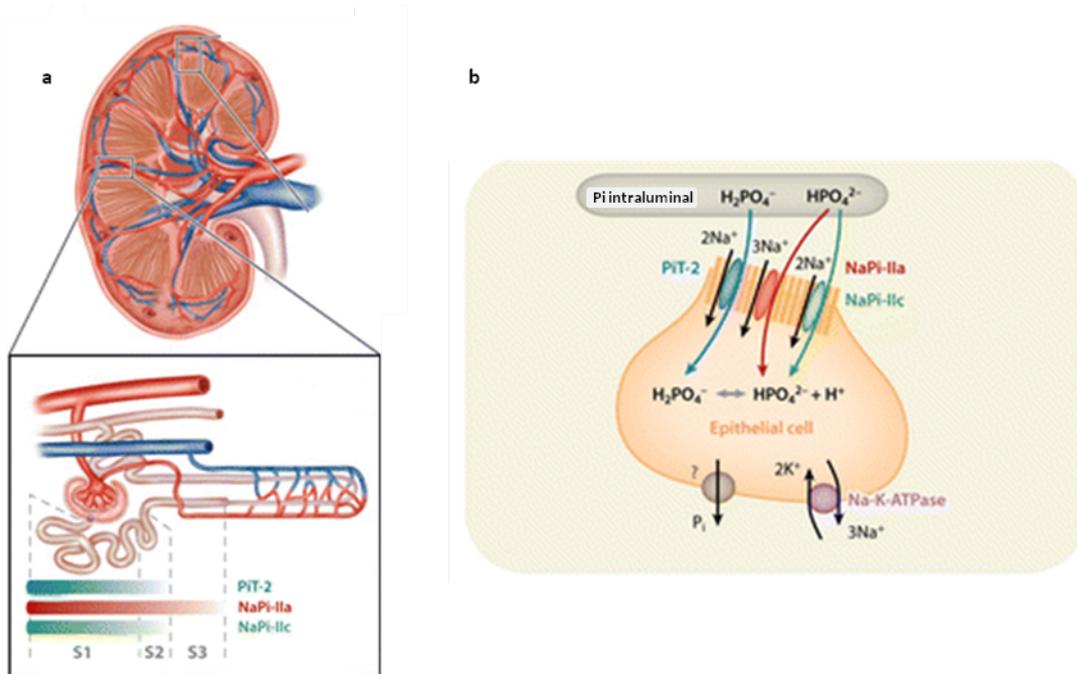


Figure 28 : Représentation de la distribution et la localisation des transporteurs de phosphate dans le tissu rénal d'après (Biber *et al.* 2013). (a) Coupe d'un rein et localisation de SLC20A2 (PIT2), SLC34A1 et SLC34A3 au niveau des segments des tubules proximaux. (b) Représentation schématique du flux de phosphate (sous forme mono ou divalent) au sein d'une cellule épithéliale rénale.

Il existe trois paralogues du cotransporteur sodium phosphate de la famille SLC34 (SLC34A1, SLC34A2 et SLC34A3), qui transportent préférentiellement les ions phosphates divalents (HPO_4^{2-}).

4.2.1.2.1 SLC34A1/Npt2a/NaPi-IIa

SLC34A1 a été cloné en 1993 par Magagnin *et al.* à partir de cortex rénal humain.

SLC34A1 est principalement exprimé dans les tubules proximaux du rein (Figure 28), au niveau de la membrane apicale des cellules rénales. Son expression est plus élevée au niveau du segment S1 mais s'étend à S2/S3 lors d'une diminution de la concentration en phosphate (Figure 28). L'ARN messager de SLC34A1 a également été détecté dans l'os et le cerveau, mais son expression protéique dans ces tissus n'a pas été confirmée (Wagner *et al.* 2014).

Ce cotransporteur de phosphate est le responsable principal (70-80%) de la réabsorption du Pi au niveau des tubules rénaux proximaux. A pH 7.4, SLC34A1, SLC34A2 et SLC34A3 présentent une affinité quasi identique pour leur substrat : $100\mu\text{M}$ pour le Pi et 40 mM pour le Na^+ . Ces valeurs sont plus faibles que la concentration physiologique trouvée dans les tubules rénaux proximaux, donc ces protéines fonctionnent à taux plein, au moins dans le segment S1. SLC34A1 et SLC34A2 sont électrogéniques (stoechiométrie $\text{Na}^+\text{-Pi}$ 3 :1), tandis que SLC34A3 est électroneutre (stoechiométrie $\text{Na}^+\text{-Pi}$ 2 :1). Cette différence de stoechiométries signifie que SLC34A1-2 ont la capacité de concentrer en théorie cent fois plus de Pi que SLC34A3, avec une entrée d'ions Na^+ dix fois plus forte que SLC34A3 et un flux de charges qui doit être compensés par l'activité de la $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ (Virkki *et al.* 2007) (Figure 28).

Le KO de *Slc34a1* chez la souris entraîne d'importants troubles du métabolisme du phosphate (Beck *et al.* 1998) : la réabsorption rénale de Pi est fortement réduite, ce qui résulte en une hyperphosphaturie et une hypophosphatémie. Les concentrations sériques en Vitamine D_3 et en calcium sont augmentées et une hypercalciurie est également observée. Une étude récente réalisée *in vitro* montre une absence d'anomalie au niveau osseux des souris *Slc34a1*^{-/-} (Albano *et al.* 2015) mais des études *in vivo* montrent que ces souris présentent des modifications modestes de leur phénotype osseux (Beck *et al.* 1998, Gupta *et al.* 2001). L'expression de ce transporteur est stimulée dans le cadre d'un régime pauvre en Pi, et inversement, elle est inhibée en présence d'un régime riche en Pi, de PTH et de FGF-23 (Segawa *et al.* 2009).

Chez l'Homme, les mutations touchant SLC34A1 causent le syndrome autosomal récessif de Fanconi, caractérisé par un rachitisme hypophosphatémique (Magen *et al.* 2010).

4.2.1.2.2 SLC34A2/Npt2/ NaPi-Iib

SLC34A2 a été identifié à partir d'intestin grêle humain par Hilfiker *et al.* en 1998 et Feild *et al.* en 1999.

L'expression tissulaire de SLC34A2 est principalement pulmonaire, et intestinale, mais son expression a aussi été détectée au niveau de nombreux organes dont le rein, la prostate, le pancréas ou encore la glande mammaire et les testicules (Wagner *et al.* 2014). Au niveau de l'intestin grêle, cette protéine est retrouvée au niveau de la bordure en brosse (luminale), dans le duodénum et le jéjunum chez le rat et l'Homme, et dans l'iléum principalement chez la souris.

SLC34A2 est le responsable principal de l'absorption intestinale de phosphate (Sabbagh *et al.* 2009). L'expression de ce transporteur est stimulée dans le cadre d'un régime pauvre en Pi, et inversement, elle est inhibée en présence d'un régime riche en Pi. Le 1,25-dihydroxyvitamine D3 stimule l'expression intestinale de SLC34A2 (Segawa *et al.* 2009).

Les souris knock-out pour *Slc34a2* ne sont pas viables (Shibasaki *et al.* 2009). La délétion par recombinaison homologue de ce gène chez des souris adultes entraîne une calcification pulmonaire et une absorption réduite de phosphate.

SLC34A2 semblerait être fortement impliqué dans le développement de pathologies microlithiasiques pulmonaires et testiculaires chez des patients présentant des mutations pour ce gène (Corut *et al.*, 2006).

4.2.1.2.3 SLC34A3/Npt2c/ NaPi-IIc

SLC34A3 a été le plus récemment identifié (Segawa *et al.* 2002). Son expression serait exclusivement rénale, et particulièrement au niveau de la bordure en brosse des cellules du tubule proximal (segment S1) (Wagner *et al.* 2014) avec un rôle important lors de la croissance. D'autre part, la mutation de *SLC34A3* chez l'homme entraîne le rachitisme appelé HHRH (Hereditary hypophosphaturic rickets with hypercalciuria) (Lorenz-Depiereux *et al.* 2006, Bergwitz *et al.* 2006, Ichikawa *et al.* 2006). Cette pathologie s'explique par une diminution d'absorption rénale du phosphate, conduisant à des défauts de croissance et de minéralisation osseuse. En contrepartie, la synthèse de la 1,25-OH₂ Vitamine D3 augmente ce qui stimule l'absorption intestinale de phosphate et de calcium, et entraîne une excrétion prononcée de calcium dans les urines, qui sera à l'origine de néphrolithiase et de néphrocalcinose (Segawa *et al.* 2009). En revanche, la souris KO pour *Slc34a3* ne présente

pas ce phénotype. Il semblerait donc que, chez l'homme, SLC34A3 soit plus important dans l'homéostasie du phosphate que chez la souris. Seules les souris double knock-out pour *Slc34a1/Slc34a3* présentent les caractéristiques similaires aux patients HHRH (Segawa *et al.* 2009). Nous voyons ici les limites des modèles murins pour analyser la physiopathologie humaine.

4.2.1.3 Les transporteurs SLC20

SLC20A1 et SLC20A2 sont exprimés de manière dite ubiquitaire et sont supposés avoir des fonctions de régulation de l'entrée du Pi dans les cellules (protéines de ménage ou "housekeeping") (Miyamoto *et al.* 2011). Néanmoins, leur expression et fonction semblent varier en fonction du tissu et du type cellulaire étudiés.

4.2.1.3.1 SLC20A1/PiT1

SLC20A1 a d'abord été identifié comme récepteur viral (O'Hara *et al.* 1990), tout comme SLC20A2. Toutefois, la fixation d'un rétrovirus sur une protéine n'indique en rien sa fonction physiologique. Ce n'est que plus tard qu'il a été montré qu'ils appartenaient à la famille des transporteurs de phosphate chez les mammifères.

La protéine SLC20A1 présente avec SLC20A2 une homologie de séquence. La protéine SLC20A1 est une protéine à douze domaines transmembranaires possédant une large boucle intracellulaire entre les septième et huitième segments transmembranaires (Figure 29). SLC20A1 et SLC20A2 ont une affinité plus élevée pour les phosphates monovalents et leur activité est plus forte à pH acide, néanmoins cette variation d'activité reste modeste. Ceci pourrait suggérer que ce sont ces transporteurs de phosphate qui assurent le transport de phosphate dans des conditions où les transporteurs de phosphate de type II ne sont pas fonctionnels (Biber *et al.* 2013). SLC20A1 est un transporteur à haute affinité pour le Pi ($K_m = 25 \mu\text{M}$) mais à faible capacité de transport (Olah *et al.* 1994). Cette caractéristique, couplée au fait que SLC20A1 transporte majoritairement la forme acide de l'ion phosphate (H_2PO_4^-) présent en minorité dans les fluides biologiques, le caractérise comme un transporteur ayant de faibles capacités de transport, saturé dans les conditions physiologiques (environ 1 mM de PO_4 , pH 7.4).

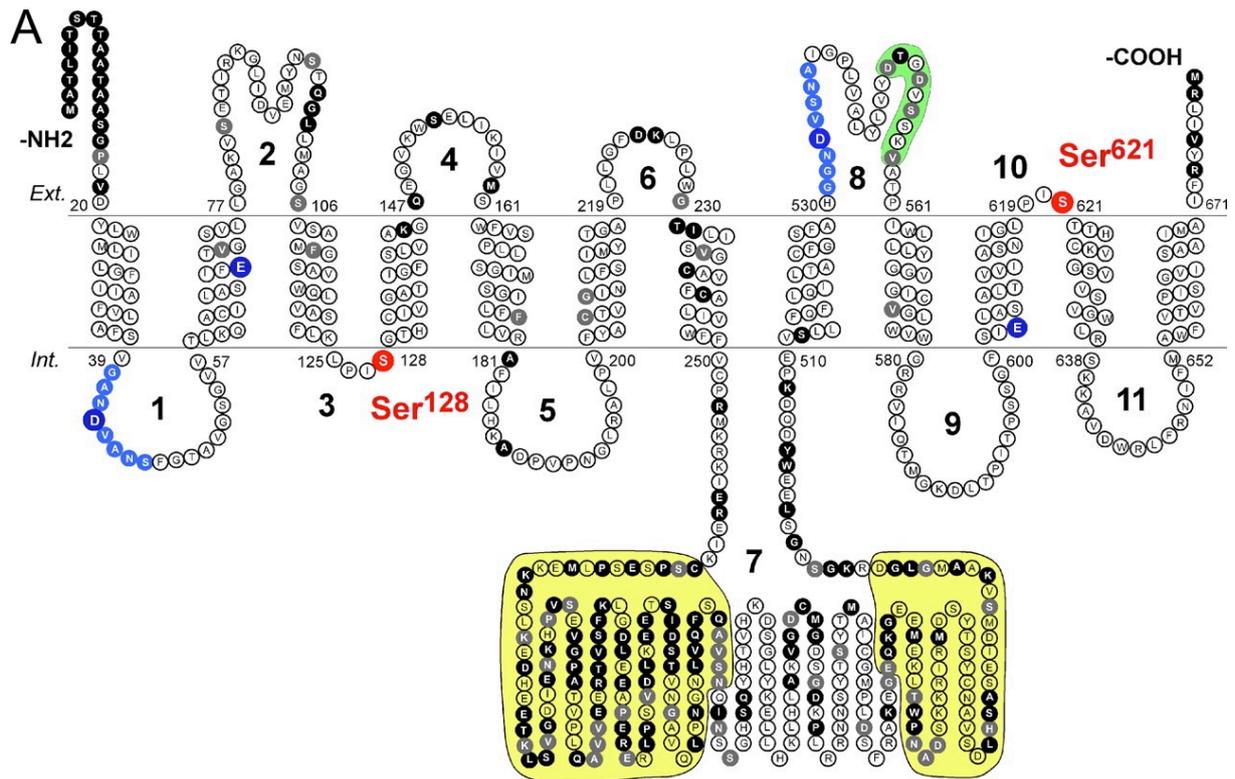


Figure 29 : Représentation de la protéine SLC20A1. Beck *et al* 2009

SLC20A1 est exprimé dans un grand nombre d'organes et ce n'est que plus tard que sa fonction de transporteur de phosphate a été mise en évidence (Kavanaugh *et al.* 1994). Dans des ovocytes de Xénope exposés à différents sels et nutriments, Kavanaugh et coll ont montré que le phosphate inorganique (Pi) était transporté de manière spécifique en présence d'ions Na⁺. Souvent décrit comme simple transporteur de phosphate ubiquitaire (Kavanaugh *et al.* 1994) responsable de l'homéostasie cellulaire du Pi avec SLC20A2, il semble avoir un rôle dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Beck *et al.* 2009 et 2010; Salaun *et al.* 2010), indépendamment de ses fonctions de transport, en plus de son rôle de récepteur viral. Certaines études *in vitro* suggèrent un rôle important possible de SLC20A1 dans la physiologie osseuse. SLC20A1 est régulé par le phosphate extracellulaire, l'épinéphrine, le TGF α , le facteur de croissance IL1 et la BMP2 dans les cellules ostéoblastiques *in vitro*, permettant de penser que SLC20A1 serait associé à la différenciation ostéoblastique (Khosniat *et al.*, 2010). D'autre part, SLC20A1 semble impliqué dans la différenciation des cellules chondrogéniques, aux stades embryonnaires, *via* son activité de transport de phosphate (Wang *et al.* 2001). De façon intéressante, il a été montré *in vitro* que SLC20A1 serait l'un des responsables de l'accumulation de Pi dans les vésicules matricielles nécessaires à la calcification des tissus minéralisés (Guicheux *et al.* 2000; Palmer *et al.* 1999).

D'autres investigations sont nécessaires pour appréhender le rôle de ce transporteur et déterminer son implication fonctionnelle dans différentes cellules telles que les ostéoclastes (Albano *et al.* 2015). Sa fonction de transporteur de Pi, son expression dans les tissus squelettiques et sa régulation suggèreraient donc que SLC20A1 est LE transporteur de phosphate essentiel à la minéralisation des tissus squelettiques. De plus, SLC20A1 est également impliqué dans des phénomènes de minéralisations pathologiques de cellules musculaires lisses vasculaires (Giachelli *et al.* 2005). De récentes études lui ont également attribué un rôle dans la prolifération cellulaire (Beck *et al.* 2009, Forand *et al.* 2013) et le développement embryonnaire (Beck *et al.* 2010).

Afin de mieux comprendre le rôle de SLC20A1 *in vivo*, des souris knock-out pour *Slc20a1* ont été créées par deux groupes différents. Les embryons de ces souris présentent de sévères anémies et ne sont pas viables. Le KO de SLC20A1 chez la souris est létal au stade embryonnaire (E12.5). Les embryons KO présentent un développement hépatique anormal suite à une anémie sévère et une apoptose massive, avec une prolifération cellulaire réduite, entraînant une grave anémie au niveau hépatique, ainsi qu'un retard de croissance. La létalité *in utero* des embryons *Slc20a1*^{-/-} empêche l'analyse du rôle physiologique de SLC20A1 dans les tissus squelettiques. Toutefois, notre équipe a également généré des souris hypomorphes pour *Slc20a1*, c'est-à-dire n'exprimant que 15 % de l'ARN messager de *Slc20a1*, suffisant pour permettre la survie des animaux (Beck *et al.* 2010). Notre équipe a montré que ces souris présentent un retard de minéralisation du squelette pendant les 15 premiers jours de vie après la naissance, mais qui est rapidement compensé avec l'âge (Bourguin *et al.* 2013). Ce retard entraîne une réduction de la longueur du fémur de 6 % observable jusqu'au 30^{ème} jour après la naissance. Cependant, malgré les différentes analyses effectuées (notamment, histomorphométrie et histologie), aucune différence de minéralisation du squelette n'a pu être mise en évidence dans la période allant du 15^{ème} au 300^{ème} jour après la naissance. Notre équipe a ainsi proposé que *Slc20a1* puisse être impliqué dans le développement précoce du squelette. Néanmoins, ce modèle animal présente des limitations majeures puisque les souris hypomorphes pour *Slc20a1* sont anémiques et présentent une surexpression de *Slc20a2* (le paralogue de *Slc20a1*) empêchant l'interprétation claire du phénotype observé.

4.2.1.4 SLC20A2/PiT2

Egalement identifié comme récepteur viral dans un premier temps (Kaelbling *et al.* 1991), SLC20A2 (PiT2 ou Ram-1, Amphotrophic Murine Leukemia Virus (MuLV) Receptor

1) partage avec SLC20A1 certaines de ses fonctions cellulaires, et probablement physiologiques. L'expression de SLC20A2 est retrouvée dans un grand nombre d'organes, et notamment dans le cerveau, mais les informations manquent encore sur son activité. Son expression varie selon le type de tissu et de cellule étudiés.

A l'heure actuelle, le rôle physiologique de SLC20A2 est encore controversé. Villa-Bellosta *et al.* ont émis l'hypothèse que SLC20A2 aurait un rôle dans la réabsorption rénale du phosphate (Villa-Bellosta et Sorribas, 2010) au niveau des tubules proximaux. En effet, lors d'une acidose et d'une déprivation en Pi, Villa Bellosta et Sorribas ont montré qu'il existait une régulation compensatrice très modeste de SLC20A2 avec SLC34A1, principal acteur rénal du phosphate. De plus, au vu de ses capacités de transport de phosphate, cette hypothèse nous semble peu probable. La fonction physiologique de SLC20A2 n'est pas clairement élucidée mais une hypothèse intéressante l'implique dans la détection du phosphate extracellulaire en tant que récepteur, au vu de sa haute affinité au phosphate. Cette fonction a été décrite dans deux études de Salaun *et al.* (2002, 2004), montrant que cette réponse au phosphate est également indépendante de la fonction de transport de SLC20A2.

Contrairement à l'accumulation de données suggérant le rôle essentiel de SLC20A1 dans l'étiologie des calcifications vasculaires (Giachelli 1998), des données récentes ont identifié SLC20A2 comme l'acteur majeur dans ce processus (Giachelli 2004). De nouveau, une étude montre SLC20A1 et SLC20A2 avec des rôles redondants, ici dans les calcifications induites par le phosphate dans les VSMC (Crouthamel *et al.* 2013).

En accord avec ces données, des études récentes ont montré qu'une mutation autosomale dominante de *SLC20A2* est impliquée dans la maladie de Fahr (familial idiopathic basal ganglia calcification), caractérisée par des calcifications cérébrales au niveau du ganglion basal (Wang *et al.* 2012, Hsu *et al.* 2013). Aucun phénotype osseux n'est décrit dans cette pathologie à ce jour. Ces mêmes caractéristiques sont trouvées chez des souris invalidées pour *Slc20a2* (Jensen *et al.* 2013) et notre équipe, associée à deux équipes anglaises du Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge) et de l'Imperial College (Oxford), travaille à décrire le phénotype des tissus minéralisés des souris mutées.

Les données disponibles dans la littérature sur les cotransporteurs sodium phosphate lors de l'odontogenèse seront exposées dans la section suivante.

4.2.2 Importeurs de phosphate sodium dépendants basse affinité haute capacité

L'identité de ce type de transporteurs de phosphate ne sont pas moléculairement connus néanmoins des études déduisent leur existence de l'absence des transporteurs haute affinité basse capacité. Les propriétés de ces deux types de transporteurs de phosphate sodium-dépendant sont différentes. Ainsi, les transporteurs haute affinité, faible capacité sont inhibés de manière compétitive par 1mM d'acide phosphonoformique (PFA) et leur action est complètement inhibée à 20mM de PFA. En revanche, les transporteurs faible affinité et haute capacité sont insensibles face à 1 mM de PFA, et ils sont inhibés de manière compétitive à 20mM de PFA (Tenenhouse *et al.* 1989).

Bien que leurs propriétés aient été mises en évidence, la nature et le rôle exacts de ces transporteurs à faible affinité haute capacité restent à être élucidés. Ils ont néanmoins été décrits comme étant exprimés au niveau du rein (Barac-Nieto *et al.* 2001) et n'ont pas été étudiés dans les tissus minéralisés.

4.3 Importeurs de phosphate sodium indépendant

Des études ont été menées sur l'entrée de phosphate au niveau des bordures en brosse des cellules du tissu médullaire rénal en l'absence de sodium à 21°C et à pH 8. L'existence de transporteurs de phosphate sodium-indépendant a été mise en évidence par ce biais (Quamme *et al.* 1989).

Des études plus récentes menées sur des cellules ostéoclastiques ont montré que l'entrée de phosphate au sein de ces cellules était couplée à une acidification du milieu (Ito *et al.* 2007). Les caractéristiques fonctionnelles de ces transporteurs ont été grandement étudiées dans différents types cellulaires, mais leur identité moléculaire reste à déterminer. Une équipe a tenté d'identifier ces molécules dans un modèle *in vitro* de cellules intestinales mais les caractéristiques d'import de phosphate sodium indépendant décrites dans ce modèle ne correspondaient ni aux cotransporteurs de phosphate Na Pi (SLC17, SLC34, SLC20) ni à aux transporteurs anioniques multifonctionnels SLC26 (Candéal *et al.* 2014).

4.4 Exporteur de phosphate, XPR1

Le modèle de transport reconnu dans les cellules épithéliales consiste en une entrée de phosphate par un mécanisme actif secondaire *via* des cotransporteurs NaPi au niveau de la membrane apicale comme décrit précédemment, et une sortie passive de phosphate sodium-indépendant au niveau de la membrane basolatérale. Les cellules épithéliales étant polarisées,

l'entrée du phosphate est importante, mais sa sortie également. Or ce phénomène n'a été que peu étudié.

L'un des candidats possibles est la protéine XPR1, qui est une protéine membranaire identifiée originellement en tant que récepteur pour des rétrovirus. Il a été montré qu'une surexpression de XPR1 dans des cellules ostéoclastiques induisait une sortie de phosphate, alors qu'à l'inverse, un knock-down de cette protéine diminuait la sortie de phosphate des cellules de mammifères (Giovannini *et al.* 2013). Par ailleurs, des mutations sur le gène codant pour *XPR1* et conduisant à une perte de fonction de cette protéine ont récemment été corrélées à des cas de calcifications cérébrales primaires familiales (Legati *et al.*, 2015). Ainsi des mutations de XPR1 et SLC20A2 conduisent au même phénotype chez l'Homme. On peut imaginer ainsi SLC20A2 important le Pi à un pôle d'une cellule vasculaire et XPR1 à l'autre pôle exportant le Pi, la mutation de l'un ou de l'autre conduisant au même phénotype par blocage du flux de Pi : cette théorie n'a jamais été montrée. De façon générale, l'implication physiologique de XPR1 n'est pas encore clairement élucidé.

Dans le chapitre suivant, nous nous focaliserons ci après sur les données actuelles concernant les transporteurs de phosphate identifiés (les cotransporteurs sodium phosphate et XPR1) et leur rôle dans l'odontogenèse.

5 EXPRESSION ET IMPLICATION FONCTIONNELLE DES TRANSPORTEURS DE PHOSPHATE DANS L'ODONTOGÉNÈSE

De nombreuses données sont disponibles sur le transport et le rôle du calcium au cours de la minéralisation dentaire, en revanche, le phosphate n'a été que peu étudié. Nous nous attacherons donc à faire le point sur l'expression des transporteurs de phosphate et leur rôle potentiel au cours de l'odontogénèse. Les seuls transporteurs ayant été identifiés sont les transporteurs de phosphate sodium dépendants et nous les étudierons ci après, ainsi que XPR1. Les données sont néanmoins incomplètes et souvent contradictoires et nécessitent donc d'être confirmées.

Les tissus osseux et dentaires partageant un certain nombre de caractéristiques communes et les mécanismes de transport présents étant similaires, il est intéressant d'établir un parallèle entre ces deux tissus.

Au niveau histologique, les possibilités de transfert des ions sont différentes selon les tissus. En effet, les cellules minéralisantes de la dentine, du cément et de l'os sont en contact étroit avec les capillaires au travers de jonctions cellulaires lâches alors que les améloblastes sont séparés du flux sanguin par le *stratum intermedium*, le *reticulum stellaire* et l'épithélium dentaire externe avec des jonctions serrées. Néanmoins une compensation de cette distance avec le flux sérique des ions est apportée par des vaisseaux sanguins s'invaginant dans l'épithélium dentaire externe et par l'interruption locale du *stratum intermedium*, permettant un « rapprochement » des capillaires avec les améloblastes (Ten Cate Oral Histology).

5.1 SLC17A1/Npt1

SLC17A1 n'a pas été étudié *in vivo* lors de la formation de la dent et une étude montre par PCR qu'il n'est pas exprimé *in vitro* dans des cultures primaires de cellules pulpaire humaines (Tada *et al.*, 2011).

5.2 SLC34A1/Npt2a

Slc34a1 a été étudié *in vitro* par PCR et par Western Blot dans la lignée cellulaire MRPC-1 (Mineralizing Rat Pulpal Cell line 1) où il est fortement exprimé avec une modulation positive par l'adjonction de 4mM de phosphate (Lundquist *et al.* 2002), alors que *in vitro* chez la souris, son expression n'est pas visible par RT PCR et Northern Blot dans des germes dentaires (Onishi *et al.* 2007). Il n'est pas exprimé dans des cellules humaines

pulpaire en culture (Tada *et al.* 2011). Le transporteur a été détecté par immunohistochimie chez la souris à P10 au niveau des odontoblastes et des améloblastes (Lundquist *et al.* 2002). Les souris *Slc34a1*^{-/-} ne présentaient pas des modifications dentaires (Laurent Beck, communication personnelle) sauf dans le cas d'une seule souris (Figure 30) et nous n'avons pas d'indication de l'origine du phénotype visible sur cette photographie (Figure 30).



Figure 30 : Photographie des incisives d'une souris *Slc34a1*^{-/-} âgées de 3 semaines (Laurent Beck, donnée non publiée)

5.3 SLC34A2/Npt2b

Slc34a2 est exprimé fortement en PCR et Western Blot par les cellules MRPC-1 avec une modulation positive par l'adjonction de 4mM de phosphate, mais aussi *in vivo* chez la souris à P10 au niveau des améloblastes et des odontoblastes par immunohistochimie (Lundquist *et al.*, 2002). *Slc34a2* était exprimé en RT-PCR et Northern Blot à partir de germes dentaires murins à 2, 6 et 10 jours *post partum* (Onishi *et al.* 2007). La même étude montre en hybridation *in situ* chez la souris à P6 une expression de *Slc34a2* des améloblastes sécréteurs et matures, ainsi que dans les odontoblastes différenciés sécréteurs (Onishi *et al.* 2007). De plus, Lacruz *et al.* (2012) ont montré par puce ADN une expression 64 fois plus importante dans les améloblastes en phase de maturation par rapport aux améloblastes sécréteurs d'incisives de rats adultes, les autres transporteurs de phosphate n'ayant pas présenté de modification majeure de leur expression entre ces deux phases. Par ailleurs, son

expression n'est pas visible par PCR dans des cultures primaires de cellules humaines pulpaire (Tada *et al.* 2011).

5.4 SLC34A3/Npt2c

L'expression de SLC34A3 n'a pas été détectée chez la souris par PCR dans des germes dentaires (Onishi *et al.* 2007) et n'est pas visible par PCR dans des cellules humaines pulpaire en culture ou dans les données Affymetrix GEO Profiles (Barrett *et al.* 2011).

5.5 SLC20A1/Pit1

SLC20A1 est exprimé par les lignées cellulaires MRPC-1, MO6-G3 (Mouse Odontoblast cell line 6G3) (Wittrant *et al.* 2009) et dans des cellules humaines pulpaire issues de troisièmes molaires (Tada *et al.* 2011). Les rats mutants surexprimants *Slc20a1* présentent de façon intéressante des anomalies dentaires, notamment au niveau de l'émail tels que des hypoplasies et retard de minéralisation amélaire (Figure 31) (Yoshioka *et al.* 2011).

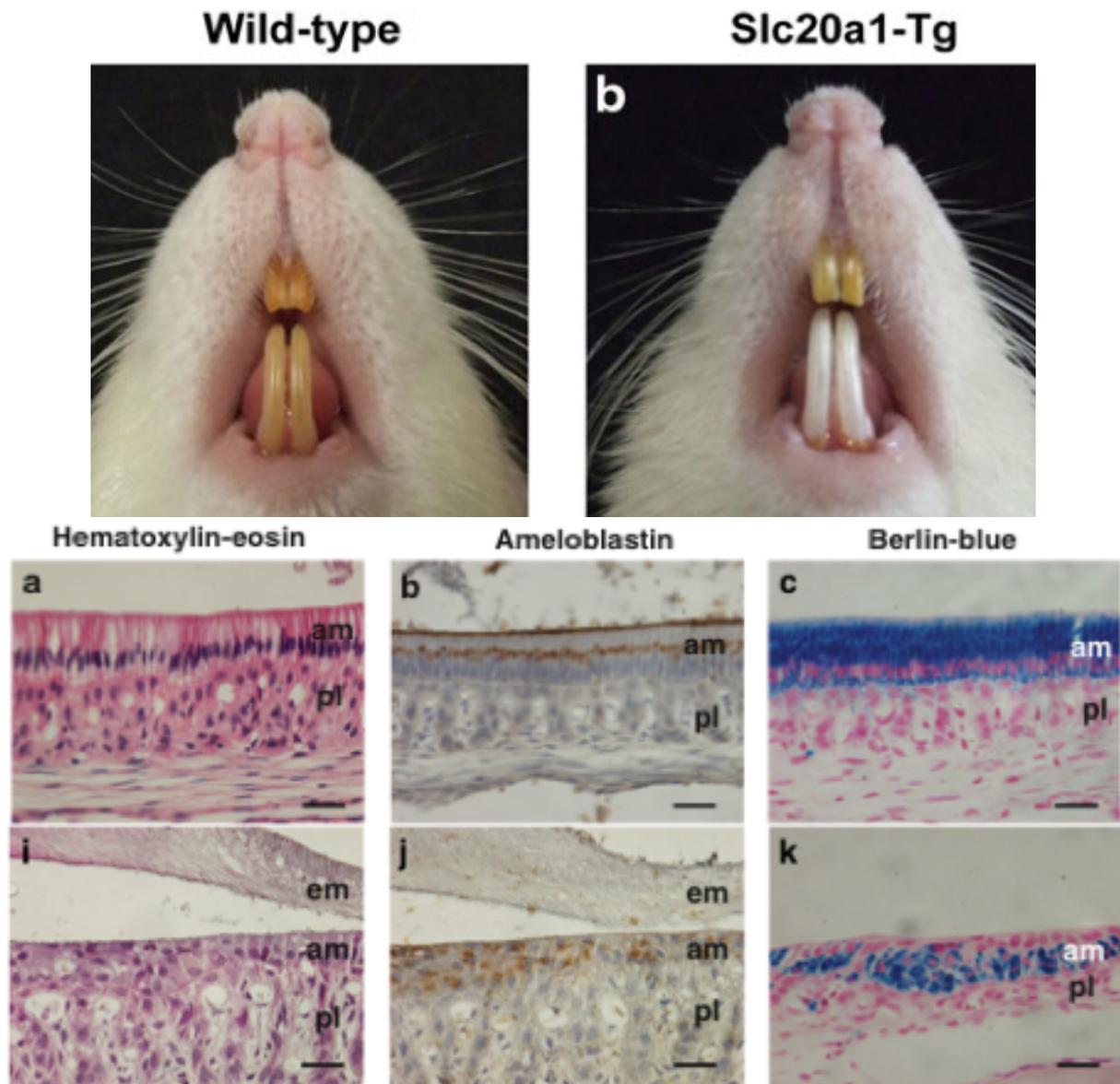


Figure 31 : La surexpression de *Slc20a1* entraîne des anomalies amélaire chez des rats transgéniques (8 mois) avec des modifications de l'organisation cellulaire et de l'expression de l'améloblastine. Les macrophotographies montrent à 8 mois un défaut de pigmentation amélaire (liée au dépôt de fer) notamment à la mandibule et une attrition/fracture plus sévère chez les animaux mutants, malgré une superficie normale. L'analyse histologique et immunohistochimique montre à 8 mois une désorganisation de la couche améloblastique des rats mutants (i,j,k) par rapport aux rats sauvages (a,b,c). Les auteurs suggèrent que *Slc20a1* interagisse avec l'améloblastine, une protéine de la matrice amélaire fonctionnant comme une molécule d'adhésion cellulaire. Ce phénotype n'était pas visible chez les animaux plus jeunes. Issu de Yoshioka *et al.* 2011

5.6 SLC20A2/PiT2

L'étude de Zhao *et al.* (2006) montre une expression de Slc20a2 lors de la formation dentaire à divers temps et localisations en hybridation *in situ* (Figure 32). D'autre part, il a été montré *in vitro* que SLC20A2 est exprimé dans des cellules humaines pulpaire issues de troisièmes molaires. Enfin, Slc20a2 est fortement exprimé dans les cellules MRPC-1 et son expression présente des résultats similaires à ceux obtenus pour Slc20a1 dans les cellules MO6-G3 (Bourgine *et al.*, 2011; Wittrant *et al.*, 2009).

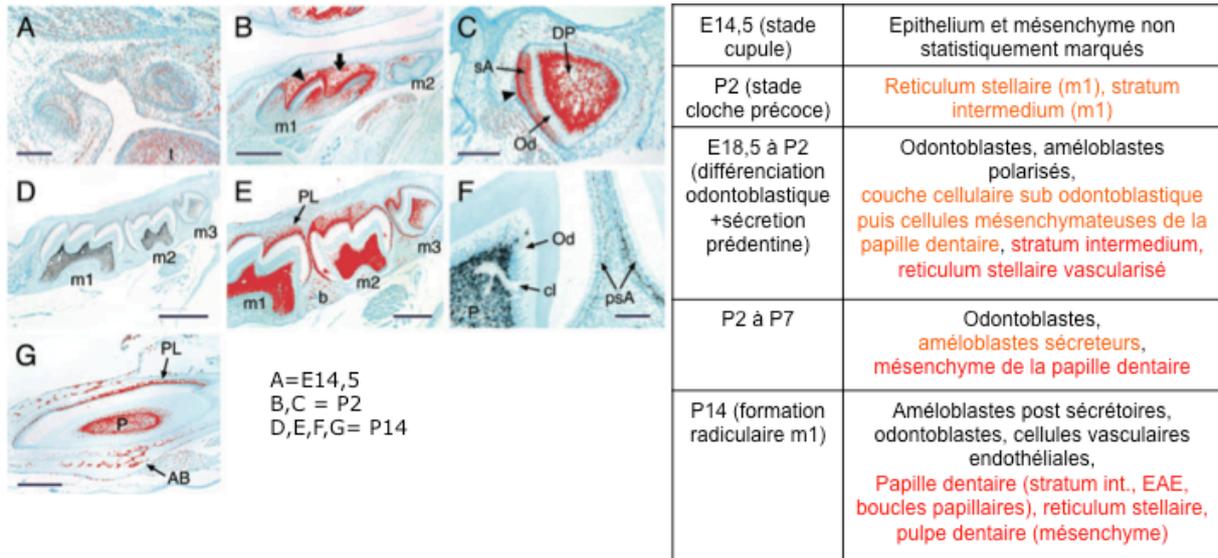


Figure 32 : Résumé des résultats obtenus par hybridation *in situ* pour Slc20a2 chez la souris de E14,5 à P14 (Zhao *et al.* 2006)

Tableau V. Synthèse des données actuelles concernant les transporteurs de phosphate dans les cellules et tissus dentaires

	<i>In vitro</i>			<i>In vivo</i>				
	Odontoblastes			Souris sauvages			Rats	
	MRPC-1 (rat)	MO6-G3 (souris)	Cellules pulpaires différenciées (homme)	E11.5 à P14	P2-6-10	P10	Améloblastes sécréteurs/ matures	SLC20A1-Tg
SLC17A1			- (PCR)					
SLC34A1	+ (WB/PCR)		- (PCR)		- (PCR)	+ (IHC)		
SLC34A2	+ (WB/PCR)		- (PCR)		+ (HIS)	+ (IHC)	Modification d'expression	
SLC34A3			- (PCR)		- (PCR)			
SLC20A1		+ (PCR)	+ (PCR)					Hypoplasie amélaire
SLC20A2		+ (PCR)	+ (PCR)	++ (HIS)				
	Lundquist <i>et al.</i> , 2002	Wittrant <i>et al.</i> 2009 ; Bourguine <i>et al.</i> , 2011	Tada <i>et al.</i> , 2011	Zhao <i>et al.</i> , 2006	Onishi <i>et al.</i> , 2007	Lundquist <i>et al.</i> , 2002	Lacruz <i>et al.</i> 2012	Yoshioka <i>et al.</i> 2011

Nous voyons avec ce tableau récapitulatif suite à l'exposé des connaissances actuelles sur la biominéralisation que si des transporteurs de phosphate sont nécessaires à l'élaboration des tissus minéralisés dentaires, tous les transporteurs de phosphate n'ont pas été étudiés et les transporteurs de phosphate connus (cotransporteurs de phosphate sodium dépendants) semblent certes être de bons candidats théoriques mais qu'ils n'ont pas été étudiés de manière exhaustive, dans des modèles pertinents physiologiquement, au cours de la minéralisation dentaire. Les données dont nous disposons sont parcellaires, hétérogènes et parfois contradictoires (SLC34A1 notamment). C'est sur ces constats que nous avons établi mes objectifs de thèse.

OBJECTIFS DE THESE

Dans le cadre de cette thèse intitulée « Phosphate et minéralisation dentaire : quel rôle pour les transporteurs de phosphate ? » et suite à mon analyse de la littérature, je me suis posé plusieurs questions :

- 1- Quels sont les transporteurs de phosphate présents lors du développement et de la minéralisation dentaire ? Sont ils identiques chez la souris et chez l'homme ?
- 2 – Ces transporteurs de phosphate ont ils un rôle dans le développement dentaire, dans la mise en place des tissus constituant l'organe dentaire embryologique ?
- 3 - Ces transporteurs de phosphate ont ils un rôle dans l'initiation de la minéralisation ?
- 4 - Ces transporteurs de phosphate ont ils un rôle dans la croissance cristalline ?
- 5 - Ces transporteurs de phosphate ont ils un rôle dans la maturation des tissus minéralisés ?

Afin de répondre à la première question, nous avons mis en place une étude intégrée de l'expression des transporteurs de phosphate (SLC17A1, SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3, SLC20A1, SLC20A2) dans plusieurs modèles :

- *in vitro* : culture cellulaire de lignées améloblastique et odontoblastique murines
- *in vivo* : analyse quantitative par qPCR à partir de germes dentaires murins et humains sur une cinétique large englobant l'ensemble des temps concernés par nos questions et analyse qualitative (par hybridation *in situ*, immunohistochimie, coloration X Gal) sur ces même temps.

Afin de répondre aux questions suivantes concernant l'implication fonctionnelle des transporteurs de phosphate, plusieurs modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont été développés au sein de l'équipe et/ou en collaboration, et analysés pour les plus pertinents d'entre eux quant aux pistes fonctionnelles.

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1 Souris

Les soins et l'entretien des animaux ont été réalisés à l'Unité de Thérapeutique Expérimentale, accréditée comme animalerie par l'Université de Nantes. Les souris étaient viables, fertiles et élevées normalement dans un fond génétique C57BL / 6N et ont été logées dans des conditions exemptes d'agents pathogènes spécifiques. Les souris ont été nourries avec un régime alimentaire RM1 pour l'entretien et avec RM3 pour l'élevage (SDS, Special Diets Services).

Les souris de type sauvage C57BL/6J ont été achetées chez Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France).

Les souris C57BL / 6NTac-Slc20a2 $\langle tm1a (EUCOMM) Wtsi \rangle / IEG (Slc20a2 +/-)$ ont été obtenues à partir de la European Mutant Mice Archive (EMMA).

Les souris DMP1 Cre (Figure 33) sont issues de la lignée décrite par Yu *et al.* (2007) et elles ont été croisées avec des souris PiT1^{lox/lox} ou PiT2^{lox/lox}. Elles permettent d'invalider PiT1 ou PiT2 spécifiquement dans les odontoblastes et les ostéocytes.

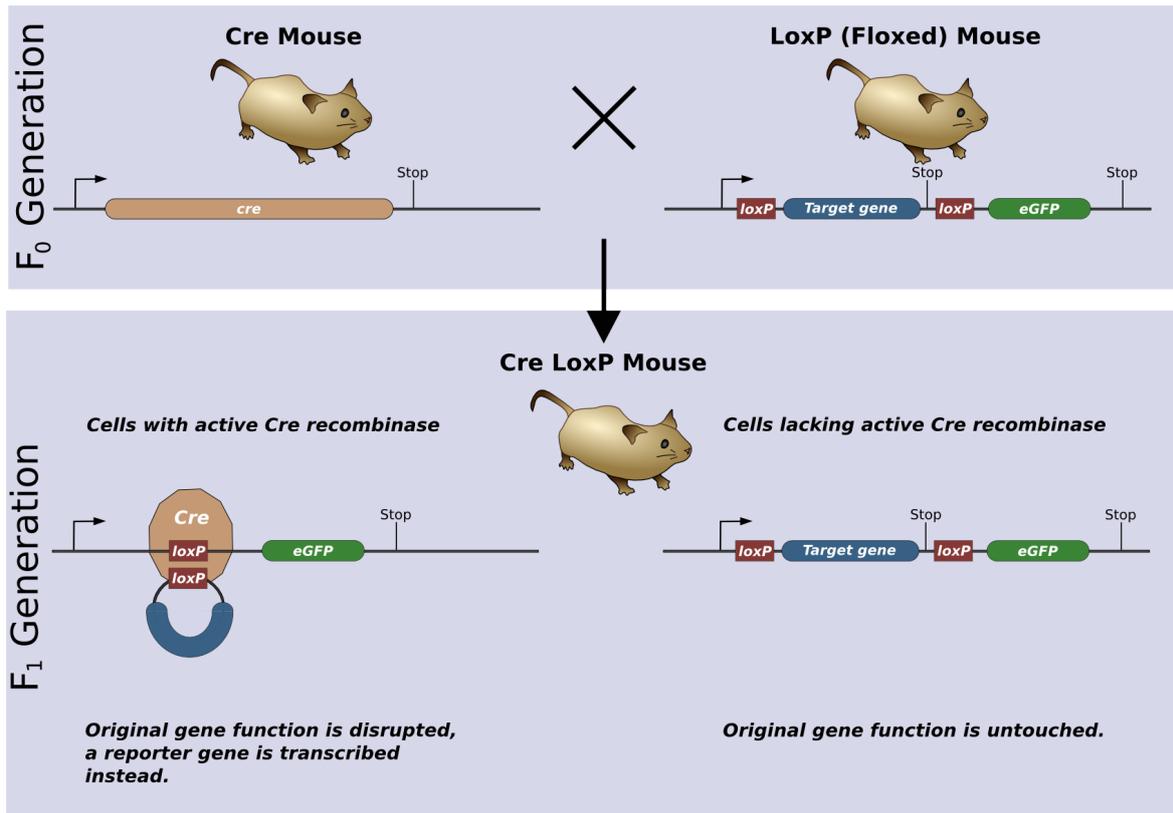


Figure 33. Schéma représentant le système CreLoxP (Matthias Zepper. Wikipedia)

Les expériences sur les souris ont été menées conformément à la réglementation française et européenne sur les soins et la protection des animaux de laboratoire (directive CE 86/609, à la loi française 2001-486 publiée le 6 Juin 2001) (projet # 02286.02).

2 Patients

Tous les patients ont été informés et ont donné leur consentement formel à cette étude, qui a respecté le Code de déontologie de l'Association médicale mondiale (Déclaration d'Helsinki) et en accord avec les lignes directrices éthiques fixées par la loi française (Loi n ° 2004-800 Bioéthique).

3 Tissus

J'ai utilisé des souris de type sauvage C57BL/ 6J du 12^{ème} jour embryonnaire (E12,5) jusqu'au 15^{ème} jour post natal (P15), le matin suivant l'accouplement (bouchon vaginal) se trouve être désigné E0,5. A chaque temps, des germes de premières molaires mandibulaires et des têtes entières ont été prélevés pour l'analyse qPCR ou histologique. Les reins, les poumons et le foie ont été récoltés à partir de souris mâles C57BL/6 âgées de 39 jours.

Les dissections de germes de molaires mandibulaires ont été réalisées comme décrit précédemment (Nait-Lechguer *et al.*, 2008) à partir d'embryons de E14,5 à 18,5 et de souriceaux de P1 à P15. Un total de 20 à 40 germes de premières molaires mandibulaires ont été utilisés pour chaque temps. Des échantillons de tête pour l'hybridation *in situ* et immunohistochimie ont été récoltés à partir de d'embryons C57BL/ 6J de type sauvage de E12,5 à E18,5 et de souriceaux âgés de P1 à P10. Ces échantillons ont été fixés dans 4% de paraformaldehyde dans du tampon phosphate salin (PBS, Life Technologies) pendant 24 à 48 heures en fonction de leur taille et ont ensuite été décalcifiés dans de l'EDTA 0,5 M pH 8 si nécessaire (échantillons après P3). Les échantillons fixés ont été inclus dans la paraffine en utilisant un automate(Leica TP1020, Allemagne). Des sections sériées de 5 µm d'épaisseur ont été obtenues à l'aide d'un microtome (Microtome 2050® - Reichert Jung, Allemagne). Les échantillons dentaires humains ont été prélevés sur des patients nécessitant l'extraction de molaires ou les germectomies de troisièmes molaires aux stades Nolla 6 à 9.

Pour l'étude de la lignée SLC20a2^{-/-}, les têtes de 9 souris âgées de 8 à 9 mois et de 18 souris mâles âgées de 1 mois, réparties en 3 groupes homogènes :sauvage, hétérozygote et KO, ont été disséquées et fixées dans 4% de paraformaldehyde dans du PBS(Life Technologies) pendant 48 à 72 heures en fonction de la taille, puis transférées dans une solution d'éthanol 70% pour l'acquisition microCT. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des bains d'éthanol croissants puis des bains d'acétone avant d'être inclus comme précédemment décrit au sein du laboratoire par Blery *et al.* (2015) en résine Technovit (Technovit 9100 NEW, Kulzer, Germany) en accord avec les instructions du fabricant.

4 Culture cellulaire

4.1 M2H4

Les cellules M2H4 sont une lignée cellulaire d'odontoblastes de rat, développée à partir de la lignée de cellules pulpaire RPC-C2A (Ritchie *et al.* 2002). Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture MEM additionné de 10% de SVF, de 1% d'un mélange de pénicilline / streptomycine et de 1% de L-glutamine dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé tous les 2 jours. Les cellules sont repiquées tous les 4 jours à environ 10⁵ cellules/cm². Pour obtenir une différenciation des odontoblastes et une minéralisation, comme précédemment décrit par Magne *et coll.* (2004), le MEM est remplacé lorsque les cellules sont à 80% de confluence par du α-MEM additionné de 3mM de

phosphate, ajouté au milieu de différenciation *via* une solution tampon de Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 à pH 7,3 et 0,1M.

4.2 ALC

La lignée cellulaire d'améloblastes murins (ALC) a été fournie par le Dr Gibson de la Penn Dental School de Philadelphie (USA) avec l'approbation du Docteur T. Sugiyama de l'Akita University Graduate School of Medicine (Japon). Elle provient de cellules améloblastiques de souris C57BL/6J immortalisées spontanément. Celles-ci maintiennent l'expression de plusieurs gènes (Amelogénine, Tufteline et Enaméline) lors des cultures à long terme (Nakata *et al*, 2003) et forment des nodules de calcification *in vitro* après induction.

Les cellules sont cultivées en plaques 6 puits coatées au collagène de type I dans un milieu de culture dit de prolifération, DMEM Glutamax High Glucose, additionné de 10% de SVF, de 1% d'un mélange de pénicilline / streptomycine et 10ng/mL de recombinant human Epidermal Growth Factor (rhEGF) dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO_2 . Avec l'aide d'Amandine David (étudiante en Master 1 Biologie Santé à Nantes), les conditions de culture des ALC ont été optimisées et l'induction de la minéralisation se fait après 3 jours de culture dans le milieu de culture dit de différenciation composé de MEM Glutamax High Glucose additionné de 5% de SVF, de 1% d'un mélange de pénicilline / streptomycine, de 10ng/mL de recombinant human EGF (rhEGF), de 50 g/mL d'acide ascorbique, de 4mM de β glycérophosphate et de 10^{-8} M de dexaméthasone dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO_2 . Le milieu est renouvelé tous les 2 jours. Nous avons souhaité améliorer les conditions d'induction de la minéralisation décrites par Nakata *et al* et nous avons testé les milieux suivants :

Milieu 1 : DMEM Glutamax High Glucose + 10% SVF + 1% P/S + 10ng/ml de rhEGF

Milieu 2 : DMEM Glutamax High Glucose + 5 % SVF + 2mM β glycérophosphate (BGP) + 50 μ g/ml acide ascorbique + 1% P/S + 10ng/ml de rhEGF

Milieu 3 : Milieu 2 + 1 μ g/ml d'Insuline Transferrine Selenite (ITS)

Milieu 4 : Milieu 2 + 10^{-8} M de dexaméthasone

Milieu 5 : alpha-MEM + 5% SVF + 2mM BGP + 50 μ g/ml acide ascorbique + 1% P/S +

10ng/ml de rhEGF

Milieu 6 : Milieu 5 + ITS (1ml de solution à 500µg/ml)

Milieu 7 : Milieu 5 + 10^{-8} M de dexaméthasone

Milieu 8 : Milieu 1 + disque d'ivoire d'éléphant (300µm d'épaisseur) (permettant de mimer l'interaction physiologique avec la dentine)

5 Coloration au rouge d'alizarine

Les dépôts de calcium dans les cultures cellulaires de M2H4 et d'ALC ont été détectés en utilisant une coloration au rouge d'alizarine comme précédemment décrit par Magne *et al.* (2004). En résumé, la matrice extracellulaire a été rincée au PBS froid puis colorée avec une solution à 2% de rouge d'alizarine pendant 2 minutes. Le tapis cellulaire coloré a été rincé 3 fois avec de l'eau pour éliminer toute coloration non spécifique. Les photographies ont été obtenues avec un microscope (Leica DFC 450C). Le rouge d'alizarine a ensuite été extrait grâce à une solution aqueuse à 20% de méthanol et 10% d'acide acétique. Après 15 minutes, le liquide a été transféré dans une plaque 96 puits et la densité optique de la solution extraite a été déterminée sur un spectrophotomètre (Victor3 1420 Multilabel Counter®) à une longueur d'onde de 450 nm.

6 qPCR

Concernant les tissus animaux et humaines, l'ARN total a été extrait en utilisant une combinaison de système TRIzol® (Ambion, Life Technologies) et kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Allemagne) : brièvement, des échantillons dentaires humains ou murins ont été écrasés en utilisant le système FastPrep® avec sphères de céramique, puis lysés à l'aide du TRIzol® system. Le surnageant a été filtré sur une colonne NucleoSpin ARN pour la fixation des acides nucléiques, les étapes suivantes ont respecté le protocole fabricant du système Nucleo Spin (Macherey Nagel). J'ai ensuite utilisé un spectrophotomètre UV pour quantifier les ARN obtenus (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, France). Une transcription inverse a été réalisée avec SuperScript®III (Life Technologies) conformément aux instructions du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée sur un Bio-Rad CFX96 utilisant le SYBR®Select Master Mix (Life Technologies). Le profil de température suivant a été utilisé : dénaturation initiale à 95 ° C pendant 3 minutes, suivie de 40 cycles de 5 secondes à 95 ° C et 20 secondes à 60 ° C. L'expression de gènes cibles ont été normalisés aux niveaux d'expression de GusBor ou de GAPDH et la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (seuil de cycle) a été utilisée pour

calculer les niveaux d'expression relatifs, comme décrit précédemment (Livak et Schmittgen, 2001). Les séquences des amorces utilisées dans cette étude sont énumérées dans le tableau de la publication soumise au JDR.

Les ARN issus des cultures de M2H4 et ALC sont extraits avec le kit NucleoSpin RNA II de Macherey-Nagel selon le protocole fourni par le fabricant. L'intégrité des ARN a été vérifiée soit par migration sur gel d'agarose 0,9% en TAE 1X soit par puce à ARN et Agilent Bioanalyser® et la concentration a été évaluée par spectrophotométrie (Nanodrop®). Les couples d'amorces nucléotidiques ont été commandées chez Eurofins MWG Operon. La RT PCR a été réalisée avec le Bio-Rad CFX96 et SYBR® Select Master Mix (Life Technologies). Les résultats ont été exprimés en expression relative après correction par la GAPDH ou GusB (β glucuronidase) et la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (cycle threshold) a été utilisée pour calculer les niveaux d'expression relative, comme décrit précédemment par Livak et Schmittgen (2001). Les séquences des primers sont indiqués dans l'article Merametdjian L. *et al* (2016).

7 Hybridation *in situ* (HIS)

Les coupes paraffine utilisées pour l'HIS ont été traitées comme décrit précédemment par Beck *et al.* (2010). Les sondes ont été générées à partir de cDNA rétrotranscrits et obtenus par qPCR. Les sondes ARN antisens et sens ont été marquées à la digoxigénine *via* un kit de transcription *in vitro* avec un promoteur T7 ou SP6, selon les instructions du fabricant (kit de marquage d'ARN DIG, Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Les cellules marquées ont été visualisées en utilisant un kit de détection d'acide nucléique DIG (Roche Applied Science), selon les instructions du fabricant. En bref, les coupes déparaffinées ont été traitées avec de la protéinase K (5 ug / ml) pendant 15 min à 37 ° C puis incubées avec 1 pg / ml de sonde marquée pendant une nuit à 50 ° C. Les coupes ont été ensuite traités avec de la RNase A (20 ug / ml) puis ont été lavées plusieurs fois avec une solution à 50% de formamide / 2 x SSC et 0,5 x SSC à 42 ° C. Les cellules marquées ont été visualisées en utilisant un kit de détection d'acides nucléiques DIG (Roche Applied Science), en utilisant du NBT / BCIP avec la coloration à la phosphatase alcaline, selon les instructions du fabricant. Un kit d'amplification pour l'HIS de SLC20A1 (TSA, Perkin Elmer, MA, USA) a été utilisé selon les instructions du fabricant. Les HIS contrôle ont été effectuées sur des reins, poumons ou du foie, selon les transporteurs étudiés. Les coupes ont été montées en solution aqueuse (Mowiol) et scannées à l'aide d'un scanner numérique Hamamatsu Nanozoomer HT (Hamamatsu Photonics KK) à un grossissement 40X.

8 Immunohistochimie (SLC34A2)

Les coupes paraffine ont été traitées comme décrit précédemment par Colombier *et al.*(2016). Dans les réactions immuno-chimiques, le retrait de l'antigène a été effectuée en utilisant 10 mM de tampon citrate pH 6 pendant 20 minutes à 95 ° C. Les sections ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps polyclonal primaire pour Slc34a2 (obtenu chez le lapin), aimablement fourni par le Pr Jurg Biber de l'Université de Zurich (peptide N-terminal MAPWPELENAQPNGK), à une dilution 1 : 300. L'anticorps secondaire anti-souris de chèvre biotinylé (Dako, France) a été utilisé à une dilution 1 : 300. La coloration a été réalisée en utilisant un chromogène de type diaminobenzidine (DAB). Les lames ont ensuite été montés avec le liquide de montage Eukitt® et numérisés à l'aide d'un scanner numérique Hamamatsu Nanozoomer HT (Hamamatsu Photonics KK) à un grossissement de 40X.

9 Coloration X Gal

Les échantillons pour les colorations X Gal ont été obtenus à partir de souris *Slc20a2LacZ* âgées de 1 mois. Les organes disséqués ont été fixés pendant 2 heures à température ambiante dans 4% de paraformaldehyde dans du PBS. Les organes ont été coupés en deux moitiés au bout de 30 minutes dans la solution fixative, afin d'améliorer la pénétration des solutions de fixateur et de coloration, puis retournés dans la solution de fixation pendant encore 30 min. Après fixation, les échantillons ont été rincés plusieurs fois avec du PBS et incubés pendant une nuit à 32 ° C dans une solution de coloration au X-Gal (PBS contenant 0,01% de Tween 20, 2 mM de MgCl₂, K₄Fe(CN)₆ à 4 mM, K₃Fe(CN)₆, et 1 mg / ml de X-gal, Invitrogen, La Jolla, CA). Ensuite, les échantillons ont été rincés plusieurs fois avec du PBS, post-fixés dans du paraformaldehyde à 4% et stockés à 4 ° C. Pour l'histologie, les échantillons dentaires X-gal post coloration ont été décalcifiés dans 0,5M EDTA (pH 8) pendant 1-3 semaines à 4 ° C. Les organes ont été ensuite inclus dans la paraffine et coupés à une épaisseur de 7 µm en utilisant un microtome Leica RM 2255. Les sections ont été marquées avec un kit TRAP (phosphatase acide tartrate-résistante), comme décrit précédemment au sein du laboratoire (Blery *et al.* 2015)

10 Histologie

Des sections de 40µm d'épaisseur de résine ont été obtenues à l'aide d'une scie à fil diamanté (Leitz) après fixation avec une colle UV. Les tranches ont été traitées 2 minutes avec HCl 2% puis colorées avec de la fuchsine basique et du bleu de méthylène. Les coupes

de paraffine ont été colorées avec une coloration HES, comme décrit précédemment par Beck *et al.*(2010). Les sections colorées ont ensuite été montées avec le liquide de montage Eukitt® et numérisés à l'aide d'un scanner numérique Hamamatsu Nanozoomer HT (Hamamatsu Photonics KK) à un grossissement de 40X.

11 Micro Computed Tomography (Micro CT)

L'acquisition tridimensionnelle radiographique des échantillons a été obtenue avec un Skyscan 1272 (Skyscan, Bruker, Belgium). Les paramètres d'acquisition ont été choisis selon l'âge des échantillons : taille de pixel de 7 µm et 13 µm, voltage de 90kV, ampérage de 100 µA, filtre aluminium 0,5mm. La reconstruction a été réalisée avec le logiciel NRecon (utilisant l'algorithme Feldkamp), l'analyse 3D avec le logiciel CtVox et l'analyse quantitative avec le logiciel CTan.

12 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Des échantillons de têtes de souris âgées de 1 mois et 8-9 mois inclus en résine ont été coupés au niveau de la zone d'intérêt puis polis sur un polisseur Metaserv 2000 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Des incisives de souris âgées de 1 mois ont été cryofracturées dans l'azote. Ensuite, tous les échantillons ont été recouverts de carbone avec un Denton Vacuum (Moorestown, NJ, USA) puis analysés avec un microscope (Leo 1450 VP, Zeiss, Oberkochen, Allemagne), à une puissance de 20kV. L'analyse qualitative de l'émail, de la dentine et du cément des incisives et des molaires a été réalisée à différents grossissements (de 100X à 7500X).

13 Energy Dispersive X-ray spectrometry (EDX)

Une analyse EDX a été réalisée sur à des têtes de souris précédemment incluses en résine âgées de 1 mois et 8-9 mois pour analyser la composition minérale de surface. Les échantillons ont été recouvert de carbone (JEOL JEE 4B, Tokyo, Japon) puis analysés en utilisant un microscope électronique à balayage (LEO 1450VP, Zeiss, Weimar, Allemagne) couplé à un système EDX (Inca Oxford Instruments, Oxford, Angleterre).Les principaux composants des tissus dentaires (émail, dentine, os) ont été mesurés et le ratio calcium / phosphate (Ca/P) a été déterminé. 6 échantillons par groupe de souris à 1 mois et 3 échantillons par groupe de souris à 8-9 mois ont été étudiés et 10 points de microanalyse EDX ont été obtenus par zone.

14 Culture organotypique de germes dentaires et invalidation par ARNi

Le protocole de culture a été mis en place par l'équipe de Hervé Lesot à Strasbourg. Les souris gestantes sont sacrifiées conformément aux recommandations de la Communauté Economique Européenne (86/609-CEE). Les embryons de souris sont prélevés sur des femelles sacrifiées au 16^{ème} jour de gestation. La manipulation des embryons (et la dissection des germes des premières molaires inférieures) sont réalisées à l'aide d'un stéréomicroscope (Leica). Les différentes étapes consistent à isoler l'arcade mandibulaire puis localiser les germes de la première molaire puis séparer le germe des tissus environnants. Le germe ainsi disséqué sera déposé sur un milieu semi solide préalablement préparé dans une boîte de culture stérile. Le milieu semi solide de minéralisation contient du milieu BGJb (Invitrogen), 10% de Fetal Bovine Serum, 1% d'acide ascorbique (18mg/mL), 1% de L-glutamine (200mM), 1% de pénicilline/streptomycine (5000 U/mL) et de l'agar. Les milieux sont changés tous les 2 jours par transfert du germe et la culture peut se faire jusqu'à 10-15 jours maximum (au delà un risque de nécrose des tissus au centre du germe existe du fait d'un manque de nutriments).

Les germes dentaires ne pouvant être cultivés que 10 jours et que ces 10 jours ne sont pas strictement identiques à un développement *in vivo*, soit E16,5+J10 correspondant à P2 maximum, je ne pouvais pas observer les phénomènes de minéralisation sur un temps suffisant. D'autre part, la culture sur milieu semi solide ne permet pas systématiquement d'avoir une formation d'émail (données non publiées, Hervé Lesot). Nous avons donc établi un protocole de réimplantation sous cutanée chez des souris immunodéficientes de ces germes transduits. Pour chaque condition expérimentale, une souris C57BL/6 gestante, permettant de récupérer entre 14 et 18 germes dentaires provenant d'embryons (16^{ème} jour embryonnaire), est nécessaire. Après explantation des germes embryonnaires, transduction *in vitro* de ces germes par des vecteurs lentiviraux, ceux-ci seront réimplantés après 72h en sites multiples sous-cutané dorsal chez une souris Nude pendant au moins 2 semaines. Chaque condition expérimentale requiert donc une souris C57BL/6 et une souris Nude. Quatre conditions expérimentales sont envisagées (vecteurs lentiviraux correspondants aux conditions contrôle, shSlc20a1, shSlc20a2 et shSlc34a2), impliquant un total de 4 souris C57BL/6 et 4 souris Nude. Après ce temps de réimplantation, les souris Nude sont sacrifiées et les germes dentaires prélevés pour analyse histologique. La réimplantation de 4 semaines permet d'obtenir des tissus amélaire, dentinaire et cémentaire complets avec une édification radiculaire (Nait-Lechguer *et al.* 2008). Ce protocole a été validé par le Comité d'Ethique en

Expérimentation Animale des Pays-de-la-Loire (projet APAFIS 3876).

15 Techniques d'invalidation des gènes par ARN interférence (ARNi) : siRNA et protocole de transfection Jet Prime

Cette technique n'a été utilisée que pour les cultures de lignées cellulaires (ALC et M2H4). Les siRNA SLC20A1 et SLC20A2 ont été commandés chez ThermoFisher. Le protocole pour les transfections de siRNA établi par Polyplus pour le système Jet Prime a été utilisé : en résumé, les cellules ont été ensemencées de manière à obtenir une confluence de 60 à 80% au moment de la transfection puis le complexe de transfection a été réalisé et déposé à différentes MOI sur les cellules pour analyse de l'extinction de l'expression du gène ciblé par RT PCR. Nous avons ensuite pu mettre en protocole d'étude de l'invalidation de SLC20A1 et SLC20A2 sur les phénomènes de minéralisation *in vitro* par une coloration au rouge d'alizarine.

16 Protocole de production de particules lentivirales et transduction

Au sein de l'équipe, nous avons mis en place la culture de lentivirus afin de produire des particules lentivirales véhiculant le plasmide vecteur du shRNA d'intérêt : shSLC34A2 (vecteur GIPZ – ThermoFisher), sh SLC20A1 et shSLC20A2, sh contrôle (non silencing GIPZ – ThermoFisher). Nous avons spécifiquement choisi cette technique pour la transduction des germes dentaires. La production des particules lentivirales est réalisée en 4 étapes sur 5 jours pour les petites productions, comme décrit précédemment par Nguyen *et al.* (2002). La transduction est réalisée pendant la nuit sur un germe en culture à des quantités spécifiques à chaque production de particules lentivirales et selon le titre obtenu. Le germe est ensuite changé de milieu et l'expression de la GFP est observée en fluorescence à 48h.

RESULTATS

1 Expression des transporteurs de phosphate *in vitro* et *in vivo* lors de l'odontogénèse

La première étape de ces travaux de thèse était de déterminer lesquels des six transporteurs de phosphate sodium dépendants étaient de bons candidats pour être impliqués dans la minéralisation dentaire. Afin de répondre à cette question, nous avons eu plusieurs techniques d'approche :

- une approche *in vitro* par analyse ARN de l'expression des transporteurs de phosphate dans des lignées cellulaires améloblastiques et odontoblastiques en condition minéralisante ou non. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Merametdjian L, David A, Bon N, Couasnay G, Guicheux J, Gaucher C, Beck-Cormier S, Beck L. Expression of phosphate transporters in optimized cell culture models for dental cells biomineralization. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 2016 Jun 28;53(1):e16.) ci après
- une approche *in vivo* analyse ARN par qPCR sur des germes dentaires et humains, par hybridation *in situ* ou coloration X Gal sur des têtes de souris et analyse protéique par immunohistochimie. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis au Journal of Dental Research ci après.

ORIGINAL RESEARCH ARTICLES

EXPRESSION OF PHOSPHATE TRANSPORTERS IN OPTIMIZED CELL CULTURE MODELS FOR DENTAL CELLS BIOMINERALIZATION

Laure Merametdjian^{1,2,3}, Amandine David^{1,2}, Nina Bon^{1,2}, Greig Couasnay^{1,2}, Jérôme Guicheux^{1,2,3}, Céline Gaucher^{4,5}, Sarah Beck-Cormier^{1,2} and Laurent Beck^{1,2*}

¹ INSERM, U791, LIOAD, Nantes, F-44042, France. ² Université de Nantes, UFR Odontologie, UMR_S 791, Nantes, F-44042, France. ³ CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, F-44042, France. ⁴ Dental School University Paris Descartes PRES Sorbonne Paris Cité, EA 2496, Montrouge, F-92120, France ⁵ AP-HP, Odontology Department, Hôpital Albert Chenevier, GHM, AP-HP, Créteil, F-94010, France
* Corresponding author: Laurent Beck, Ph.D. INSERM U791-LIOAD, Faculté de Chirurgie Dentaire 1, place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France, email: laurent.beck@inserm.fr

Abstract / Résumé

Phosphate is a key component of dental mineral composition. The physiological role of membrane proteins of dental cells is suspected to be crucial for mineralization mechanisms. Contrary to published data related to calcium, data on regulation of phosphate flux through membrane of mineralizing cells are scarce. To address this lack of data, we studied the expression of six membranous phosphate transporters in two dental cell lines: a rat odontoblastic cell line (M2H4) and a mouse ameloblastic cell line (ALC) for which we optimized the mineralizing culture conditions. La place essentielle du phosphate dans la composante minérale de la dent laisse supposer un rôle physiologique déterminant pour les protéines membranaires permettant son entrée dans les cellules dentaires. Contrairement à celles disponibles pour le calcium, les données sur les molécules permettant la production et la régulation du flux de phosphate aux sites de formation du minéral par les cellules minéralisantes de la dent sont peu connues. Nous avons analysé dans cette étude six transporteurs de phosphate membranaires dans deux lignées cellulaires dentaires: une lignée d'odontoblastes de rat (M2H4) et une lignée améloblastique murine, les ALC, pour laquelle nous avons optimisé les conditions de culture minéralisantes.

Keywords

phosphate, mineralization, ALC, M2H4

Introduction

The tooth is the most mineralized organ of the body and is composed of both calcified tissues like dentin and cementum, and mineral acellular structures like enamel. For each dental structure, the mineralization process has specific features. Whereas enamel mineralization requires specific proteins such as amelogenins or enamelin, dentin mineralization mechanisms are closer to those taking place in bone by involving collagenous and non-collagenous matrix proteins. In addition, dentin mineralization shows significant differences, between the outer mantle and the circumpulpal dentin in term of mineral density, and also between the intertubular and peritubular areas in term of protein's matrix composition (Goldberg et al., 2011). Cementum also displays its own specificities with some distinguishable cellular/non cellular and fibrillar/non fibrillar areas along the roots (Goncalves et al., 2005).

Two main mineral deposition mechanisms are reported in the literature, namely, matrix vesicles budding from mineralizing cells, or secretion of a non-mineralized extracellular matrix that will eventually become a mineralized structure in supersaturated calcium

(Ca)-phosphate (Pi) environment in which mineral will nucleate (Veis et al., 2013). These mechanisms have been mainly described in bone, and the mineralization processes involved in dentin and enamel are much less known. Nonetheless, the mineral part of any mineralized tissue consists of Pi and Ca ions that will accumulate, be combined together and stabilized in the form of hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), eventually combined with minor ions giving rise to biological apatites. The essential requirement of Ca and Pi for tooth mineralization raises the question of the mechanisms underlying the production and regulation of ions fluxes at the mineral formation sites of the tooth. Whereas Ca transport and regulation in the dental enamel have been partially described (Hubbard M.J., 2000), Pi transport on the dental mineralization sites is still a large question mark.

In mammals, there are six identified Na-Pi cotransporters located at the plasma membrane and responsible for Pi entry into the cell. These transporters have been historically separated into three families, based on their sequence similarities and tissue expression. The first family, NPT1/SLC17A1, is expressed mostly in kidney and liver, but also in the brain. Although NPT1 displays a Pi transport activity in cultured cells *in vitro*, its physiological function is now known as being a chloride-dependent urate exporter (Iharada et al., 2010). The second SLC34 family comprises three members, among which Npt2a/SLC34A1 and Npt2c/SLC34A3 are primarily expressed in the proximal tubule of the kidney, whereas Npt2b/SLC34A2 has a wider expression (mainly lung and intestine) (Wagner et al., 2014). The third family is represented by PiT1/SLC20A1 and PiT2/SLC20A2, which are expressed in a large number of tissues (Forster et al., 2013).

In recent years, considerable progress has been made in determining the physiological function of these transporters. By generating the first knockout mouse model for a Pi transporter, we have shown that Npt2a is the main carrier responsible for the reabsorption of Pi by the kidney (Beck et al., 1998), at least in rodents. More recent studies have confirmed these data and in addition, showed that the function of Npt2c carrier, expressed in the same segments of the nephron than Npt2a, was to increase the reabsorption capacity of Pi during growth. However, the physiological role of Npt2c in rodents remains minor, since

its deletion did not aggravate the phenotype of the Npt2a knockout mice (Miyamoto et al., 2011). In both models, although the dental phenotype has not been explored in details, the animals showed no major eruption failure or dental mineralization defects (L. Beck, unpublished data). Invalidation of the Npt2b gene in mice is embryonic lethal at E10.5 (Shibasaki Y., BBRC 2009). A tissue-specific inactivation in the intestine was performed, revealing its essential role in the intestinal absorption of Pi (Sabbagh et al., 2009). When mutated in humans, loss of Npt2b results in lung and testis calcifications (Corut et al., 2006). Its role in tooth mineralization *in vivo* has not been formally demonstrated. However, some studies have shown that Npt2b was expressed in odontoblasts and that its expression correlated with that of the Phex gene (Onishi et al., 2007). Interestingly, mutations of Phex in humans cause osteomalacia, impaired renal reabsorption of Pi, together with an abnormal mineralization of cementum and dentin (Gaucher et al., 2009). Similarly to SLC17 and SLC34 transporters, the involvement of PiT1 and PiT2 in dental mineralization is poorly described. The inactivation of the PiT1 gene in mice leads to a lethal phenotype at mid gestation, and does not allow to study its physiological role in the tooth (Beck et al., 2010). Although, the transgenic cover expression of PiT1 in rats has suggested the involvement of PiT1 in enamel mineralization, the underlying mechanisms are unknown (Yoshioka et al., 2011). Finally, a comprehensive study reported a strong expression of PiT2 in pulp cells, a fainter expression in ameloblasts and an absence of expression in odontoblasts at all stages of development (Zhao et al., 2006). In summary, despite the considerable need of Pi for tooth mineralization, knowledge on the mechanisms and molecules involved in the production and regulation of the Pi flux to the sites of mineral formation by the mineralizing cells are very scarce.

As a first step to determine the functional involvement of Pi transporters in tooth mineralization, the objective of this study was to characterize the expression of the six known Pi transporters in ameloblast-ALC (Nakata et al., 2003) and odontoblast-M2H4 (Ritchie et al., 2002) cell lines. To this aim, we used the ALC mouse ameloblast-lineage (Nakata et al., 2003) and in the M2H4 rat odontoblast (Ritchie et al., 2002) cell lines after optimization of the culture conditions necessary to ob-

tain a robust mineralization.

Material and Methods

Cell culture and conditions

The odontoblastic rat M2H4 cells, cloned from the rat dental pulp cell line RPC-C2A, were cultured as previously described (Magne et al., 2004), in a maintenance medium consisting of MEM (Minimal Essential Medium, Invitrogen 21090-022) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Pan Biotech GmbH), 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 1% L-glutamine (Invitrogen). Cells were subcultured once a week using trypsin/EDTA, and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO2 in air. To induce odontoblast differentiation, MEM was switched to α -MEM (Invitrogen 22571-020) containing ascorbic acid. To induce extracellular matrix mineralization, 3 mM inorganic phosphate (Pi) were added to the culture medium on day 2. Pi was added as a mixture of NaH2PO4 and Na2HPO4 (pH 7.3).

The immortalized mouse ameloblast-lineage cells (ALC) (generously provided by Dr. Toshihiro Sugiyama, Akita University, Japan) were seeded at a density of 10,000 cells/cm² and maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO2 in air. The ALC were cultured in high-glucose Dulbecco’s modified Eagle’s medium (High Glucose Glutamax DMEM, Invitrogen 31966-021) supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 10ng/mL rhEGF (recombinant human Epidermal Growth Factor, R&D Systems) on collagen

I -coated (Rat Tail collagen I solution, BD Bioscience USA) culture plates, as described previously (Nakata et al., 2003; Takahashi et al., 2007). The growth medium was changed every 2 days. In order to induce mineralization, other media were evaluated including betaglycerophosphate (BGP, Sigma Aldrich G6251), ascorbic acid (Sigma Aldrich A4034), ITS (insulin transferrin selenite, Sigma Aldrich) and dexamethasone (Sigma Aldrich).

RNA isolation and real time qPCR

Total RNA was extracted from M2H4 and ALC cells using a Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Germany) in accordance with the manufacturer’s instructions. After DNaseI treatment, the RNA was quantified using a UV spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Labtech, Palaiseau, France).

Real-time PCR was performed on a Bio-Rad CFX96 using SYBR®Select Master Mix (Life Technologies). The following temperature profile was used: initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of 5 seconds at 95°C and 20 seconds at 60°C. Expression of target genes were normalized to GusB or GAPDH expression levels and the 2- $\Delta\Delta$ Ct (cycle threshold) method was used to calculate relative expression levels as previously described (Livak et al., 2001). The sequences of primers used in this study are listed in the Table 1.

Alizarin Red Staining

Calcium deposition in M2H4 and ALC cells culture was detected using Alizarin Red staining as previously described (Magne et al., 2004). Briefly, the extracellular matrix was

Gene	Mouse	
	Sense (5’-3’)	Antisense (5’-3’)
GusB	CTCTGGTGGCCTTACCTGAT	CAGTTGTTGTACCTTCACCTC
GAPDH		
Npt1	TCCTGGAAGAAGGAAGGGCCGT	CAGGGAAGGACCCCAAAGCCC
Npt2a	AGCCCCAGGGAGAAGCTATC	CCACAGTAGGATGCCCGAGA
Npt2b	CAGGACACTGGGATCAAATGG	GAAGGCGCTGCTCAGTACATC
Npt2c	CAGCCCTGCAGACATGTTAAT	GCACCAGGTACCACAGCAG
PiT1	TGTGGCAAATGGGCAGAAG	AGAAAGCAGCGGAGAGACGA
PiT2	CCATCGGCTTCTCACTCGT	AAACCAGGAGGCGACAATCT
DMP1		
COL1A1		
AMELX	TTCAGCCTCATCACCACTT	AGGGATGTTTGGCTGATGGT
TUFT1	ACTGTGCAGGAGTTGCTTGTC	ATTTCTGCCGCTTTCTGCTCCA

Gene	Rat	
	Sense (5'–3')	Antisense (5'–3')
GusB		
GAPDH	GAGCCAAACGGGTCATCA	CATATTTCTCGTGGTTCACCC
Npt1	TCCTGGAAGAAGGAAGGGCCGT	CAGGGAAGGACCCCAAAGCCC
Npt2a	TCACAGTCTCATTTCGGATTTGGT	GCAGCCCAGTATCCACGAAGA
Npt2b	TGCTAACATCGGGACCTCCA	AGCTCCTGCAAATGCCCTTC
Npt2c	GCACCACCACCACAGCCTTAC	GCCAGCCAGGTTGAAAAAGAA
PiT1	GGAAGGACCTGACACCAATC	GGGAAGGCCAATGTTTTGAT
PiT2	CCATCGGCTTCTCACTCGT	AAACCAGGAGGCGACAATCT
DMP1	TTTGACCCAGTCGGAAGAGA	CATATTGGGATGCGATTCT
COL1A1	CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT
AMELX		
TUFT1		

Sequence of primers for RT-PCR

washed with cold PBS and stained with 2% Alizarin Red solution for 2 minutes. Stained cells were extensively washed with deionized water to remove any nonspecific staining. Photographs were obtained with a light microscope (Leica DFC 450C®). Alizarin Red was extracted using a solution of 20% methanol and 10% acetic acid in water. After 15 minutes, the liquid was harvested and the Alizarin Red optical density was determined on a spectrophotometer (Victor3 1420 Multilabel Counter®) using a wavelength of 450 nm.

Statistical analysis

Experiments were repeated at least three times. Depending on the number of samples and their distribution, results were analysed using a one-way ANOVA, unpaired Student's t test or a non-parametric Mann and Witney test. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. When not specified on figures, results were considered as not significant.

Results

ALC mineralization culture conditions optimization

ALC were described to form few calcified nodules at day 14 to 21 (Nakata et al., 2003; Takahashi et al., 2007) in medium 1 (see Table 2). In order to induce an earlier and stronger matrix mineralization, we compared 9 different culture conditions, based on known *in vitro* mineralization conditions. The most intense Red Alizarin staining was obtained with media 4 and 5 after 10 and 18 days following mineralization induction at day 2 (Figure 1).

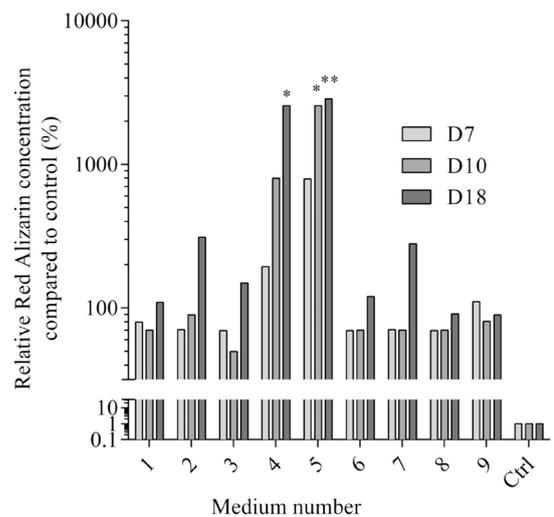


Figure 1: ALC mineralization in vitro obtained in different media.

ALC were seeded at day 0 (D0) in Medium 1 (Table 1) at 10,000cells/cm². At day 2 (D2) when cells were subconfluent, growth medium was switched to a mineralization medium (Media 2-8). After mineralization induction, cells were stained with Alizarin Red S at different times: 7 days (D7), 10 days (D10) and 18 days (D18) post induction; and absorbance of the Alizarin Red S extract solution was measured at 405nm. Each absorbance result was compared to medium 1 result of the same day * p<0.05 and ** p<0.01 (not specified=not significant).

Medium 5 is identical to medium 4 with the exception that 4mM BGP was used instead of 2mM. Medium 5 allowed a higher mineralization rate, with a reduced delay of induction than in medium 4 and original medium 1 (Figure 1). A significant Red Alizarin staining

Medium 1 :	DMEM Glutamax High Glucose + 10% FCS + 1% penicillin/streptomycin + 10ng/mL rhEGF
Medium 2 :	Medium 1 + 2mM beta-glycerophosphate (BGP) + 50µg/mL ascorbic acid
Medium 3 :	Medium 2 + 1µg/mL Insulin Transferrin Selenite (ITS)
Medium 4 :	Medium 2 + 10 ⁻⁸ M dexamethasone
Medium 5:	Medium 1 + 4mM beta-glycerophosphate (BGP) + 50µg/mL ascorbic acid+ 10 ⁻⁸ M dexamethasone
Medium 6 :	alpha-MEM + 10% FCS + 2mM BGP + 50µg/mL ascorbic acid + 1% penicillin/streptomycin + 10ng/mL rhEGF
Medium 7 :	Medium 6 + 1ug/mL ITS
Medium 8 :	Medium 7 + 10 ⁻⁸ M de dexamethasone
Medium 9 :	Medium 1 on a 300µm ivory cut

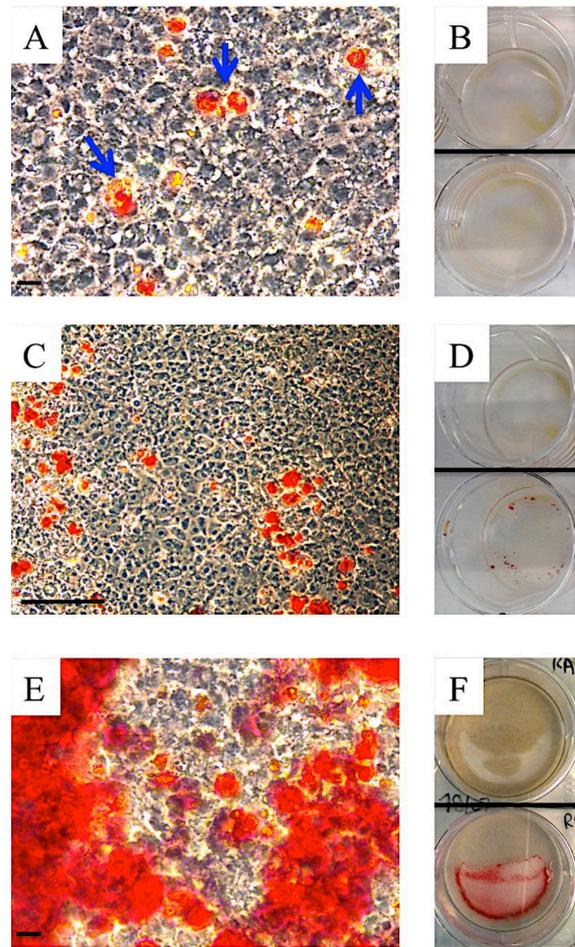
Culture conditions used for ALC mineralization induction.

was obtained after only 4 days (D4) in medium 5. At D7, wells cultured with media 4 and 5 showed many calcification nodules (Figure 2A-B), which grew until covering the cell layer (Figure 2C-H). Cells shape and number were similar in media 1 and 5, with no statistically difference neither in metabolic activity nor cell viability (MTT assays, data not shown). Therefore, we chose medium 5 for further investigations on ALC mineralization in vitro.

Phosphate transporters expression in ALC in vitro

After 7 and 25 days of culture, the phosphate transporters Npt1, Npt2a and Npt2c expressions were undetectable in mineralization media, as well as in proliferation medium (data not shown). At day 7 of culture, only PiT1 and PiT2 were expressed in ALC cultured in both media, with PiT1 mRNA being more abundant than PiT2 (Figure 3). At day 25 of culture, PiT1 and PiT2 were expressed in ALC cultured in both media. Npt2b was expressed only in ALC cultured in the mineralization-inducing medium, at D7, but at a very low level compared to PiT1 and PiT2. PiT1 and PiT2 showed the highest mRNA expression in ALC culture in both media (Figure 3).

To further study the expression of PiT1 and PiT2 in ALC, we monitored their expression in a proliferation (medium 1) or mineralization (medium 5) medium over time (Figure 4). Both PiT1 and PiT2 expressions increased slowly and moderately in medium 1 up until 29 days



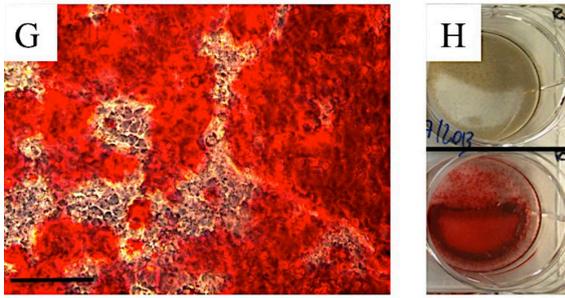


Figure 2: ALC mineralization cultured in medium 5 ALC were seeded at day 0 in Medium 1 (Table 1) at 10,000cells/cm². At day 2 when cells were sub confluent, growth medium was switched to the mineralization medium 5. After mineralization induction, cells were stained with Alizarin Red S at different times: 4 days (A&B) 7 days (C&D), 10 days (E&F) and 18 days (G&H) of culture. Calcification nodules are stained in red (blue arrows). Cells in the well up the line were cultured in medium 1 (control), cells in the well down the line in medium 5, then stained with Red Alizarin (B, D, F H).

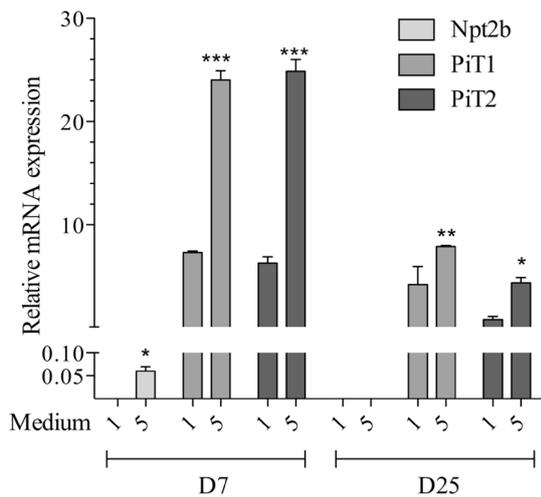


Figure 3: Comparative mRNA expression of the phosphate transporters at 7 and 25 days of culture in a growth medium or in mineralization-inducing medium by ameloblast-lineage cells (ALC).

ALC were seeded at day 0 in Medium 1 (Table 1) at 10,000cells/cm². At day 2 when cells were sub confluent, growth medium 1 was switched or not to the mineralization medium 5. Culture was stopped after 7 days (D7) and 25 days (D25) of culture, and mRNA was extracted.

At each time, values of medium 1 and medium 5 were compared with * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.005 (not specified=not significant)

of culture. In medium 5, the expression of the transporters was much higher than in medium 1 and peaked at 14 days of culture (Figure 4). Importantly, this latter expression profile did not correlate with the mineralization kinetics (Figure 2).

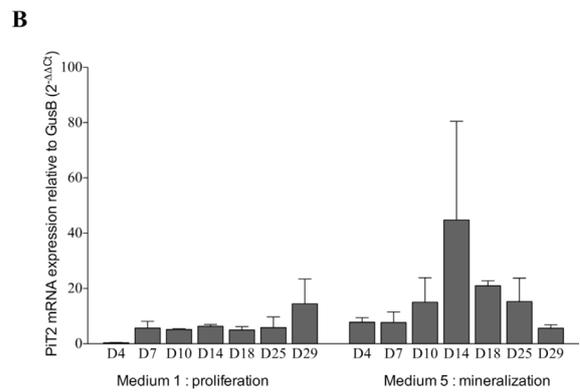
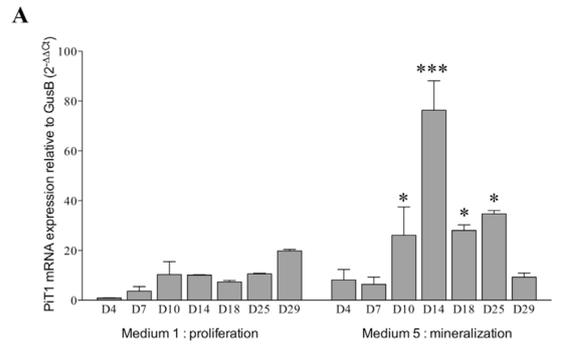


Figure 4: Relative mRNA expression of PiT1 and PiT2 in ameloblast-lineage cells (ALC) culture with or without mineralization induction in long-term culture.

ALC were seeded at day 0 in Medium 1 (Table 1) at 10,000cells/cm². At day 2 when cells were sub confluent, proliferation medium 1 was switched or not to the mineralization medium 5. Culture was stopped after 4 days (D4) to 29 days (D29) of culture, and mRNA was extracted. PiT1 (A) and PiT2 (B) mRNA expressions were compared to GusB expression (2^{-ΔΔCt}). At each time, values of medium 1 and medium 5 were compared with * p<0.05 *** p<0.001 (not specified=not significant).

Ameloblastic hallmarks in ALC culture

As previously described, ALC expressed amelogenin (AmelX) and tuftelin (Tuft1), two of the ameloblast-phenotype hallmark genes (Nakata et al., 2003). Both amelogenin (Figure 5.A) and tuftelin (Figure 5.B) expressions softly increased in medium 1. When cultured in medium 5, their expressions peaked at 14 days of culture. Tuftelin, amelogenin, PiT1 and PiT2 kinetics of expression were very alike, although our results could not demonstrate a strong correlation between ameloblastic marker expression and ALC mineralization kinetics (Figures 2-4-5). The level of enamel expression was globally too low to be reliable, but exhibited a faint expression starting at 25 days of culture (data not shown).

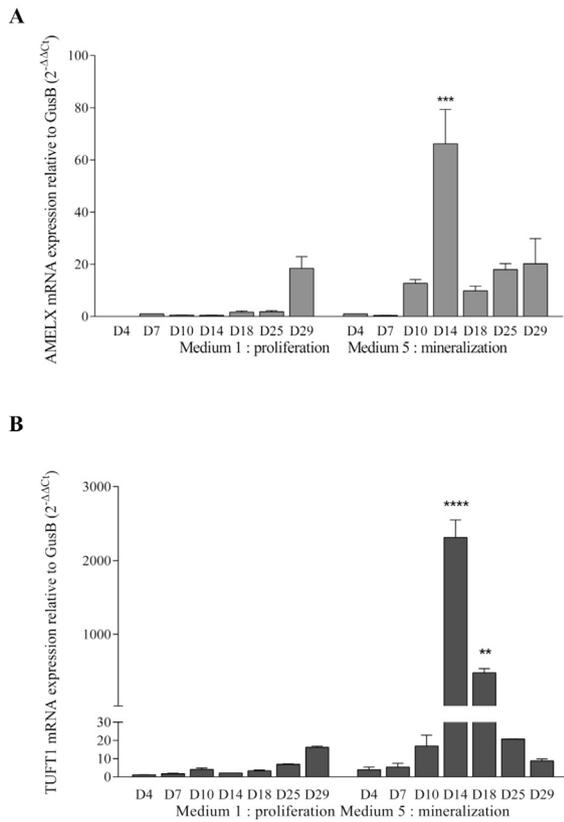


Figure 5: Relative mRNA expressions of ameloblastic hallmarks in ameloblast-lineage cells (ALC) culture with or without mineralization induction in long-term culture. ALC were seeded at day 0 in Medium 1 (Table 1) at 10,000 cells/cm². At day 2 when cells were sub confluent, proliferation medium 1 was switched or not to the mineralization medium 5. Culture was stopped after 4 days (D4) to 29 days (D29) of culture, and mRNA was extracted. Tuftelin TUFT1 (A) and amelogenin AMELX (B) mRNA expressions were compared to GusB expression (2^{-ΔΔCt}). ENAM (enamelin) mRNA levels were too low to be reliable. At each time, values of medium 1 and medium 5 were compared with ** p<0.005 *** p<0.001 **** p<0.0005 (not specified=not significant)

M2H4 odontoblast mineralization in vitro

Specific Ca nodules when M2H4 were cultured in mineralization medium were obtained only 24h after the medium switch, even though this mineralization became statistically significant only after 48h (Figures 6 and 7). After 7 days in mineralization culture conditions, the culture well was entirely covered by specific calcifications colored by intense Red Alizarin staining (Figure 6). There was no calcification in the control condition (MEM alone). These results confirmed previous results obtained by Magne et al. (2004) using M2H4 cells.

Expression of phosphate transporters and odontoblast hallmarks in M2H4 cells

PiT1 and PiT2 were highly expressed compa-

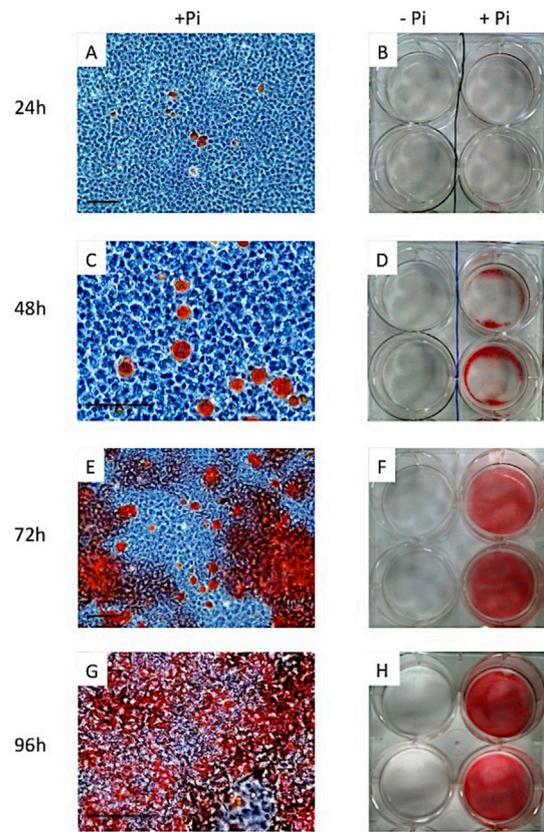


Figure 6: M2H4 mineralization in culture M2H4 were cultured in the maintenance medium without phosphate (-Pi) and seeded at 10,000 cells/cm² at day 0. To induce odontoblast differentiation and mineralization, MEM was switched to α-MEM with phosphate (+Pi) when cells were subconfluent at day 2. Alizarin Red staining revealed specific Ca nodules from 24h after induction, without any aspecific staining in control (- Pi). A-B: 24 hours after induction. C-D: 48 hours after induction. E-F: 72 hours after induction. G-H: 96 hours after induction.

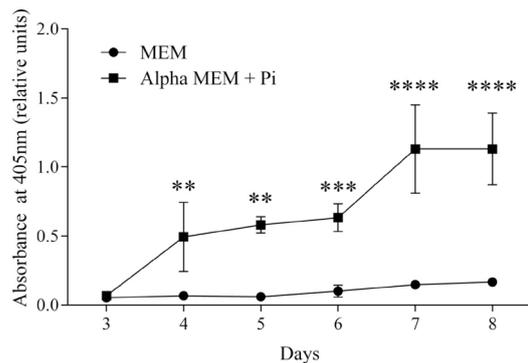


Figure 7: M2H4 mineralization kinetics M2H4 were seeded at D0 in MEM at 10,000 cells/cm². At D2 when cells were subconfluent, in order to induce odontoblast differentiation and mineralization, MEM was switched to α-MEM+Pi. Wells were stained with Alizarin Red at day 3-4-5-6-7-8 and absorbance of the Red Alizarin extract was measured by spectrophotometry at 450 nm. At each time, values of MEM and alpha MEM + Pi were compared with ** p<0.005 *** p<0.001 **** p<0.0005 (not specified=not significant)

red to the other phosphate transporters Npt1, Npt2a, Npt2b and Npt2c for which no expression could be detected in this cell line. No difference in PiT expressions could be seen between the mineralization and proliferation medium (Figure 8). During cell culture period, the expression of PiT1 and PiT2 decreased, whereas as described above, cell mineralization increased. M2H4 were found to express

two of the specific odontoblast-phenotype hallmarks previously described (Magne et al., 2004), DMP1 (dentin matrix protein 1) and COL1A1 (collagen type I), with strong mRNA levels in both mineralization and proliferation media (Figure 9). DMP1 expression increased with time and reached a maximum at day 5-6 (Figure 9.A). COL1A1 expression was almost constant during the culture period, without any clear difference between the two media (Figure 9.B).

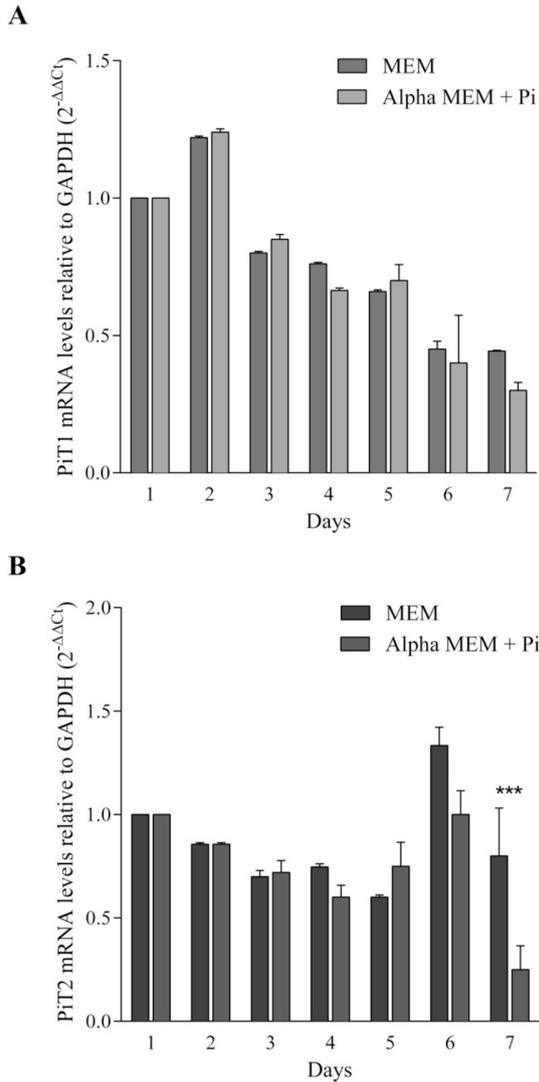


Figure 8: Relative mRNA expressions of PiT1 and PiT2 in odontoblast cells (M2H4) culture with or without mineralization induction.

M2H4 were seeded at D0 in MEM at 10,000cells/cm². At D2 when cells were subconfluent, in order to induce odontoblast differentiation and mineralization, MEM was switched to α-MEM+Pi. Culture is stopped after 1 to 7 days of culture, and mRNA was extracted. PiT1 (A) and PiT2(B) mRNA expressions were compared to GAPDH expression (2^{-ΔΔCt}). At each time, values of MEM and alpha MEM + Pi were compared with *** p<0.001 (not specified=not significant)

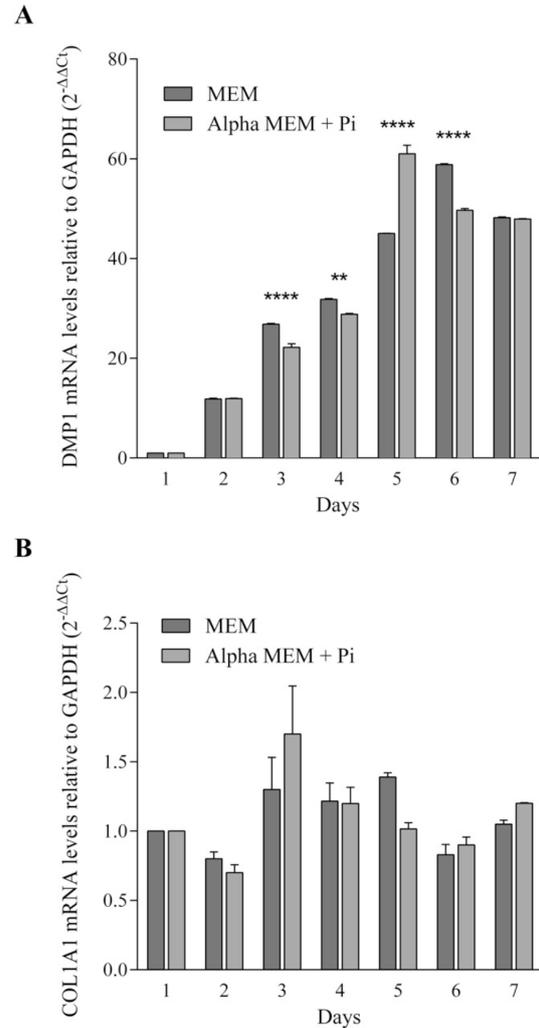


Figure 9: Relative mRNA expressions of odontoblastic hallmarks DMP1 (dentin matrix protein 1) and COL1A1 (collagen 1) in odontoblast cells culture with or without mineralization induction.

M2H4 were seeded at D0 in MEM at 10,000cells/cm². At D2 when cells were subconfluent, in order to induce odontoblast differentiation and mineralization, MEM was switched to α-MEM+Pi. Culture is stopped after 1 to 7 days of culture, and mRNA was extracted. DMP1 (A) and COL1A1 (B) mRNA expressions were compared to GAPDH expression (2^{-ΔΔCt}).

At each time, values of MEM and alpha MEM + Pi were compared with ** p<0.005 and **** p<0.0005 (not specified=not significant)

Discussion

Transport of Pi and calcium ions through the dental tissues is essential for the formation of dentin and enamel, the most highly mineralized tissues in the mammalian body. Although the underlying mechanisms and factors governing calcium transport in odontogenesis have been elucidated to some extent (Hubbard, 2000), the characteristics and regulation of Pi transport in dental tissues remain largely unknown.

In this study, we chose two dental cells models, the mouse ameloblast lineage cell line ALC and the rat odontoblast cell line M2H4, to investigate the phosphate transporters involvement in enamel and dentin mineralization *in vitro*, respectively.

Even though mesenchymal cell lines can easily be differentiated into osteoblasts or chondrocytes, the possibilities for having mineralizing dental cell line models are scarce, especially for the ameloblast lineage. As for the odontoblast cell lineage, the development of a pulp cell line such as the rat RPC-C2A cell line (Kasugai et al., 1988) has enabled to derive odontoblast-like cell lines such as the MRPC-1 and M2H4 cells. These rat cell lines are known to express some dentin specific markers such as DMP1 or DSPP and to produce mineralized nodules. The mineralized matrix formed by M2H4 after Pi adjunction was characterized by FTIR and was shown to be equivalent to the one from rat dentin (Magne et al., 2004). These cells are not the only odontoblast cell lines available. The mouse odontoblastic MO6-G3 cell line derived from the transformed pulpal cell line HPC-T was generated for the evaluation of gene expression by MacDougall et al. (1995), and a porcine pulp derived odontoblast cell line expressing dentin specific hallmarks was also a possible choice for dentin mineralization investigations (Iwata et al., 2007). As for enamel mineralization, our choice was more limited as the ameloblast-cell lines available at the beginning of this study were the murine LS8 (Chen et al., 1992), porcine PABSo-E (Denbesten et al., 1999), rat HAT-7 (Kawano et al., 2002), and the murine ALC (Nakata et al., 2003) cells. Among these models, only the ALC were described to form few calcified nodules *in vitro* and a quite recent study comparing LS8 and ALC showed that ALC were a more suitable model to the study of enamel matrix mineralization processes as this cell line express more markers of maturation-stage events of amelo-

genesis (Sarkar J. et al., 2014). We showed in our study strong expression of specific ameloblastic hallmarks in both proliferation and mineralization media. The optimization of the ALC mineralization medium was conclusive as we obtained *in vitro* calcifications in ALC after only 4 days which increased over time. This medium is an "osteogenic like media", as it contains BGP, ascorbate and dexamethasone. BGP as a phosphate source is subjected to the alkaline phosphatase activity, which is expressed by ALC in our mineralizing conditions after 7 days of culture (data not shown), and it has been shown to be expressed by mature ameloblasts (Hotton et al., 1999). This study confirms that M2H4 (rat odontoblast) and ALC (mouse mature ameloblast) after culture conditions optimization are good mineralization dental cell lines models to study the involvement of phosphate transporters in tooth mineralization *in vitro*.

This study showed that the two phosphate transporters expressed *in vitro* in these two cell lines models are PiT1 and PiT2. No expression of the other phosphate transporters (Npt1, Npt2a, Npt2b and Npt2c) was detected by qPCR in these *in vitro* models. But Lundquist et al. (2002) showed by immunohistochemistry that Npt2a and Npt2b were expressed both in odontoblasts and ameloblasts in 10-day old mice, as well as they showed that these transporters were expressed in rat odontoblast MRPC-1 culture. Furthermore, Onishi et al. (2007) showed by *in situ* hybridization that Npt2b was expressed in mice at 2, 6 and 10 days after birth in odontoblasts and in both secretory and mature ameloblasts, and Lacruz et al. (2012) confirmed the potential role of Npt2b in ameloblast mineralization processes. This might be explained by the lack of ectomesenchymal interactions in our *in vitro* model, compared to the literature *in vivo* results. In our models, PiT1 and PiT2 are the only phosphate transporters strongly expressed, PiT2 in either proliferation or in mineralization culture conditions. These results are consistent with most *in vitro* results of the literature obtained in the mouse odontoblastic MO6-G3 cell line (Wittrant et al., 2009; Bourguine et al., 2011) and human pulp cells differentiated into odontoblasts (Tada et al., 2011). No work had been done in ameloblasts *in vitro* on phosphate transporters. However, these *in vitro* results are not fully consistent with previous *in vivo* results and not necessarily consistent with each other. Zhao et al. (2006)

described the ontogenesis of PiT2 in mouse odontogenesis and established that PiT2 was expressed in dental cells at various stages and different levels of expression but never in odontoblasts from 11,5 embryonic days to 14 days post natal. Conversely Yoshioka et al., (2011) showed amelogenesis impairment in a PiT1 over expression rat model. As the mineralization and expression of PiT1 and PiT2 kinetics are not correlated in this study, and for the heterogeneity of previous results, we can not therefore conclude on phosphate transporters implication in tooth mineralization without any *in vivo* functional and global investigations.

To this aim, further studies must be engaged to determine which phosphate transporters are implicated or not in dentin and enamel mineralization processes *in vivo*: ontogenesis of the six phosphate transporters during whole dental development by *in situ* hybridization and/or immunohistochemistry, and dental tissue specific invalidations of the phosphate transporters.

In conclusion, through the optimization of mineralization conditions of rat odontoblast and mouse ameloblasts cells, we showed that both PiT1 and PiT2 were highly expressed in these cells but that their expression did not correlated with the mineralization processes. Although a role of phosphate transporters in enamel and dentin mineralization processes can not be excluded, these results are not in favor of a functional implication of these molecules in the tooth mineralization processes.

Acknowledgments

This study was supported by an IFRO (Institut Français de la Recherche Odontologique) grant. We greatly thank Dr Toshihiro Sugiyama, Dr Akira Nakata and Dr Carolyn W. Gibson for providing the ALC cell line.

Bibliography

Beck, L., Karaplis, A.C., Amizuka, N., Hewson, A.S., Ozawa, H. and Tenenhouse, H.S., Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(9): p. 5372-7.

Beck, L., Leroy, C., Beck-Cormier, S., Forand, A., Salaün, C., Paris, N., Bernier, A., Ure-

ña-Torres, P., Prié, D., Ollero, M., Coulombel, L. and Friedlander, G., The Phosphate Transporter PiT1 (Slc20a1) Revealed As a New Essential Gene for Mouse Liver Development. PLoS ONE, 2010. 5(2): p. e9148.

Beck, L., Leroy, C., Salaun, C., Margall-Ducos, G., Desdouets, C. and Friedlander, G., Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. J Biol-Chem, 2009. 284(45): p. 31363-74

Boskey A.L. and Roy R., Cell Culture Systems for Studies of Bone and Tooth Mineralization, Chem Rev. 2008 Nov; 108(11): p.4716–4733.

Bourgine, A., Beck, L., Khoshniat, S., Wauquier, F., Oliver, L., Hue, E., Alliot-Licht, B., Weiss, P., Guicheux, J. and Wittrant, Y., Inorganic phosphate stimulates apoptosis in murine MO6-G3 odontoblast-like cells. Arch Oral Biol, 2011. 56(10): p. 977-83.

Byskov, K., Jensen, N., Kongsfelt, I.B., Wielsøe, M., Pedersen, L.E., Haldrup, C. and Pedersen, L., Regulation of cell proliferation and cell density by the inorganic phosphate transporter PiT1. Cell Div, 2012. 7(1): p. 7.

Chen L. S., Couwenhoven D., Hsu D., Luo W., Snead M. L. Maintenance of amelogenin gene expression by transformed epithelial cells of mouse enamel organ. Arch. Oral Biol. 1992. 37, 771–778

Corut, A., Senyigit, A., Ugur, S.A., Altin, S., Ozcelik, U., Calisir, H., Yildirim, Z., Gocmen, A. and Tolun, A., Mutations in SL-C34A2 cause pulmonary alveolar microlithiasis and are possibly associated with testicular microlithiasis. Am J Hum Genet, 2006. 79(4): p. 650-6.

Gaucher C., Boukpepsi T., Septier D., Jehan F., Rowe P.S., Garabédian M., Goldberg M., Chaussain-Miller C., Dentin noncollagenous matrix proteins in familial hypophosphatemic rickets. Cells Tissues Organs. 2009;189(1-4): p. 219-23.

Denbesten P. K., Gao C., Li W., Mathews C. H., Gruenert D. C. Development and characterization of an SV40 immortalized por-

- cine ameloblast-like cell line. *Eur. J. Oral Sci.* 1999. 107, 276–281
- Forster IC1, Hernando N, Biber J, Murer H., Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Aspects Med.*, 2013 Apr-Jun;34(2-3):386-95
- Goldberg, M., Kulkarni, A.B., Young, M. and Boskey, A., Dentin: structure, composition and mineralization. *FrontBiosci (Elite Ed)*, 2011. 3(3): p. 711-35.
- Goncalves P.F., Sallum E.A., Sallum A.W., Casati M.Z., de Toledo S. and Nociti Jr F.H., Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci.* 4(12): 651-658
- Hotton D., Mauro N., Lézot F., Forest N., Bernal A. Differential expression and activity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in rat odontogenic cells in vivo. *J Histochem Cytochem.* 1999;47(12):1541-52.
- Hubbard MJ., Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000; 11:437–466.
- Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, Moriyama Y., Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J Biol Chem.* 2010 Aug 20;285(34):26107-13.
- Iwata T, Yamakoshi Y, Simmer JP, Ishikawa I, Hu JC., Establishment of porcine pulp-derived cell lines and expression of recombinant dentin sialoprotein and recombinant dentin matrix protein-1., *Eur J Oral Sci.* 2007 Feb;115(1):48-56.
- Kawano S., Morotomi T., Toyono T., Nakamura N., Uchida T., Ohishi M., Toyoshima K., Harada H. Establishment of dental epithelial cell line (HAT-7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. *Connect. Tissue Res.* 2002. 43, 409–412
- Kasugai S1, Adachi M, Ogura H., Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of the rat incisor., *Arch Oral Biol.* 1988;33(12):887-91.
- Khoshniat, S., Bourguine, A., Julien, M., Weiss, P., Guicheux, J. and Beck, L., The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010. 68(2): p. 205-218.
- Lacruz RS, Smith CE, Kurtz I, Hubbard MJ, Paine ML., New paradigms on the transport functions of maturation-stage ameloblasts, *J Dent Res.* 2013 Feb;92(2):122-9.
- Livak, K. and Schmittgen, T., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001. 25(4): p. 402-8.
- Lundquist, P., Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis. *Swed Dent J Suppl*, 2002. Supplement 154(154): p. 1-52.
- Lundquist, P., Ritchie, H.H., Moore, K., Lundgren, T. and Linde, A., Phosphate and calcium uptake by rat odontoblast-like MRPC-1 cells concomitant with mineralization. *J. Bone Miner. Res.*, 2002. 17(10): p. 1801-1813.
- MacDougall M1, Thiemann F, Ta H, Hsu P, Chen LS, Snead ML., Temperature sensitive simian virus 40 large T antigen immortalization of murine odontoblast cell cultures: establishment of clonal odontoblast cell line., *Connect Tissue Res.* 1995;33(1-3):97-103.
- Magne, D., Bluteau, G., Lopez-Cazaux, S., Weiss, P., Pilet, P., Ritchie, H.H., Daculsi, G. and Guicheux, J., Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. *Connect Tissue Res*, 2004. 45(2): p. 101-108.
- Miyamoto, K., Haito-Sugino, S., Kuwahara, S., Ohi, A., Nomura, K., Ito, M., Kuwahata, M., Kido, S., Tatsumi, S., Kaneko, I. and Segawa, H., Sodium-dependent phosphate cotransporters: lessons from gene knockout and mutation studies. *J Pharm Sci*, 2011. 100(9): p. 3719-30.
- Onishi, T., Okawa, R., Ogawa, T., Shintani,

- S. and Ooshima, T., Phex mutation causes the reduction of npt2b mRNA in teeth. *Journal of Dental Research*, 2007. 86(2): p. 158-162.
- Opsahl Vital, S., Gaucher, C., Bardet, C., Rowe, P.S., George, A., Linglart, A. and Chaussain, C., Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. *Bone*, 2012. 50(4): p. 989-97.
- Palmer, G., Zhao, J., Bonjour, J., Hofstetter, W. and Caverzasio, J., In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone*, 1999. 24(1): p. 1-7.
- Ritchie, H.H., Liu, J., Kasugai, S. and Moller, P., A mineralizing rat dental pulp cell subline expressing collagen type I and dentin sialoprotein-phosphophoryn transcripts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002. 38(1): p. 25-9.
- Sabbagh, Y., O'Brien, S.P., Song, W., Boulanger, J.H., Stockmann, A., Arbeeny, C. and Schiavi, S.C., Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *J Am Soc Nephrol*, 2009. 20(11): p. 2348-58.
- Salaun, C., Leroy, C., Rousseau, A., Boitez, V., Beck, L. and Friedlander, G., Identification of a novel transport-independent function of PIT1/SLC20A1 in the regulation of TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2010. 285(45): p. 34408-18.
- Sarkar J., Simanian EJ.,Tuggy SY., Bartlett JD., Snead ML., Sugiyama T., Paine ML. Comparison of two mouse ameloblast-like cell lines for enamel-specific gene expression. *Front Physiol*. 2014; 5:277.
- Segawa, H., Onitsuka, A., Furutani, J., Kaneko, I., Aranami, F., Matsumoto, N., Tomoe, Y., Kuwahata, M., Ito, M., Matsumoto, M., Li, M., Amizuka, N. and Miyamoto, K.i., Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *AJP: Renal Physiology*, 2009. 297(3): p. 671-678.
- Tada, H., Nemoto, E., Foster, B.L., Somerman, M.J. and Shimauchi, H., Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*, 2011. 48(6): p. 1409-1416.
- Veis, A. and Dorvee JR., Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int.*, 2013. 93(4):307-315.
- Villa-Bellosta, R., Ravera, S., Sorribas, V., Stange, G., Levi, M., Murer, H., Biber, J. and Forster, I.C., The Na⁺-Pi cotransporter PIT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. *AJP: Renal Physiology*, 2009. 296(4): p. 691-699.
- Wagner CA1, Hernando N, Forster IC, Biber J., The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters. *Pflugers Arch*. 2014 Jan;466(1):139-53
- Wittrant, Y., Bourgine, A., Khoshniat, S., Alliot-Licht, B., Masson, M., Gatius, M., Rouillon, T., Weiss, P., Beck, L. and Guicheux, J., Inorganic phosphate regulates Glvr-1 and -2 expression: role of calcium and ERK1/2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. 381(2): p. 259-263.
- Yoshioka, H., Yoshiko, Y., Minamizaki, T., Suzuki, S., Koma, Y., Nobukiyo, A., Sotomaru, Y., Suzuki, A., Itoh, M. and Maeda, N., Incisor Enamel Formation is Impaired in Transgenic Rats Overexpressing the Type III NaPi Transporter Slc20a1. *Calcif Tissue Int*, 2011. 89(3): p. 192-202.
- Zhao, D., VaziriSani, F., Nilsson, J., Rodenburg, M., Stocking, C., Linde, A. and Gritli-Linde, A., Expression of Pit2 sodium-phosphate cotransporter during murine odontogenesis is developmentally regulated. *Eur. J. Oral Sci.*, 2006. 114(6): p. 517-523.

Expression of phosphate transporters during dental mineralization

Journal:	<i>Journal of Dental Research</i>
Manuscript ID	JDR-16-1115
Manuscript Type:	Research Reports
Date Submitted by the Author:	03-Nov-2016
Complete List of Authors:	Merametdjian, Laure; INSERM U791; Université de Nantes; Centre Hospitalier Universitaire de Nantes Beck-Cormier, Sarah; INSERM U791; Université de Nantes Bon, Nina; INSERM U791; Université de Nantes Couasnay, Greig; INSERM U791; Université de Nantes Source, Sophie; INSERM U791; Université de Nantes Guicheux, Jerome; INSERM U791; Université de Nantes; Centre Hospitalier Universitaire de Nantes Gaucher, Celine; Dental School University Paris Descartes PRES Sorbonne Paris Cité; AP-HP, Odontology Department Beck, Laurent; INSERM U791; Université de Nantes
Keywords:	Mineralized tissue/development, Gene expression, Dentinogenesis, Odontogenesis
Abstract:	The importance of phosphate (Pi) as an essential component of hydroxyapatite crystals suggests a key role for membrane proteins controlling Pi uptake during mineralization in tooth. As a first step to clarify the involvement of the currently known Pi transporters (Slc17a1, Slc34a1, Slc34a2, Slc34a3, Slc20a1, Slc20a2 and Xpr1) during tooth development and mineralization, we have determined their spatio-temporal expression in mouse tooth germs from embryonic day 14.5 to postnatal day 15, and in human dental samples from Nolla stages 6 to 9. Our results obtained by real-time PCR, in situ hybridization, immunohistochemistry and X-Gal staining showed that the expression of Slc17a1, Slc34a1 and Slc34a3 were very low. Slc34a2, Slc20a1, Slc20a2 and Xpr1 were highly expressed, mostly during the post-natal stages. The expression of Slc20a2 was 2- to 10- fold higher than the other transporters. In contrast to mice, SLC34A3 was detected in human germs, but its expression remained much lower than SLC20A2, which was expressed 30-fold more than SLC34A3. In mouse germs, Slc34a2 and Slc20a1 were predominantly expressed in ameloblasts but not in odontoblasts, while Slc20a2 was detected in the stratum intermedium, the subodontoblastic cell layer and the dental pulp, but not in ameloblasts or odontoblasts. Accordingly, histological analysis of tooth from Slc20a2 knockout mice revealed that Slc20a2 deficiency did not result in enamel defects. However, although no expression of Slc20a2 was found in odontoblasts, Slc20a2-deficient mice had disrupted dentin mineralization, displaying unmerged calcospherites at the mineralization

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	front and rising the possibility that Slc20a2 expression could play a role in the extracellular Pi availability, rather than Pi transport into mineralizing cells. In summary, our data illustrate that the possibility that the currently known Pi transporters may be dispensable for the initiation of dental mineralization but may rather participate, directly or indirectly to the maintenance of dental mineralization throughout life span.

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Peer Review

Expression of phosphate transporters during dental mineralization

Laure MERAMETDJIAN^{1,2,3}, Sarah BECK-CORMIER^{1,2}, Nina BON^{1,2}, Greig COUASNAY^{1,2},
Sophie SOURICE^{1,2}, Jérôme GUICHEUX^{1,2,3}, , Céline GAUCHER^{4,5} and Laurent BECK^{1,2*}.

Author affiliations

¹ INSERM, U791, LIOAD, Nantes, F-44042, France.

² Université de Nantes, UMR-S 791, LIOAD, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France.

³ CHU Nantes, PHU 4 OTONN, Nantes, F-44042, France.

⁴ Dental School University Paris Descartes PRES Sorbonne Paris Cité, EA 2496, Montrouge, F-92120, France.

⁵ AP-HP, Odontology Department, Hôpital Albert Chenevier, GHM, AP-HP, Créteil, F-94000, France.

* Corresponding author:

Laurent Beck, Ph.D.

INSERM U791-LIOAD

Faculté de Chirurgie Dentaire

1, place Alexis Ricordeau

44042 Nantes cedex 1, France

email: laurent.beck@inserm.fr

Abstract word count: 300

Total word count: 5037

Total number of figures/tables: 5

Number of references: 43

Keywords: Phosphate transport proteins. Odontogenesis. Tooth Calcification/genetics. Gene expression. Mice, knockout. Slc20a2 protein.

Abstract

The importance of phosphate (Pi) as an essential component of hydroxyapatite crystals suggests a key role for membrane proteins controlling Pi uptake during mineralization in tooth. As a first step to clarify the involvement of the currently known Pi transporters (Slc17a1, Slc34a1, Slc34a2, Slc34a3, Slc20a1, Slc20a2 and Xpr1) during tooth development and mineralization, we have determined their spatio-temporal expression in mouse tooth germs from embryonic day 14.5 to postnatal day 15, and in human dental samples from Nolla stages 6 to 9. Our results obtained by real-time PCR, *in situ* hybridization, immunohistochemistry and X-Gal staining showed that the expression of Slc17a1, Slc34a1 and Slc34a3 were very low. Slc34a2, Slc20a1, Slc20a2 and Xpr1 were highly expressed, mostly during the post-natal stages. The expression of Slc20a2 was 2- to 10- fold higher than the other transporters. In contrast to mice, SLC34A3 was detected in human germs, but its expression remained much lower than SLC20A2, which was expressed 30-fold more than SLC34A3. In mouse germs, Slc34a2 and Slc20a1 were predominantly expressed in ameloblasts but not in odontoblasts, while Slc20a2 was detected in the stratum intermedium, the subodontoblastic cell layer and the dental pulp, but not in ameloblasts or odontoblasts. Accordingly, histological analysis of tooth from Slc20a2 knockout mice revealed that Slc20a2 deficiency did not result in enamel defects. However, although no expression of Slc20a2 was found in odontoblasts, Slc20a2-deficient mice had disrupted dentin mineralization, displaying unmerged calcospherites at the mineralization front and rising the possibility that Slc20a2 expression could play a role in the extracellular Pi availability, rather than Pi transport into mineralizing cells. In summary, our data illustrate that the possibility that the currently known Pi transporters may be dispensable for the initiation of dental mineralization but may rather participate, directly or indirectly to the maintenance of dental mineralization throughout life span.

Introduction

Bone and dentin are both composed of an organic matrix rich in type I collagen and a mineral phase consisting of carbonate-substituted hydroxyapatite (HA) crystals. During mineralization of bone and dentin, the type I collagen is progressively assembled as fibrils to form a well-organized framework matrix while calcium and phosphate ions, initially originating from the circulation, will allow the mineralization of the extracellular matrix (ECM). The precise mechanism resulting in the nucleation of HA crystals and the deposition of crystals within the ECM is still a matter of vigorous debate (Boonrungsiman et al. 2012). Experimental evidence has shown that early mineral deposition onto collagen matrix can arise through the budding of matrix vesicles (MV) from the plasma cell membrane, that will serve as sites for calcium (Ca) and phosphate (Pi) accumulation to initiate the deposition of apatite crystals (Millan 2013). This widely accepted mechanism is not the only one at work, since more recent observations have also shown that the formation of apatite crystals can occur without the intervention of intracellular processes, from solution by charged non-collagenous proteins in the collagen spaces, or from a transient amorphous mineral precursor deposited within the collagen gap zones (Veis and Dorvee 2013, Habraken *et al.* 2013, Boonrungsiman et al. 2012). These mechanisms are not mutually exclusive and may represent redundant or additional processes to insure proper mineralization wherein crystals of hydroxyapatite represent the main mineral component.

Being a fundamental component of HA crystals, the availability of Pi, beside the one of calcium, to form crystals is a critical physiological factor for proper mineralization, independently from the mineralization mechanism involved. The circulating Pi plasma concentration, but also the intracellular and extracellular Pi concentrations in the vicinity of mineralizing cells therefore represent essential parameters of the mineralization process. Despite this importance, the mechanisms and cellular processes by which Pi is translocated from the serum to the mineralization site are still poorly understood. Current knowledges hypothesize that Pi uptake by mineralizing cells is a pre-requirement to the mineralization process and that the expression and activity of Pi transporters at the plasma membrane of mineralizing cells are thought to play a central role.

In mammals, the uptake of Pi through the plasma membrane is mediated by high-affinity and low capacity sodium (Na)-dependent Pi cotransporters that have been grouped in three dissimilar families (Werner *et al.* 1998), SLC17, SLC34 and SLC20 families. The SLC17 family is mainly represented by Npt1/Slc17a1 that has now been shown to transport

1
2
3 various anions including urate, chlorate or anionic xenobiotics, acting as a voltage-dependent
4 polyspecific anion transporter (Miyamoto *et al.* 2011). Accordingly, recent reports identify
5 Slc17a1 as a membrane potential-driven renal urate exporter involved in gout (Hollis-Moffatt
6 *et al.* 2012, Miyaji *et al.* 2013). Its role in bone or teeth mineralization is not documented and
7 no Slc17a1 expression was found in primary cultures of human pulp cells differentiated into
8 odontoblasts (Tada *et al.* 2011) nor in rat odontoblast M2H4 and murine ameloblast ALC cell
9 lines (Merametdjian *et al.* 2016). The SLC34 family is gathering the Npt2a/Slc34a1,
10 Npt2b/Slc34a2 and Npt2c/Slc34a3 Na-Pi cotransporters. An early study has reported the
11 expression of Slc34a1 in Mineralizing Rat Pulpal Cell line 1 (MRPC-1) by PCR and western-
12 blot analysis (Lundquist *et al.* 2002). However, more recent studies conducted in primary
13 cultures of human pulp cells differentiated into odontoblasts, or M2H4 and ALC cell lines did
14 not confirm these data (Tada *et al.* 2011, Merametdjian *et al.* 2016). In line with these data,
15 no Slc34a1 expression was found in post-natal murine dental germs or whole rat incisor by
16 PCR (Onishi *et al.* 2007, Yoshioka *et al.* 2011). Similar results were obtained for Slc34a3,
17 which has never been reported to be expressed in dental tissue, at least in rodents (Onishi *et*
18 *al.* 2007, Yoshioka *et al.* 2011, Merametdjian *et al.* 2016). In contrast, Slc34a2 was found to
19 be expressed in the MRPC-1 cell line and murine dental germs and was detected by *in situ*
20 hybridization in secretory and mature ameloblasts as well as in differentiated odontoblasts
21 from 6-day-old mice (Onishi *et al.* 2007). Slc34a2 was also found expressed on 5-day-old
22 and 9-week-old rat incisors (Yoshioka *et al.* 2011). The members of the SLC20 family,
23 PIT1/SLC20a1 and PIT2/SLC20a2, are widely expressed proteins that were detected in
24 primary cultures of human pulp cells differentiated into odontoblasts (Tada *et al.* 2011),
25 MRPC-1 (Lundquist *et al.* 2002), the murine odontoblast cell line MO6-G3 (Bourgine *et al.*
26 2011, Wittrant *et al.* 2009), M2H4 and ALC cell lines (Merametdjian *et al.* 2016). Interestingly,
27 Slc20a1-overexpressing mutant rats have an abnormal amelogenesis, displaying enamel
28 hypoplasia and mineralization delay (Yoshioka *et al.* 2011). Finally, a spatio-temporal
29 analysis of Slc20a2 expression during murine dental development by *in situ* hybridization
30 established that Slc20a2 was mostly expressed in the pulp mesenchyme and in ameloblasts
31 (Zhao *et al.* 2006).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47
48 When trying to infer the putative role of Na-Pi cotransporters in dental mineralization
49 from the available published data, one should bear in mind the diversity of the *in vitro* cell
50 models used and the fact that such models can not be representative of the accurate spatio-
51 temporal scheme of epithelial-mesenchymal interactions leading to odontogenesis.
52 Moreover, the diversity of the *in vivo* experimental models and technical approaches, the
53 different time scales used, and the absence of a systematic approach make any comparison
54 between the six transporters precarious. Hence, to better assess the involvement of Na-Pi
55
56
57
58
59
60

1
2
3 cotransporters in dental mineralization, we have investigated the spatio-temporal expression
4 of the six known Na-Pi cotransporters during tooth development and mineralization *in vivo* by
5 *in situ* hybridization, X-Gal staining, immuno-histochemistry, as well as by qPCR in mouse
6 tooth germs from embryonic day 14.5 (E14.5) to postal natal day 15 (P15) and in human
7 dental samples from Nolla stages 6 to 9. We also assessed the dental phenotypical changes
8 arising from the *in vivo* deletion in mice of the most highly expressed Na-Pi cotransporter in
9 tooth, Slc20a2.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Material & Methods

Animal experimentation and ethics

Animal care and maintenance were provided through the University of Nantes accredited animal facility at the "Unité de Thérapeutique Expérimentale". Mice were housed under specific pathogen-free conditions, were fed with RM1 diet for maintenance and with RM3 diet for breeding (SDS, Special Diets Services). Slc20a2^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} mice on C57BL/6N background (thereafter named Slc20a2 KO mice) mice were obtained from the European Mouse Mutant Archive (EMMA). The mutant allele contains an IRES:*lacZ* trapping cassette and a splicing site inserted in the third exon of Slc20a2 gene, disrupting Slc20a2 gene function and allowing the use of LacZ as a reporter of Slc20a2 gene expression (Skarnes et al., 2011). Heterozygous mice were viable, fertile and bred normally. For gene expression analyses, C57BL/6J wild-type mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-St-Isle, France). Experiments on mice were conducted according to the French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on 6 June 2001) and to the National Institutes of Health Animal Welfare (project #02286.02).

Patients

All patients were informed and gave their formal consent to this study, which complied with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and in agreement with ethical guidelines set by French law (Bioethic law n°2004-800).

Tissue sample processing

First mandibular molar germ isolations were performed as previously described (Nait Lechguer *et al.*, 2008) from E14.5 to E18.5 embryos and P1 to P15 pups. The morning after the vaginal plug is designated E0.5. A total of 20 to 40 murine first mandibular molar germs were used for each developmental stage or age. Head samples for *in situ* hybridization and immunohistochemistry were harvested from C57BL/6J wild-type embryos from E12.5 to E18.5 and P1 to P10 pups. Head samples were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS, Life Technologies) during 24h to 48h depending on the size, and were then decalcified in EDTA 0.5M pH8 when appropriate (*i.e.* tissues samples after P3). Fixed samples were paraffin embedded using an automated tissue processor (Leica TP1020).

1
2
3 Serial 5µm-thick sections were obtained using a microtome (Microtome 2050® - Reichert
4 Jung). Kidneys, lungs and liver were harvested from 39 day-old C57BL/6 male mice to be
5 used as control tissues. Histology was performed on undecalcified samples that were fixed in
6 4% paraformaldehyde in PBS during 48 to 72h, according to the sample size. Samples were
7 then dehydrated through a graded series of ethanol and acetone baths and embedded in
8 methyl methacrylate (MMA) resin (Technovit 9100 NEW, Kulzer) in accordance with the
9 manufacturer's instructions. Human dental samples were harvested from patients needing
10 extraction of impacted third molars or germectomy from Nolla stages 6 to 9.
11
12
13
14
15
16
17

18 **Reverse transcription and real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)**

19 Total RNA was extracted from human and murine dental samples using a combination of
20 TRIzol® system (Ambion, Life Technologies) and Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel,
21 Germany). Briefly, human or mouse dental samples were crushed using the FastPrep®
22 system equipped with ceramic spheres in 0.5mL TRIzol®. The supernatant was then
23 processed for nucleic acid purification using the Nucleospin® system, according to the
24 manufacturer's instructions. After quantification using a UV spectrophotometer (Nanodrop
25 ND-1000, Labtech, Palaiseau, France), 0.5µg of RNA were reversed transcribed using
26 SuperScript®III (Life Technologies) as per manufacturer's instructions. Real-time PCR was
27 performed on a Bio-Rad CFX96 using SYBR®Select Master Mix (Life Technologies). The
28 following temperature profile was used: initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by
29 40 cycles of 5 seconds at 95°C and 20 seconds at 60°C. Expression of target genes were
30 normalized to *GusB* or *GAPDH* expression levels and the relative gene expression levels
31 were calculated as previously described (Livak and Schmittgen, 2001). The sequences of
32 primers used in this study are listed in Table 1.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 **In situ hybridization (ISH)**

45 Paraffin embedded sections for ISH were processed as previously described (Beck *et al.*
46 2010). DNA templates to generate RNA probes were amplified by PCR from relevant tissues.
47 Antisense and sense digoxigenin-labeled RNA probes were prepared by *in vitro* transcription
48 from a T7 or a SP6 promoter, according to the manufacturer's instructions (DIG RNA labeling
49 kit, Roche). Briefly, deparaffinized sections were treated with proteinase K (5 µg/ml) for
50 15 min at 37°C and incubated with 1 µg/ml labelled probe overnight at 50°C. Sections were
51 then treated with RNase A (20 µg/ml) and washed several times with 50% formamide/2×
52 SSC and 0.5× SSC at 42°C. Labelled cells were visualized using a DIG nucleic acid
53 detection kit (Roche Applied Science), according to the manufacturer's instructions, using
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 NBT/BCIP staining. Slc20a1 signal was detected using an amplification kit (TSA, Perkin
4 Elmer). Control ISH were performed on kidney, lung or liver, depending on the transporter.
5
6 Sections were mounted in aqueous solution (Mowiol®) and scanned using a Hamamatsu
7 NanoZoomer HT (Hamamatsu Photonics KK) digital scanner at a 40x magnification.
8
9

10 11 **Immunohistochemistry (IHC)**

12
13 Paraffin embedded sections for Slc34a2 IHC were processed as previously described (Beck
14 *et al.* 2010). For Slc34a2 immunohistochemistry, antigen retrieval was performed using
15 10mM citrate buffer pH6 for 20 minutes at 95°C. Sections were then incubated overnight at
16 4°C with primary antibody for Slc34a2 kindly provided by Pr Jurg Biber of the University of
17 Zurich (1:300). Biotinylated goat anti-mouse secondary antibody (Dako) was used at a 1:300
18 dilution. Staining was performed using a diaminobenzidine chromogen. For OPN and DSP
19 IHC, sections were prepared as previously described (Gaucher *et al.*, 2009) and the
20 polyclonal antibodies raised against SIBLINGs used were: the anti-dentin sialoprotein (DSP,
21 LF 153) and anti-osteopontin (OPN, LF 123) antibodies (generous gift from Larry Fisher
22 (National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, USA)). Stained sections
23 were then mounted with Eukitt® and scanned using a Hamamatsu NanoZoomer HT
24 (Hamamatsu Photonics KK) digital scanner at a 40x magnification.
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **X-Gal staining**

35
36 Samples for X-Gal staining were obtained from 1-month old Slc20a2 KO mice carrying a
37 LacZ allele. Dissected organs were fixed for 2 hours at room temperature in 4%
38 paraformaldehyde in PBS. Samples were rinsed several times with PBS and incubated
39 overnight at 32°C in X-Gal staining solution (PBS containing 0.01% Tween 20, 2 mM MgCl₂,
40 4 mM K₄Fe(CN)₆, 4 mM K₃Fe(CN)₆, and 1 mg/ml of X-gal). Then the samples were rinsed
41 several times with PBS, post-fixed in 4% paraformaldehyde, and stored at 4°C. For histology,
42 X-gal-stained dental samples were decalcified in 0.5M EDTA (pH8) for 1 to 3 weeks at 4°C.
43
44 Organs were then embedded in paraffin and cut at 7µm thickness using a Leica RM 2255
45 microtome.
46
47
48
49
50
51

52 **Histological stainings**

53
54 Forty µm-thick resin sections were obtained using a diamond wire saw (Leitz) after UV glue
55 fixation. Slices were treated 2 minutes with HCl 2% then stained with methylen blue and
56 basic fuchsin. Paraffin sections were stained with HES and mounted with Eukitt®. Sections
57
58
59
60

1
2
3 were scanned using a Hamamatsu NanoZoomer HT (Hamamatsu Photonics KK) digital
4 scanner at a 40X magnification.
5
6
7

8 **Statistics**

9
10 Experiments were repeated at least three times. Depending on the number of samples and
11 their distribution, results were analyzed using a one-way ANOVA, unpaired Student's t test or
12 a non-parametric Mann and Witney test. A p-value < 0.05 was considered statistically
13 significant. When not specified on figures, results were considered as not significant.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Results

Expression of sodium phosphate transporters during murine and human tooth development and mineralization

As a first step to determine the involvement of Pi transporters during murine dental development and mineralization, we have determined their expression in whole tooth germs by RT-qPCR from pre-natal stage E14.5 to postnatal day 15 (P15) in mice. Figure 1A depicts the normalized expressions of Pi transporters using *GusB* as a reference gene, relative to the expression level at E14.5. The expression profile of *Slc34a2* was biphasic, being strongly increased during post-natal stages, particularly after P6. The expression of *Slc20a1* and *Slc20a2* were low during prenatal stages and increased after birth. However, while the expression of *Slc20a1* oscillated and remained relatively low, *Slc20a2* showed a strong and constant increase in expression. In line with this observation, when comparing the relative levels of expression of the Pi transporters, *Slc20a2* was expressed at much higher levels than the other transporters with a 2-fold and 17-fold higher expression than *Slc20a1* at E14.5 and P7, respectively (Figure 1B). The expression of *Slc17a1* and *Slc34a3* were very low during pre- and post-natal stages, being close to the detection limit of the qPCR (Figure 1B). The expression of *Slc34a1* did not vary significantly during the course of the study (not shown) and remained very weak comparing to *Slc34a2*, *Slc20a1* or even more *Slc20a2* (Figure 1B). Finally, the expression pattern of the Pi exporter *Xpr1* was resembling the one of *Slc20a2* (Figure 1A), although its expression was much lower (Figure 1B). Importantly, the expression of all the Pi transporters were low during prenatal stages and remained high long after the mineralization initiation phase of dentin and enamel (Figure 1C).

We next investigated the relative expression of the Pi transporters in human tooth samples from Nolla stages 6 to 9. Results showed similarities to the mouse data since *SLC17A1* was undetectable (data not shown), whereas *SLC34A2*, *SLC20A1*, *SLC20A2* and *XPR1* could easily be amplified (Figure 1D). In contrast to the mice data *SLC34A1* was undetectable in human tooth samples (data not shown), whereas *SLC34A3* was readily detected (Figure 1D). *SLC20A2* was expressed at much higher levels than the other transporters (Figure 1E), displaying a 87-fold higher expression than *SLC20A1* at Nolla stage 6. No specific pattern of expression could be evidenced from Nolla stage 6 to 9 (Figure 1D).

Spatio-temporal expression of *Slc34a2*, *Slc20a1* and *Slc20a2* in odontogenesis

1
2
3 To confirm and extend our data obtained by RT-qPCR in whole tooth germs, we have
4 examined their spatio-temporal expression in wild-type mice from E14.5 to P15 using either
5 *in situ* hybridization (ISH), X-Gal staining or immunohistochemistry (IHC). Non radioactive
6 ISH probes for *Slc17a1*, *Slc34a1*, *Slc34a2* and *Slc34a3* were first tested on kidney sections
7 from wild-type mice, demonstrating a strong and specific signal with all the probes tested
8 (Appendix Figure 1A). Consistent with the RT-qPCR results, no signal could be detected for
9 *Slc17a1*, *Slc34a1* and *Slc34a3* in dental structures and peripheral structures on mouse head
10 sections from E13.5 to P10 (data not shown). Similarly, no signal could be detected using the
11 *Slc34a2* ISH probe in dental and peripheral structures on histological sections of mouse
12 heads from E13.5 to P4 (data not shown). However, from P6 and peaking at P10, a
13 significant *Slc34a2* signal was visible in mature ameloblasts of the first molar (Figure 2A).
14 Secretory ameloblasts of the second molar showed a weaker signal while no signal could be
15 detected in odontoblasts, at any investigated stage. Using a murine anti-Slc34a2 antibody
16 that has been validated on lung histological sections (Appendix Figure 1B), we could detect
17 the expression of Slc34a2 protein in ameloblasts during the development process between
18 P6 and P10. As shown on Figure 2B, a clear apical signal was detected in ameloblasts of the
19 incisors. The expression profile of Slc34a2 was consistent with the *in situ* hybridization data
20 of Onishi et al. (2007) showing a strong expression of *Slc34a2* from P2 to P10, mostly in
21 secretory and mature ameloblasts, confirming the late expression of *Slc34a2* in tooth.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Slc20a1 or Slc20a2 expression pattern using IHC was investigated using available
33 commercial antibodies. Unfortunately, all the experiments performed using many different
34 antibodies and IHC protocols showed that the signals obtained using wild-type mice could
35 not be distinguished from the signals obtained using either Slc20a1 or Slc20a2 KO embryos
36 and mice. Consequently, we investigated the expression of *Slc20a1* and *Slc20a2* using ISH
37 or LacZ expression marker, respectively. The *Slc20a1* ISH probe was validated earlier (Beck
38 et al. 2010). Using this ISH probe, we could not detect *Slc20a1* expression in tooth structures
39 from embryonic stages (data not shown). However, we could demonstrate a strong positive
40 ISH signal for Slc20a1 in mature ameloblasts from incisors at P10, and a fainter signal in
41 adjacent secretory ameloblasts (Figure 2C). Similar results were obtained at P6 (data not
42 shown). No specific Slc20a1 signal could be detected in odontoblasts (Figure 2C).
43
44
45
46
47
48
49

50 To determine the spatio-temporal expression of Slc20a2 in tooth, we took advantage
51 of the LacZ reporter cassette inserted into the genome of Slc20a2 KO mice to visualize the
52 expression of Slc20a2 (see Material and Methods). Using this approach, we could not detect
53 any LacZ expression in dental structures at any embryonic stages (data not shown).
54 However, a specific and intense LacZ signal was detected in the subodontoblastic layer and
55 in the stratum intermedium from both incisors and molars at 1 month of age (Figure 2D). A
56
57
58
59
60

1
2
3 specific and more diffuse signal was visible in the mesenchyme of the dental pulp.
4 Importantly, ameloblasts, odontoblasts and cementoblasts exhibited no LacZ signal (Figure
5 2D) at any investigated stage or age.
6
7
8
9

10 ***In vivo* involvement of Slc20a2 in tooth mineralization**

11
12 Our *in vivo* analysis of Na-Pi cotransporters expression during murine and human
13 dental odontogenesis has identified Slc20a2 as the most significantly expressed Na-Pi
14 cotransporter, both during pre-natal and post-natal stages. Surprisingly, spatio-temporal
15 analysis of LacZ expression in Slc20a2 KO mice suggested that Slc20a2 was not expressed
16 in mineralizing cells but rather in adjacent cells, *i.e.* the stratum intermedium in vicinity of
17 ameloblast epithelium, and the subodontoblastic layer (Hoehl cells). To determine the
18 physiological relevance of these observations on tooth mineralization, we analysed the teeth
19 of young (1 month-old) and older mice (8 to 9 months-old) deficient for Slc20a2.
20
21
22
23

24
25 Using staining of thick undecalcified sections of incisors, we showed that the
26 thickness and gross aspect of enamel was similar between wild-type and Slc20a2 KO mice,
27 both at 1-month (Figure 3 A-B) and 8-months of age (Figure 3 C-D). At the cellular level, the
28 histological examination of the ameloblasts palisade did not show significant differences
29 between the two mice at both ages (Figure 3E-F and G-H). In contrast, the dentin and
30 predentin layers were specifically modified in Slc20a2-deficient mice. The thickness of the
31 predentin layer was increased in mutant mice, both in young and old mice, whereas the
32 thickness of the dentin layer was decreased (Figure 3A-B and C-D). Nevertheless the total
33 thickness of the two layers remained similar between mutant and wild-type mice.
34 Interestingly, the mineralization front between the predentin and dentin layers exhibited
35 excessive unmerged calcospherites (Figure 3J and 3L), a feature that has been well
36 documented in X-linked hypophosphatemic rickets (Boukpepsi *et al.*, 2006; Salmon *et al.*
37 2014) and that may be related to the abnormal large interglobular spaces observed all
38 through the dentin. The predentin/dentin phenotype did not improve with age when
39 comparing 1 month-old to 8 months-old animals. Finally, the histological examination of the
40 cement could not reveal any obvious difference between the two mouse strains at both age
41 (Figure 3M-N and O-P).
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 We next examined the expression of dentin sialo protein (DSP) and osteopontin
52 (OPN), two major actors in dental mineralization that have been previously shown to be
53 associated with unmineralized dentin areas and abnormal interglobular spaces (Salmon *et al.*
54 2012). Using IHC, we could not detect any difference in the expression pattern of DSP and
55 OPN between 1 month-old wild-type and *Slc20a2*-deficient mice (Figure 4). Both DSP and
56
57
58
59
60

1
2
3 OPN were detected as expected in unmineralized dentin areas such as predentin nearby
4 odontoblasts palisade on both wild-type and *Slc20a2*-deficient sections (Figure 4A-D), and in
5 abnormal interglobular spaces of *Slc20a2*-deficient dentin sections. DSP staining usually
6 found in dentin tubules is maintained in *Slc20a2*-deficient mice (Figure 4B and D). OPN was
7 also detected as expected in the cement of both wild-type and mutant mice, with no obvious
8 difference (Figure 4F and H).
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Discussion

Knowledge on Na-Pi cotransporters function has been largely inferred based on their tissue distribution profile. For instance, Slc34a1 being almost exclusively expressed in the proximal tubules of the kidneys was proven to be the major Na-Pi cotransporter responsible for Pi reabsorption (Beck et al. 1998, Kronenberg 2002). Similarly, the very strong hepatic expression of Slc20a1 during development was correlated to its role in hepatoblast development and erythroid maturation (Beck et al. 2010, Forand et al. 2013; Liu et al. 2013), whereas the strong expression of Slc17a1 in the kidney was correlated with renal underexcretion gout (Chiba *et al.* 2015, Hollis-Moffatt *et al.* 2012). In this study, using whole germ cells allowing preserving the tooth spatial organization, the epithelial-mesenchymal interactions and the diversity of cell types, we provided an exhaustive spatio-temporal information on the expression of the known Pi transporters in the tooth, with the aim to get insights into their role in this tissue.

Our most striking finding is that none of the transporters were expressed at a high level at the time of mineralization initiation (Figure 1C). This is in contrast with current hypotheses establishing that Pi transporters would necessarily be expressed in mineralizing cells during this crucial step to provide enough Pi for the nucleation and growth of HA crystals. Rather, we showed that the expression of Pi transporters peaked long after the initiation of dentin or enamel mineralization. This suggests that while they can still be important for some aspects of tooth mineralization in young animals or adults (such as the maturation phase), the currently known Pi transporters are likely dispensable for the initiation of tooth mineralization.

This hypothesis is reinforced by the analysis of the dental phenotype of mice harboring mutations in Pi transporter genes or relevant human genetic disease. Using a mouse model expressing only 15% of wild-type Slc20a1 (hypomorphic mouse), we have shown that Slc20a1 did not contribute to the skeletal mineralization (Bourgine et al. 2013). Although we did not performed a detailed analysis of the dental phenotype, no gross dental abnormalities could be evidenced. In line with this observation, recent preliminary results using DMP1-Cre;Slc20a1^{loxlox} mice allowing for the removal of Slc20a1 in odontoblasts confirmed the absence of dentin impairment in absence of Slc20a1 (unpublished data). Similarly, we could not detect obvious dental phenotype in Slc34a1 KO mice (Beck et al. 1998 and unpublished data), consistent with the very faint expression of Slc34a1 in mouse germ samples and its absence from human samples (this study). This is in line with the previously reported absence of Slc34a1 expression in dental germs and various cell culture

1
2
3 models (Onishi *et al.* 2007, Tada *et al.* 2011, Merametdijan *et al.* 2016) and strengthens the
4 idea that the physiological contribution of Slc34a1 to odontogenesis is minor or negligible, at
5 least in mice. In humans, mutation or deletion of the *SLC34A3* gene is responsible for
6 Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria (HHRH) (Bergwitz *et al.* 2006,
7 Ichikawa *et al.* 2006). Like other inherited disorders of Pi wasting, HHRH is characterized by
8 reduced tubular reabsorption of Pi leading to hypophosphatemic rickets, bowing, and short
9 stature. However, in contrast to the characteristics of X-linked hypophosphatemic rickets
10 (XLH; mutant PHEX) and autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR; mutant
11 FGF23), serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D in HHRH are appropriately elevated for low
12 serum Pi levels, supporting a primary renal defect (Tieder *et al.* 1985). Interestingly, although
13 XLH patients have poorly mineralized teeth, including enamel hypoplasia with a defect of the
14 formation of HA crystals showing an altered Ca/Pi ratio, and presence of interglobular dentin
15 originating from insufficient fusion of calcospherites (Forster *et al.* 2014, Opshal-Vital *et al.*
16 2012), no similar observations were reported for HHRH patients. In line with this lack of
17 report, we have shown that Slc34a3 expression in mouse germ samples was undetectable
18 and remained quite low in human germs. In addition, Slc34a3 has a low Pi transport capacity
19 and very low concentrating capacity (Virkki *et al.* 2007). Therefore, its low expression and
20 poor Pi transport properties make this transporter an inadequate candidate to face the high
21 Pi needs required for tooth mineralization.
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Here, we identified Slc20a2 as being the most highly expressed Pi cotransporter in
33 tooth and demonstrated that absence of Slc20a2 in mice led to a dentin dysplasia resembling
34 the tooth phenotype of XLH and HHRH patients, as well as the DSPP^{-/-} mouse model
35 reflecting human dentinogenesis imperfecta type II or III (Gaucher *et al.*, 2009, Lorenz-
36 Depiereux *et al.* 2006, Sreenath *et al.* 2003). Strikingly, while XLH and HHRH patients, and
37 Dspp KO mice are hypophosphatemic, the Slc20a2 KO mouse was shown to be
38 normophosphatemic (Jensen *et al.* 2015). At first sight it seems difficult to reconcile the
39 similar phenotypes arising from different gene mutations on the sole basis of Pi serum levels.
40 However, it remains possible that the local extracellular Pi level, rather than serum Pi levels,
41 may be a key factor in the etiology of the shared phenotype.
42
43
44
45
46
47

48 Indeed, *SLC20A2* mutations in humans were shown to be causative of idiopathic
49 basal ganglia calcification (IBGC), characterized by calcification in the basal ganglia and
50 other brain regions and inducing a wide spectrum of neuropsychiatric symptoms (Wang *et al.*
51 2012). In this disease, it was shown that Ca/P deposits are predominantly located within the
52 walls of small arteries and veins (Wallingford MC *et al.* 2016). Although further studies are
53 needed to elucidate the molecular mechanisms of IBGC, it would not be unreasonable to
54 postulate that the absence of SLC20A2 in the epithelium of the vessels is precluding Pi to
55
56
57
58
59
60

1
2
3 reach the extracellular compartment, which then accumulates within the vessels. A drop in Pi
4 availability in the vicinity of mineralizing cells would then results in a phenotype similar to
5 hypophosphatemic conditions. It is noteworthy that mutations in the mammalian Pi exporter
6 XPR1 gene in humans also lead to IBGC (Legati *et al.* 2015). Our present expression data
7 showed that Xpr1 was strongly expressed in murine dental germs, displaying the same
8 kinetic profile than Slc20a2. A deficiency in Pi uptake by Slc20a2 or Pi export by Xpr1 are
9 likely to preclude Pi to be transported through the vascular wall, both resulting in a decrease
10 in local Pi availability. Consistent with this hypothesis, one of our most singular finding was
11 the description of high level of Slc20a2 expression in cells adjacent to mineralizing cells *i.e.*
12 the stratum intermedium, the subodontoblastic layer of Hoehl cells and the pulp. The levels
13 of Slc20a2 expression in mineralizing odontoblasts and ameloblasts remained very low. An
14 earlier study using ISH has reported similar findings, locating Slc20a2 in the stratum
15 intermedium, dental papilla and stellar reticulum cells subodontoblastic layers (Zhao *et al.*,
16 2006). Consistent with these data, our preliminary phenotypic investigation of the dental
17 phenotype of DMP1-Cre;Slc20a2^{lox/lox} mice could not demonstrate abnormalities in mutant
18 mice (data not shown), confirming that the presence of Slc20a2 in mineralizing odontoblasts
19 is dispensable for dentin mineralization. Rather, the major dentin dysplasia observed in
20 Slc20a2 mutant mice arises from defects in non-mineralizing cells.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 Overall our data are questioning the role of Slc20a2, and other Pi transporters, in
32 mineralizing dental cells. The kinetic and/or level of expression, the cellular localization and
33 the mouse and/or human phenotypes associated with Pi transporter defects are not in favor
34 of a major role of the currently known Pi transporters in the initiation of dental mineralization.
35 In addition, the tremendous quantities of Pi needed for dental mineralization are at odds with
36 the low transporting capacity of the known Pi transporters. Other Pi transporters displaying a
37 weak affinity for Pi but a high transport capacity may exist in bone, as was described for
38 renal cells in early studies (Tenenhouse *et al.* 1989, Barac-Nieto *et al.* 2001). The bulk of Pi
39 necessary for mineralization purposes would then be handled by membrane transport
40 proteins with a Pi affinity much closer to the extracellular Pi concentrations in the vicinity of
41 mineralizing cells. As was shown here, the currently known Pi transporters being expressed
42 at later stages, would rather participate, directly or indirectly, to the regulation and
43 maintenance of tooth mineralization throughout life span. Such hypothesis is in line with the
44 documented role of Slc20a1 in adult rats whereby overexpression of Slc20a1 led to enamel
45 anomalies including hypoplasia and enamel mineralization delay, together with an increase
46 in serum Pi levels and an absence of dentin phenotype (Yoshioka *et al.*, 2011). Although the
47 precise mechanism involved was not clearly described, this phenotype arose in adult rats
48 only (8 months-old), long after the initiation of mineralization.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In summary, by documenting the spatio-temporal expression of the high affinity Pi
4 transporters in tooth, our study has shed light on their possible involvement during the
5 initiation of tooth mineralization leading to the notion that none of the currently identified high-
6 affinity Pi transporter are mandatory for this process. Clearly further work is needed to
7 decipher their role in tooth mineralization during aging and to identify other putative Pi
8 transport systems at work during tooth mineralization, particularly during the initiation of this
9 process.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Acknowledgments

This work was supported by INSERM, Université de Nantes, Région Pays de Loire, IFRO and CHU de Nantes. We gratefully thank Frederic Lezot for his helpful advice; the team of Hervé Lesot (INSERM UMR 1109, Strasbourg, France), particularly Laetitia Keller and Tunay Kokten, for teaching the tooth germ dissection technique; Ms Constance Artus, Mathilde Mangel and Julie Lesieur for their contribution to histological work. The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

For Peer Review

References

Barac-Nieto M, Alfred M, Spitzer A. 2001. Phosphate depletion in opossum kidney cells: apical but not basolateral or transepithelial adaptations of Pi transport. *Exp Nephrol.* 9(4):258-64.

Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS. 1998. Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5372–5377.

Beck L, Leroy C, Beck-Cormier S, Forand A, Salaün C, Paris N, Bernier A, Ureña-Torres P, Prié D, Ollero M *et al.* 2010. The Phosphate Transporter PiT1 (Slc20a1) Revealed As a New Essential Gene for Mouse Liver Development. *PLoS ONE.* 5(2): 9148.

Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Osti JC, Bastepe M, Abu-Zahra H, Frappier D, Burkett K, Carpenter TO, Anderson D. *et al.* 2006. SLC34A3 Mutations in Patients with Hereditary Hypophosphatemic Rickets with Hypercalciuria Predict a Key Role for the Sodium-Phosphate Cotransporter NaPi-IIc in Maintaining Phosphate Homeostasis. *Am J Hum Genet* 78(2):179–192.

Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, Stevens MM. 2012. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;109(35):14170-5.

Boukpepsi T, Septier D, Bagga S, Garabedian M, Goldberg M, Chaussain-Miller C. 2006. Dentin alteration of deciduous teeth in human hypophosphatemic rickets. *Calcif Tissue Int.* 79(5):294-300.

Bourgine A, Beck L, Khoshniat S, Wauquier F, Oliver L, Hue E, Alliot-Licht B, Weiss P, Guicheux J, Wittrant Y. 2011. Inorganic phosphate stimulates apoptosis in murine MO6-G3 odontoblast-like cells. *Arch Oral Biol.* 56(10):977-83.

Bourgine A, Pilet P, Diouani S, Sourice S, Lesoeur J, Beck-Cormier S, Khoshniat S, Weiss P, Friedlander G, Guicheux J *et al.* 2013. Mice with hypomorphic expression of the sodium-phosphate cotransporter PiT1/Slc20a1 have an unexpected normal bone mineralization. *PLoS One.* 13;8(6):e65979.

Chiba T, Matsuo H, Kawamura Y, Nagamori S, Nishiyama T, Wei L, Nakayama A, Nakamura T, Sakiyama M, Takada T, *et al.* 2015. NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol.* 67(1):281-7.

Forand A, Beck L, Leroy C, Rousseau A, Boitez V, Cohen I, Courtois G, Hermine O, Friedlander G. 2013. EKLF-driven PIT1 expression is critical for mouse erythroid maturation

1
2
3 in vivo and in vitro. *Blood*. 121(4):666-78.

4 Foster BL, Nociti FH, Somerman MJ. 2014. The rachitic tooth. *Endocr Rev*. 35(1):1–34.

5
6 Gaucher C, Boukpepsi T, Septier D, Jehan F, Rowe PS, Garabédian M, Goldberg M,
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Chaussain-Miller C. 2009. Dentin non collagenous matrix proteins in familial hypophosphatemic rickets. *Cells Tissues Organs*. 189(1-4):219-23.

Habraken WJ, Tao J, Brylka LJ, Friedrich H, Bertinetti L, Schenk AS, Verch A, Dmitrovic V, Bomans PH, Frederik PM *et al*. 2013. Ion-association complexes unite classical and non-classical theories for the biomimetic nucleation of calcium phosphate. *Nat Commun*. 4:1507

Hollis-Moffatt JE, Phipps-Green AJ, Chapman B, Jones GT, van Rij A, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, Jones PB, Montgomery GW, *et al*. 2012. The renal urate transporter SLC17A1 locus: confirmation of association with gout. *Arthritis Res Ther*. 14(2):92.

Ichikawa S, Sorenson AH, Imel EA, Friedman NE, Gertner JM, Econs MJ. 2006. Intronic deletions in the SLC34A3 gene cause hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab*;91(10):4022–4027.

Jensen N, Autzen JK, Pedersen L. 2016. Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid. *Neurogenetics*. 17(2):125-30.

Kronenberg HM. 2002. NPT2a-the key to phosphate homeostasis. *N Engl J Med*. 26;347(13):1022-4.

Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JR, Sears RL, Ramos EM, Spiteri E, Sobrido MJ *et al*. 2015. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat Genet*. 47(6):579-81.

Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-8.

Liu L, Sánchez-Bonilla M, Crouthamel M, Giachelli C, Keel S. 2013. Mice lacking the sodium-dependent phosphate import protein, PiT1 (SLC20A1), have a severe defect in terminal erythroid differentiation and early B cell development. *Exp Hematol*. 41(5):432-43.e7.

Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Eckstein G, Tenenbaum-Rakover Y, Wagenstaller J, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Albers N, Lichtner P, Schnabel D, *et al*. 2006. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria is caused by mutations in the sodium-phosphate cotransporter gene SLC34A3. *Am J Hum Genet*. 78(2):193-201.

Lundquist P, Ritchie HH, Moore K, Lundgren T, Linde A. 2002. Phosphate and calcium uptake by rat odontoblast-like MRPC-1 cells concomitant with mineralization. *J. Bone Miner. Res*. 17(10):1801-1813.

1
2
3 Merametdjian L, David A, Bon N, Couasnay G, Guicheux J, Gaucher C, Beck-Cormier S,
4 Beck L. 2016. Expression of phosphate transporters in optimized cell culture models for
5 dental cells biomineralization. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 53(1):16.
6

7
8 Millán JL. 2013. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif*
9 *Tissue Int.* 93(4):299-306.
10

11 Miyaji T, Kawasaki T, Togawa N, Omote H, Moriyama Y. 2013. Type 1 sodium-dependent
12 phosphate transporter acts as a membrane potential-driven urate exporter. *Curr Mol*
13 *Pharmacol.* 6(2):88-94.
14

15
16 Miyamoto K, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S,
17 Tatsumi S, Kaneko I *et al.* 2010 Sodium-dependent phosphate cotransporters: lessons from
18 gene knockout and mutation studies. *J Pharm Sci.* 100(9):3719-30.
19

20
21 Nait Lechguer A, Kuchler-Bopp S, Hu B, Haikel Y, Lesot H. 2008. Vascularization of
22 engineered teeth. *J Dent Res.* 87(12):1138-43.
23

24
25 Onishi T, Okawa R, Ogawa T, Shintani S, Ooshima T. 2007. Phex mutation causes the
26 reduction of npt2b mRNA in teeth. *J Dent Res.* 86(2):158-62.
27

28
29 Opsahl Vital S, Gaucher C, Bardet C, Rowe PS, George A, Linglart A, Chaussain C. 2012.
30 Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. *Bone.* 50(4):989-
31 97.
32

33
34 Salmon B, Bardet C, Coyac BR, Baroukh B, Naji J, Rowe PS, Opsahl Vital S, Linglart A,
35 Mckee MD, Chaussain C. 2014. Abnormal osteopontin and matrix extracellular
36 phosphoglycoprotein localization, and odontoblast differentiation, in X-linked
37 hypophosphatemic teeth. *Connect Tissue Res. Suppl 1:*79-82.
38

39
40 Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M,
41 Harrow J, Cox T *et al.* 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of
42 mouse gene function. *Nature.* 474(7351):337-42.
43

44
45 Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT,
46 MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB. 2003. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse
47 teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to
48 human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem.* 278(27):24874-80.
49

50
51 Tada H, Nemoto E, Foster BL, Somerman MJ, Shimauchi H. 2011. Phosphate increases
52 bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and
53 ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone.* 48(6):1409-1416.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Tenenhouse HS, Klugerman AH, Neal JL. 1989. Effect of phosphonoformic acid, dietary
4 phosphate and the Hyp mutation on kinetically distinct phosphate transport processes in
5 mouse kidney. *Biochim Biophys Acta*. 984(2):207-13.
6

7
8 Tieder M, Modai D, Samuel R, Arie R, Halabe A, Bab I, Gabizon D, Liberman UA. 1985.
9 Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *N Engl J Med* 1985;312(10):611-
10 617.
11

12
13 Veis A, Dorvee JR. 2013. Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal
14 nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int*. 93(4):307-15.
15

16
17 Virkki LV, Biber J, Murer H, Forster IC. 2007. Phosphate transporters: a tale of two solute
18 carrier families. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293(3):F643-54.
19

20
21 Wallingford MC, Chia J, Leaf EM, Borgeia S, Chavkin NW, Sawangmake C, Marro K, Cox
22 TC, Speer MY, Giachelli CM. 2016 SLC20A2 deficiency in mice leads to elevated phosphate
23 levels in cerebrospinal fluid and glymphatic pathway-associated arteriolar calcification, and
24 recapitulates human idiopathic basal ganglia calcification. *Brain Pathol*.
25 doi:10.1111/bpa.12362
26

27
28 Wang C, Li Y, Shi L, Ren J, Patti M, Wang T, de Oliveira JR, Sobrido MJ, Quintáns B,
29 Baquero M, et al. 2012. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia
30 calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet*. 44(3):254-6.
31

32
33 Werner A, Dehmelt L, Nalbant P. 1998. Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi
34 protein families. *J Exp Biol*. 201(Pt 23):3135-42.
35

36
37 Wittrant Y, Bourguine A, Khoshniat S, Alliot-Licht B, Masson M, Gatius M, Rouillon T, Weiss
38 P, Beck L, Guicheux J. 2009. Inorganic phosphate regulates Glvr-1 and -2 expression: role of
39 calcium and ERK1/2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 381(2):259-
40 263.
41

42
43 Yoshioka H, Yoshiko Y, Minamizaki T, Suzuki S, Koma Y, Nobukiyo A, Sotomaru Y, Suzuki
44 A, Itoh M, Maeda N. 2011. Incisor Enamel Formation is Impaired in Transgenic Rats
45 Overexpressing the Type III NaPi Transporter Slc20a1. *Calcif Tissue Int*. 89(3):192-202.
46

47
48 Zhao D, Vaziri Sani F, Nilsson J, Rodenburg M, Stocking C, Linde A, Gritli-Linde A. 2006.
49 Expression of Pit2 sodium-phosphate cotransporter during murine odontogenesis
50 developmentally regulated. *Eur J Oral Sci*. 114(6):517-523.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legends

Figure 1. Expression of phosphate transporters during murine tooth development and mineralization. Molar germs were extracted from mice aged from E14.5 to P15, RNAs were extracted, reverse-transcribed and Pi transporter expressions were quantified by real-time PCR (A) Relative RNA expression levels of *Slc34a2*, *Slc20a1*, *Slc20a2* and *Xpr1* from E14.5 to P15 mandibular molar germs were determined by real-time PCR. Results were normalized using *Gusb* as a reference gene, and expressed relative to the expression level at E14.5 (set as 1). For each point, 20 to 40 murine tooth germs were used. *Slc17a1*, *Slc34a1* and *Slc34a3* expressions remained either very low or undetectable at any time point (not shown). (B) Comparison of the RNA expression levels of Pi transporters at E14.5 and P7 in molar germs. The expression of Pi transporters was calculated relative to the expression of *Slc20a1* at E14.5, set as 1. For instance, this graph shows that *Slc20a2* is expressed 2-fold (E14.5) and 17-fold (P7) more than *Slc20a1*, whereas the expression of *Slc17a1* is 100- to 1000-fold less than *Slc20a1*. Note that *Slc34a3* was not detected (C) Schematic time scale of dental development and mineralization illustrated by HES stainings on paraffin sections at E12.5 (placode), E13.5 (bud), E14.5 (cap), P3 (first molar crown completed) and P21 (molar radiculogenesis completed). The approximative time frames of tooth development and mineralization are indicated. (D) Relative RNA expression levels of *SLC34A2*, *SLC34A3*, *SLC20A1*, *SLC20A2* and *XPR1* in Nolla stages 6 to 9 human dental samples. Third molar germs (n=9) were removed surgically from patients (n=5), RNA were extracted, reverse-transcribed and Na-Pi cotransporter expressions were quantified by real-time PCR. *SLC17A1* and *SLC34A1* expressions were undetectable at any stage (not shown). (E) Comparison of the RNA expression levels of Pi transporters at Nolla stage 6 in human molar germs. The expression of Pi transporters was calculated relative to the expression of *SLC20A1*, set as 1.

Figure 2. Spatio temporal expression of *Slc34a2*, *Slc20a1* and *Slc20a2* during dental development. Head samples were harvested from C57BL/6J wild-type embryos or pups, decalcified and paraffin-embedded prior to *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC). (A) ISH using an *Slc34a2* probe showed an intense signal in mature ameloblasts of the first mandibular molar at P10 (black triangle). A magnification is showed on the right panel. A weaker signal is obtained in secretory ameloblasts of the second molar. Bar = 100µm. (B) *Slc34a2* IHC in mouse incisor at P10: note the specific

1
2
3 signal (black triangle) visible in the ameloblasts and the absence of signal in the odontoblasts
4 (white arrowhead) or in any other dental cells. A magnification is showed on the right panel.
5 Bar = 100µm. **(C)** *Slc20a1* ISH in the incisor of P6 mouse pups using a TSA amplification kit
6 revealing a specific *Slc20a1* signal in mature ameloblasts and a weaker signal in secretory
7 ameloblasts (black triangles). No signal was detected in odontoblasts (white arrowhead). Bar
8 = 250µm. **(D)** X-Gal stainings of 1 month-old paraffin-embedded *Slc20a2* KO incisors. The
9 strongest staining was observed in the stratum intermedium and subodontoblastic layer
10 (black triangles), a more diffuse signal in the pulp was observed and no signal could be seen
11 in the cementum. Bar = 250 µm. *am*=ameloblasts; *d*=dentin; *e*=enamel; *m1*= first molar;
12 *m2*=second molar; *mr*=molar root; *od*=odontoblasts; *p*=pulp; *si*=stratum intermedium.
13
14
15
16
17
18
19

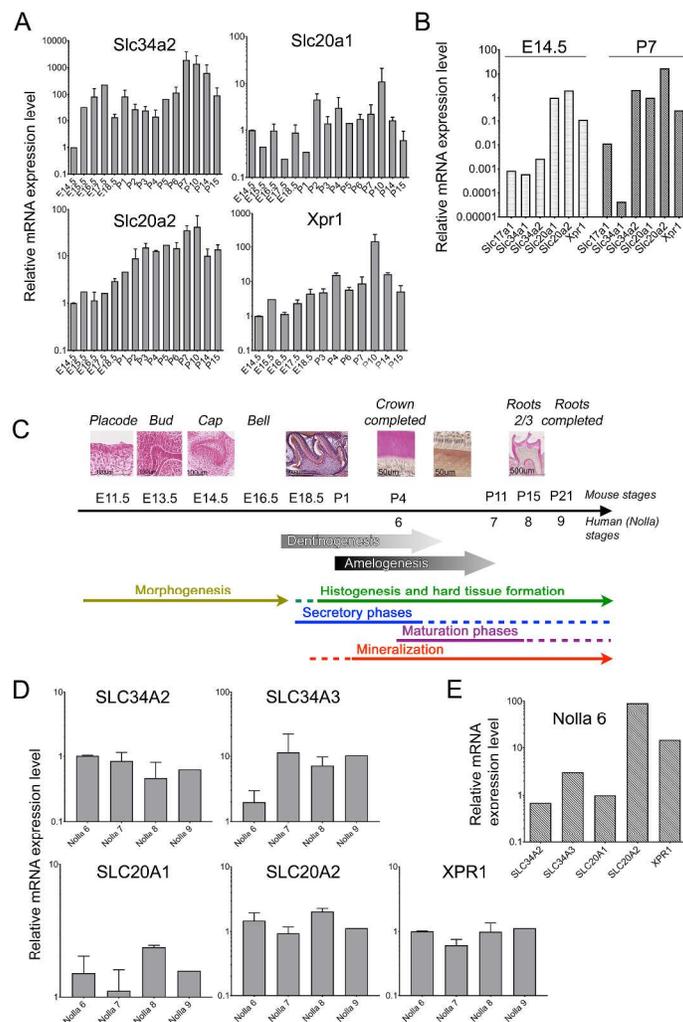
20 **Figure 3. *Slc20a2*-deficient mice display an abnormal dentinogenesis.** Incisors from 1
21 month- and 9 month-old wild-type and *Slc20a2* KO mice were resin-embedded, cut into
22 70µm-thick slices which were then stained with toluidine blue and red fuchsin. **(A-D)** An
23 enlarged predentin layer is visible in *Slc20a2* KO mice at both age, together with no gross
24 modification of the total thickness of the combined predentin/dentin layer (arrow) as well as
25 the enamel layer. **(E-H)** At both age, the ameloblast layer of *Slc20a2* KO animals did not
26 show significant differences. **(I-L)** At higher magnification, the examination of the predentin
27 layer of mutant mice revealed the presence of calcospherites (arrowheads). **(M-P)** No
28 obvious difference could be observed in the cementum layer of mutant *Slc20a2* mice when
29 compared to wild-type mice. Bar=25 µm. *am*: ameloblasts; *d*: dentin; *e*: enamel; *od*:
30 odontoblasts; *pd*: predentin.
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **Figure 4. DSP and OPN expression are normal in *Slc20a2*-deficient incisors.** Incisors
40 from 1 month-old wild-type and *Slc20a2* KO mice were decalcified and paraffin-embedded
41 before processing to IHC. **(A-D)** Dentin sialoprotein IHC reveal no obvious difference
42 between wild-type and *Slc20a2*-deficient animals. **(E-H)** Similarly, osteopontin IHC revealed
43 a normal pattern in odontoblasts and cementoblasts (black arrowheads). Bar=50 µm. *d*:
44 dentin; *od*: odontoblasts; *pd*: predentin.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Sequences of oligonucleotides used for murine and human PCR and ISH

Gene	Application	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<i>mSlc17a1</i>	PCR	CTCTTGCTGGGTTGATCCTT	GCCAGGCATGTCACGTT
	ISH probe	TGGGTGTGTTCTGAGTCTTTCC	GCATTGATAAGTTGTCCGAGTA
<i>mSlc34a1</i>	PCR	AGCACCTCGACATCCATCAT	CGGAGCTCACCTCCAACA
	ISH probe	AGCCCCAGGGAGAAGCTATC	TACAAAAGCCCATGCCACTG
<i>mSlc34a2</i>	PCR	CAGACCCCTTCACAAAGCTC	CCATTGCAATTTGTTGGATG
	ISH probe	GGAGGCCAGCAAAACAAATG	GCTTTGTGAAGGGGTCTGTGA
<i>mSlc34a3</i>	PCR	AGCTGAAGAATACTGACCAACTC A	GACCACCTGGTGCAGCTT
	ISH probe	GCTGCTGGTGTCTGTGTCT	AGCCCTGCTCCTCTGTCTTAG
<i>mSlc20a1</i>	PCR	GGAAGGACCTGACACCAATC	GGGAAGGCCAATGTTTGAT
	ISH probe	TGTGGCAA TGGGCAGAAG	AGAAAGCAGCGGAGAGACGA
<i>mSlc20a2</i>	PCR	CCCATCACACCGTCCAGT	CAATGTTGGAGGCGATCA
<i>mDSPP</i>	PCR	ATGGCAGTGAGATAGGAGAGC	GTGTTCCCCTGTTCTGTTACTAA
<i>mMMP20</i>	PCR	AAGTTGGGTACATCAGTGCTG	GACACACATTTGACAATGCT
<i>mGusB</i>	PCR	CTCTGGTGGCCTTACCTGAT	CAGTTGTTGTCACCTTCACCTC
<i>mXpr1</i>	PCR	GTGGAGCAGATTGGCGAGT	GGACCCGTAACCGCTTCAT
<i>hSLC17A1</i>	PCR	TCTTACAGCAGCAGGATTTCTC	ACACTCCACCCAAGCAAAAG
<i>hSLC34A1</i>	PCR	CAGCCAGACCCTTGAAATG	CTAGGAGGATGAGGCAGGTG
<i>hSLC34A2</i>	PCR	GTCAAGATCCTGGGCTCTGT	AGCCAGTCAACCATGCAAAG
<i>hSLC34A3</i>	PCR	TGGGCTCCTGGGTAACATT	AGATCTGTGTGGTGGTGTGAG
<i>hSLC20A1</i>	PCR	GTTCTGTCATTCATCCTCCAT	TGGTACCCACAGAGGAAGTTT
<i>hSLC20A2</i>	PCR	TCTCATGGCTGGGGAAGTTAGT	TTGCGACCAGTGAGAATCCTAT
<i>hXPR1</i>	PCR	CTTCCTTATCAACCCACCAAA	GCCAGAAATCAGCAAAGCCT
<i>hGAPDH</i>	PCR	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	GGATCTCGCTCCTGGAAGATG

Figure 1. Merametdjian et al.



Expression of phosphate transporters during murine tooth development and mineralization. Molar germs were extracted from mice aged from E14.5 to P15, RNAs were extracted, reverse-transcribed and Pi transporter expressions were quantified by real-time PCR (A) Relative RNA expression levels of Slc34a2, Slc20a1, Slc20a2 and Xpr1 from E14.5 to P15 mandibular molar germs were determined by real-time PCR. Results were normalized using GusB as a reference gene, and expressed relative to the expression level at E14.5 (set as 1). For each point, 20 to 40 murine tooth germs were used. Slc17a1, Slc34a1 and Slc34a3 expressions remained either very low or undetectable at any time point (not shown). (B) Comparison of the RNA expression levels of Pi transporters at E14.5 and P7 in molar germs. The expression of Pi transporters was calculated relative to the expression of Slc20a1 at E14.5, set as 1. For instance, this graph shows that Slc20a2 is expressed 2-fold (E14.5) and 17-fold (P7) more than Slc20a1, whereas the expression of Slc17a1 is 100- to 1000-fold less than Slc20a1. Note that Slc34a3 was not detected (C) Schematic time scale of dental development and mineralization illustrated by HES stainings on paraffin sections at E12.5 (placode), E13.5 (bud), E14.5 (cap), P3 (first molar crown completed) and P21 (molar radiculogenesis completed). The

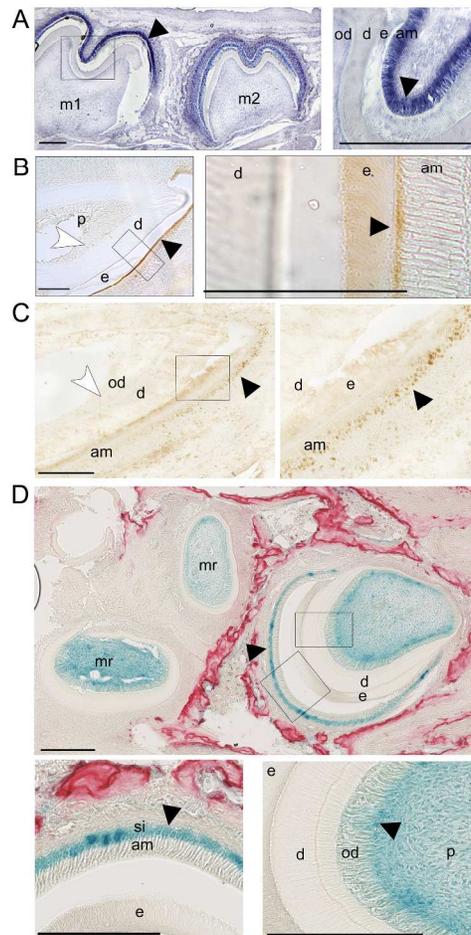
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

approximative time frames of tooth development and mineralization are indicated. (D) Relative RNA expression levels of SLC34A2, SLC34A3, SLC20A1, SLC20A2 and XPR1 in Nolla stages 6 to 9 human dental samples. Third molar germs (n=9) were removed surgically from patients (n=5), RNA were extracted, reverse-transcribed and Na-Pi cotransporter expressions were quantified by real-time PCR. SLC17A1 and SLC34A1 expressions were undetectable at any stage (not shown). (E) Comparison of the RNA expression levels of Pi transporters at Nolla stage 6 in human molar germs. The expression of Pi transporters was calculated relative to the expression of SLC20A1, set as 1.

Figure 1
297x420mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

Figure 2. Merametdjian et al.



Spatio temporal expression of *Slc34a2*, *Slc20a1* and *Slc20a2* during dental development. Head samples were harvested from C57BL/6J wild-type embryos or pups, decalcified and paraffin-embedded prior to in situ hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC). (A) ISH using an *Slc34a2* probe showed an intense signal in mature ameloblasts of the first mandibular molar at P10 (black triangle). A magnification is showed on the right panel. A weaker signal is obtained in secretory ameloblasts of the second molar. Bar = 100 μ m. (B) *Slc34a2* IHC in mouse incisor at P10: note the specific signal (black triangle) visible in the ameloblasts and the absence of signal in the odontoblasts (white arrowhead) or in any other dental cells. A magnification is showed on the right panel. Bar = 100 μ m. (C) *Slc20a1* ISH in the incisor of P6 mouse pups using a TSA amplification kit revealing a specific *Slc20a1* signal in mature ameloblasts and a weaker signal in secretory ameloblasts (black triangles). No signal was detected in odontoblasts (white arrowhead). Bar = 250 μ m. (D) X-Gal stainings of 1 month-old paraffin-embedded *Slc20a2* KO incisors. The strongest staining was observed in the stratum intermedium and subodontoblastic layer (black triangles), a more diffuse signal in the pulp was observed and no signal could be seen in the cementum. Bar = 250 μ m. am=ameloblasts; d=dentin;

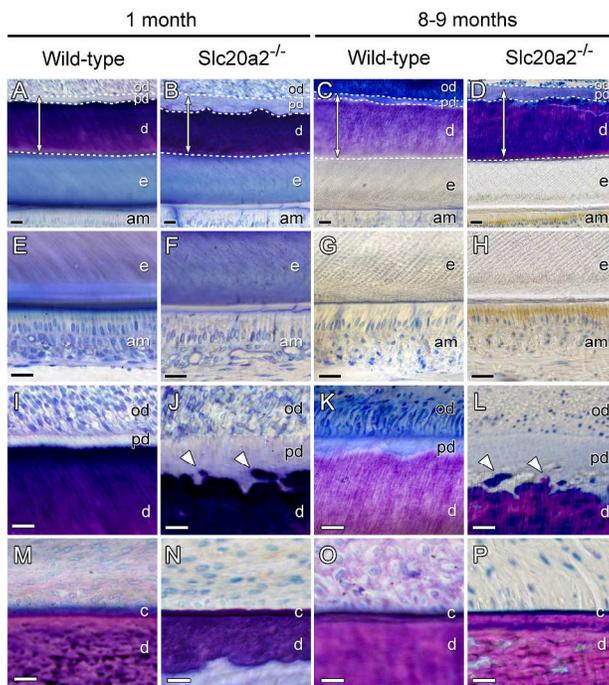
e=enamel; m1= first molar; m2=second molar; mr=molar root; od=odontoblasts; p=pulp; si=stratum intermedium.

Figure 2
297x420mm (300 x 300 DPI)

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

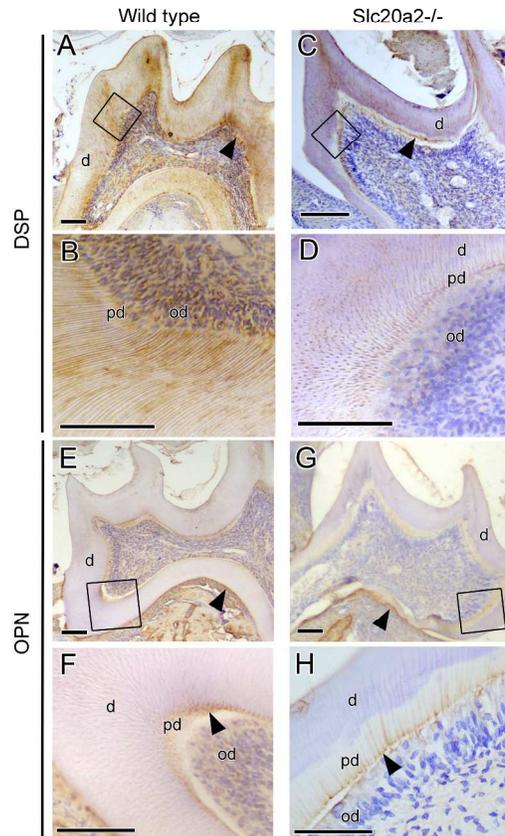
Figure 3. Merametdjian et al.



Slc20a2-deficient mice display an abnormal dentinogenesis. Incisors from 1 month- and 9 month-old wild-type and Slc20a2 KO mice were resin-embedded, cut into 70 μ m-thick slices which were then stained with toluidine blue and red fuchsin. (A-D) An enlarged pre-dentin layer is visible in Slc20a2 KO mice at both age, together with no gross modification of the total thickness of the combined pre-dentin/dentin layer (arrow) as well as the enamel layer. (E-H) At both age, the ameloblast layer of Slc20a2 KO animals did not show significant differences. (I-L) At higher magnification, the examination of the pre-dentin layer of mutant mice revealed the presence of calcospherites (arrowheads). (M-P) No obvious difference could be observed in the cementum layer of mutant Slc20a2 mice when compared to wild-type mice. Bar=25 μ m. am: ameloblasts; d: dentin; e: enamel; od: odontoblasts; pd: pre-dentin.

Figure 3
297x420mm (300 x 300 DPI)

Figure 4. Merametdjian et al.

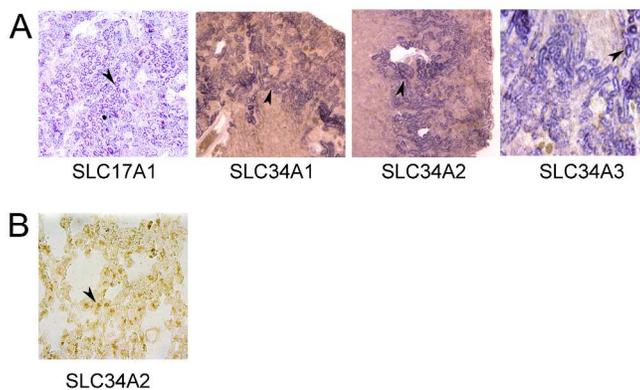


DSP and OPN expression are normal in *Slc20a2*-deficient incisors. Incisors from 1 month-old wild-type and *Slc20a2* KO mice were decalcified and paraffin-embedded before processing to IHC. (A-D) Dentin sialoprotein IHC reveal no obvious difference between wild-type and *Slc20a2*-deficient animals. (E-H) Similarly, osteopontin IHC revealed a normal pattern in odontoblasts and cementoblasts (black arrowheads). Bar=50 μ m. d: dentin; od: odontoblasts; pd: predentin.

Figure 4
297x420mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary figure. Merametdjan et al.



297x420mm (300 x 300 DPI)

Appendix Figure Legend

A. *In situ* hybridization positive controls for Npt1, Npt2a, Npt2b and Npt2c. Kidneys were harvested from 39 day-old C57BL/6J wild-type mice and paraffin embedded prior to *in situ* hybridization processing as described in Material and Methods. Arrows show positive signal in renal cells

B. Immunohistochemistry positive controls for Npt2b. Lungs were harvested from 39 day-old C57BL/6J wild-type mice and paraffin embedded prior to immunohistochemistry processing as described in Material and Methods. Arrow shows positive signal in pulmonary alveolar cells

For Peer Review

2 Implication fonctionnelle des transporteurs de phosphate dans la minéralisation dentaire

2.1 Etude préliminaire *in vitro* de l'invalidation de *Slc20a1* et *Slc20a2* dans des modèles de lignées cellulaires améloblastique (ALC) et odontoblastique (M2H4) murines.

Un des axes d'études de l'éventuelle implication fonctionnelle des transporteurs de phosphate dans la minéralisation dentaire était l'analyse *in vitro* dans des modèles de lignées cellulaires dentaires de l'invalidation des gènes des transporteurs de phosphate précédemment sélectionnés. Les lignées cellulaires M2H4 (lignée odontoblastique de rat) et ALC (lignée améloblastique de souris) ont d'abord été caractérisées et leur capacité à minéraliser évaluée. Les ALC ayant une cinétique de minéralisation lente et non adaptée à des techniques d'interférence ARN, nous avons cherché à optimiser les conditions de culture afin de pouvoir obtenir une minéralisation qui débute à moins d'une semaine. L'étude de l'expression de tous les transporteurs de phosphate (SLC17A1, SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3, SLC20A1 et SLC20A2) dans ces modèles en conditions minéralisante ou non et dans le temps a montré que les deux seuls gènes exprimés étaient SLC20A1 et SLC20A2 (voir paragraphe précédent). Après ajustements du protocole et des outils, le modèle d'étude est mis en place et en cours d'analyse. Mes résultats préliminaires (n=1) ne montrent pas de variation de la minéralisation après invalidation de SLC20A1 ou SLC20A2 *in vitro* dans la lignée améloblastique et dans la lignée odontoblastique.

2.2 Etude *ex vivo* dans un modèle de culture organotypique de germes dentaires murins

Le deuxième axe d'étude de l'implication fonctionnelle des transporteurs de phosphate est l'analyse des modifications des processus de minéralisation (ou non) suite à l'invalidation des gènes précédemment sélectionnés dans un modèle plus proche du *vivo* tout en s'affranchissant des modifications systémiques d'une invalidation d'un gène au sein d'un organisme total. La culture organotypique de germes dentaires murins nous semble être un modèle pertinent et nous l'avons donc mise en place au sein du laboratoire puis nous avons mis en place un protocole d'invalidation des transporteurs de phosphate par ARN interference.

Modèle de culture organotypique

Etant donné la spécificité tissulaire et cellulaire des tissus dentaires mais également

des interactions épithélio-mésenchymateuses desquelles ils sont issus, il m'a semblé intéressant de pouvoir conserver cette architecture en 3D et ces interactions tissulaires et d'y appliquer des techniques d'étude d'expression des gènes utilisées en culture cellulaire. Ce concept semble possible avec la culture organotypique de germes dentaires murins.

Le milieu BGJb semble montrer de meilleurs résultats quant à la minéralisation et à la différenciation cellulaire des germes dentaires en culture, comme décrit précédemment par Lesot *et al.* (données non publiées). Néanmoins, si la dissection des germes dentaires (Figure 34 A) donne de bons résultats à J0 ou à J6 (Figure 34 B), le maintien en culture des germes dentaires sur une plus longue durée montre certains défauts.

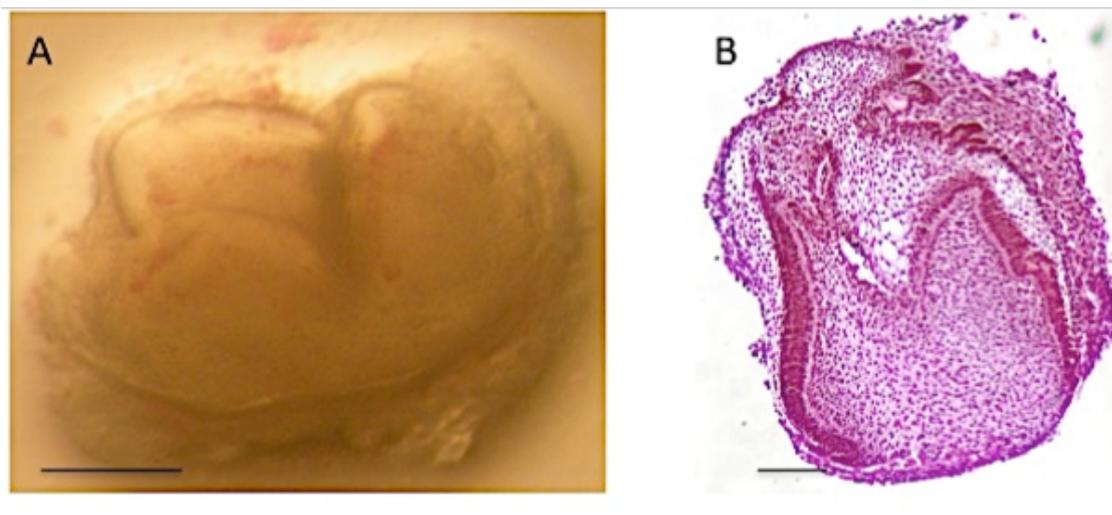


Figure 34. Culture organotypique de germe dentaire. Les germes dentaires sont disséqués à partir d'embryons de souris à E16.5 puis mis en culture. Ils sont ensuite analysés histologiquement sur coupes après une coloration Van Gieson. (A) Extraction d'un germe dentaire de première molaire mandibulaire de souris à E16.5. (B) Germe de 1ère molaire mandibulaire de souris prélevé à E16.5 et cultivé 6 jours sur un milieu semi solide BGJb.

En effet, si le protocole de l'équipe d'Hervé Lesot doit permettre une culture des germes dentaires jusqu'à 15 jours, nous avons été confronté à des anomalies de développement de nos germes dentaires en culture à partir de 10-11 jours : absence de minéralisation amélaire concrète des germes disséqués à E16.5 (Figure 35), prolifération épithéliale excessive et apoptose prématurée des cellules centrales du germe. Dans ces conditions, il paraît judicieux de garder un temps de culture restreint à 10 jours.



Figure 35 : Germe de 1ère molaire mandibulaire de souris prélevé à E16.5 et cultivé 10 jours sur un milieu semi solide BGJb. La dentine apparaît rose, l'émail est absent.

La minéralisation étant retardée en culture d'environ 4 à 5 jours (Lesot *et al.*, données non publiées), nous n'avons pas pu obtenir la mise en place d'une couche d'émail après dissection de germes à E16.5, j'ai donc choisi de réaliser des dissection de germes à P1 afin de pouvoir observer l'initiation de l'amélogénèse. Les résultats étaient semblables à ceux obtenus précédemment (résultats non montrés). Il était donc impossible d'effectuer une analyse complète des effets sur les phénomènes de minéralisation de l'inactivation de SLC34A2, SLC20A1 et SLC20A2 dans des conditions exclusivement *ex vivo*. Une nouvelle analyse de la littérature m'a poussée à me tourner vers la réimplantation des germes dentaires, après dissection puis inactivation par ARN interférence, en sous cutané du dos de souris Nude (le protocole est détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes).

Mes expériences test préliminaires nous ont permis d'observer la pénétration des plasmides GFP au cœur des germes dentaires en culture (Figure 36). L'optimisation de la production des particules lentivirales est en cours au sein de l'équipe et permettra de mettre en place le protocole établi prochainement au laboratoire.

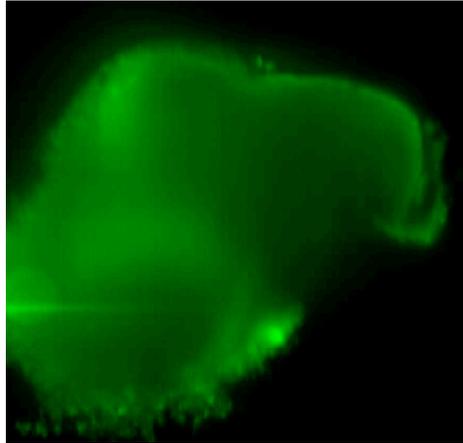


Figure 36. Analyse de la répartition de la fluorescence 3D par microscopie à feuille de lumière sur un germe de première molaire mandibulaire de souris sauvage transduit avec des shSLC34A2 *via* un vecteur lentiviral

Ce modèle permettra de s'affranchir du rôle systémique du Pi pour vérifier le rôle ou non des transporteurs de phosphate SLC34A2, SLC20A1 et SLC20A2 dans les processus de minéralisation et ce manières plus physiologique car ce modèle permet le maintien de la structure tridimensionnelle et des échanges épithélio-mésenchymateux par l'interaction de tous les types cellulaires présents au sein d'un organe dentaire. Ce modèle permettra en fonction des résultats d'invalider plusieurs transporteurs simultanément pour répondre à la question de l'interaction et de la redondance SLC20A1/SLC20A2. Ce modèle permettra également de faire le parallèle ou non avec les résultats de l'étude *in vitro*.

2.3 Analyse de l'invalidation deSLC20A2 *in vivo*

Les souris *Slc20a2*^{-/-} ont été analysées et imagées par différentes techniques : photographie et reconstruction 3D à partir de données microCT, colorations histologiques sur coupes non décalcifiées fines ou épaisses, immunohistochimiques avec des marqueurs de la minéralisation dentinaire DSP et OPN, en microscopie électronique à balayage, microCT et EDX. Certains résultats ont fait l'objet d'une figure dans un article soumis au Journal of Dental Research (voir première partie des résultats) et les autres d'un article à venir décrivant le phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-} et comprenant les résultats de notre équipe et de deux équipes anglaises (Wellcome Trust Sanger Institute – Cambridge et Imperial College – Oxford).



Figure 37 : Photographie et reconstruction 3D à partir de données microCT d'une tête de souris *Slc20a2*^{-/-} âgée de 8 mois et ayant des incisives fracturées.

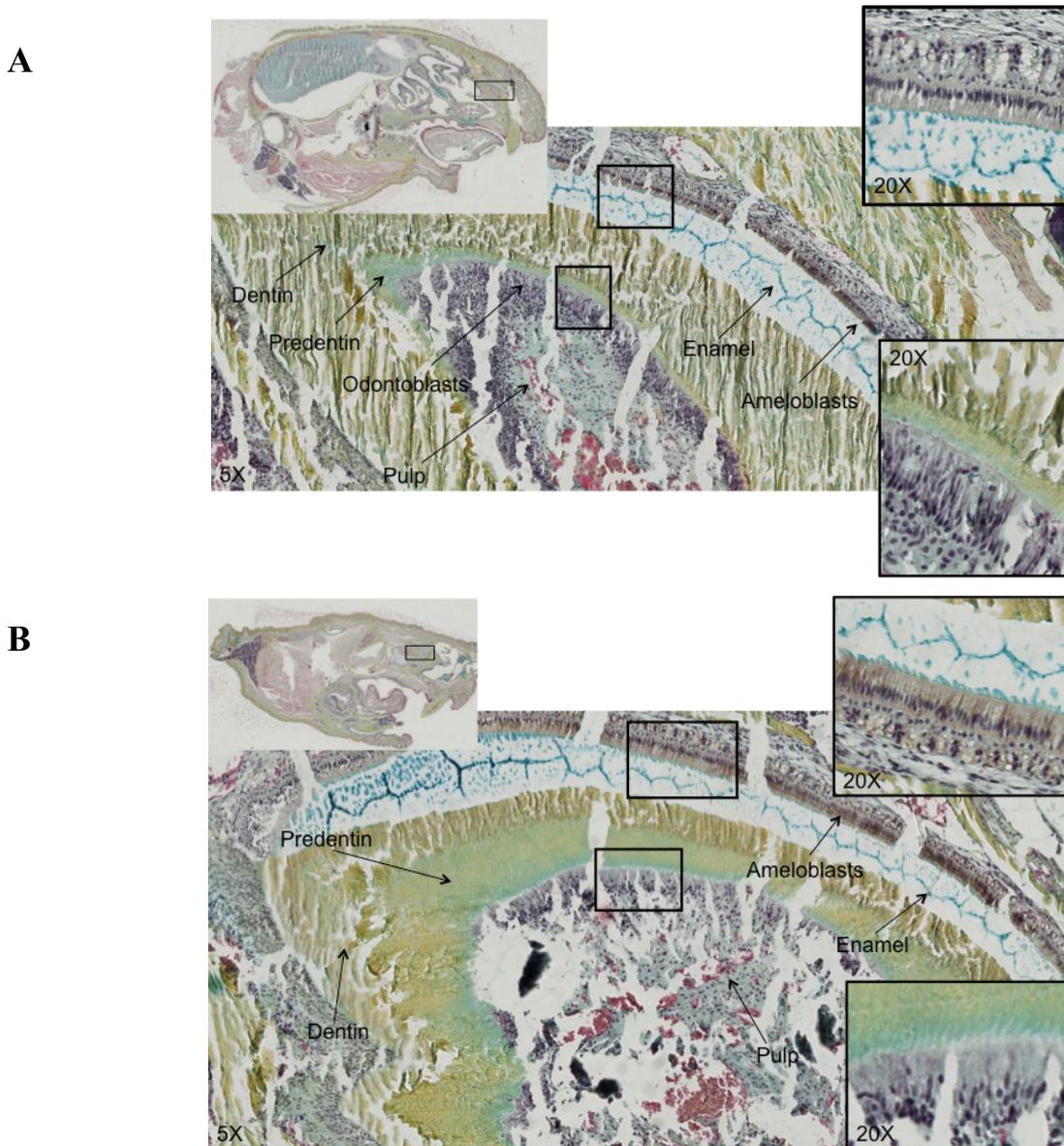


Figure 38 : Analyse histologique par coloration Movat sur coupes fines du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-}

Une coloration Movat sur les incisives maxillaires a été réalisée sur des coupes fines de 5µm obtenues à partir de têtes de souris non décalcifiées sauvage (A) et *Slc20a2*^{-/-}(B) âgées de 8-9 mois. L'émail est coloré en bleu ciel, la dentine minéralisée en vert-jaune, la dentine non minéralisée en vert. On observe une augmentation de l'épaisseur de la prédentine chez les animaux mutants. Aucune modification de l'émail, des couches amélo et odontoblastiques, de la pulpe n'a pu être mise en évidence sur ces coupes.

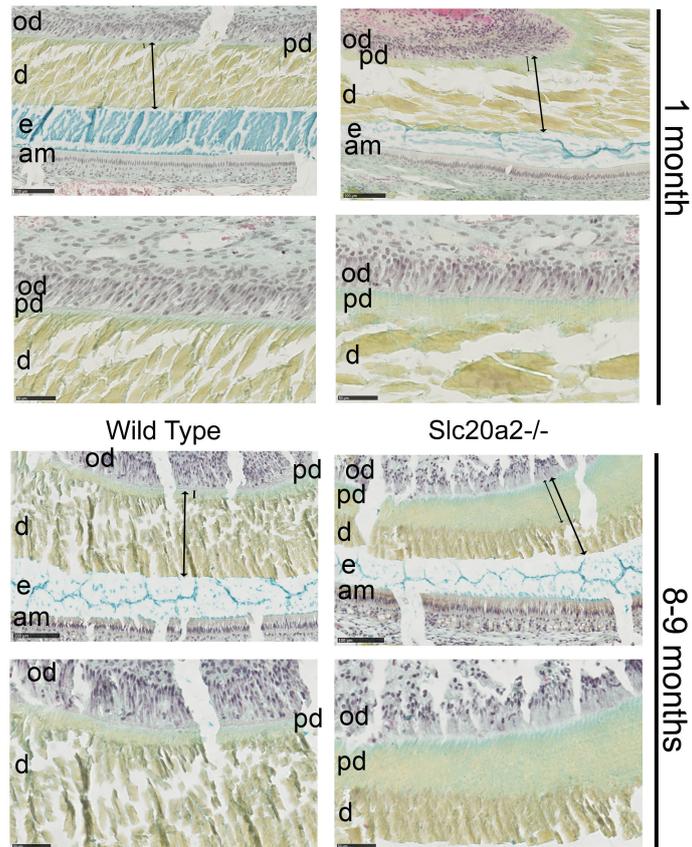


Figure 39 :Analyse histologique par coloration Movat sur coupes fines du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-}

Une coloration Movat sur des incisives maxillaires a été réalisée sur des coupes fines de 5µm obtenues à partir de têtes de souris non décalcifiées sauvage et KO âgées de 1 mois et 8-9 mois. L'émail est coloré en bleu ciel, la dentine minéralisée en vert-jaune, la dentine non minéralisée en vert.

Les flèches montrent la différence du ratio dentine non minéralisée (prédentine)/dentine totale entre les souris sauvages et mutantes. La différence augmente chez les souris les plus âgées (8-9 mois).

am :améloblastes ; *d* : dentine ; *e* : émail ; *od* : odontoblastes ; *pd* : prédentine



Figure 40 : Analyse histologique par coloration Movat sur coupes fines du phénotype des souris *Slc20a2*^{-/-} : tissu inflammatoire en regard de la fracture d'une incisive mandibulaire d'une souris mutante de 8 mois

d : dentine ; *e* : émail ; *p* : pulpe ; *pd* : prédentine

En conclusion de l'analyse histologique sur coupes fines et épaisses des souris *Slc20a2*^{-/-} par rapport aux souris sauvages :

- l'émail est normal (article soumis au Journal of Dental Research et colorations Movat ci dessus)
- la palissade améloblastique est non modifiée (article soumis au Journal of Dental Research et colorations Movat ci dessus)
- le ciment est normal (article soumis au Journal of Dental Research)
- l'épaisseur de prédentine est augmentée et celle de dentine est diminuée (article soumis au Journal of Dental Research et colorations Movat ci dessus)
- présence importante de calcosphérites au front de minéralisation (article soumis au Journal of Dental Research)
- pas de modification pulpaire visible (article soumis au Journal of Dental Research et colorations Movat ci dessus)
- le phénotype dentinaire s'aggrave avec le temps (article soumis au Journal of Dental Research et colorations Movat ci dessus)
- le phénotype est marqué au niveau des incisives et discret au niveau des molaires quel que soit l'âge (résultats non montrés)

- les coupes des incisives fracturées des souris *Slc20a2*^{-/-} (Figure 37) âgées de 8-9 mois présentaient des signes importants d'inflammation au niveau de la pulpe exposée (colorations Movat ci dessus).
- les colorations Von Kossa sur coupes fines ne montraient pas de modifications supplémentaires de la répartition minérale (résultats non montrés).

En conclusion de l'analyse immunohistochimique des souris *Slc20a2*^{-/-} par rapport au sauvage avec les anticorps DSP et OPN :

- pas de modification notable de l'expression de ces deux acteurs clés de la minéralisation dentinaire (article soumis au Journal of Dental Research)
- un marquage comme précédemment décrit au niveau des odontoblastes et de la prédentine, au niveau du ciment et de l'os pour OPN (article soumis au Journal of Dental Research)
- un marquage attendu au niveau des espaces interglobulaires des incisives (article soumis au Journal of Dental Research)

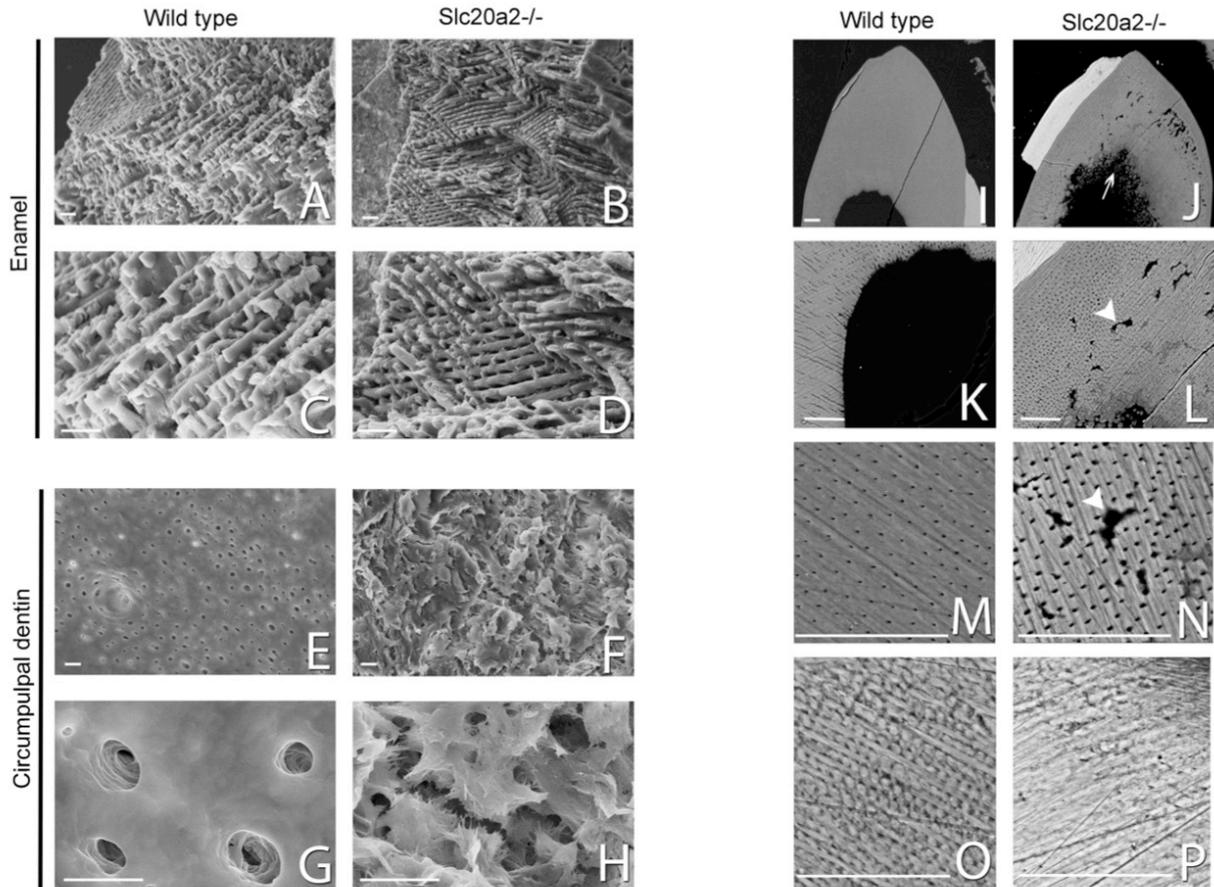


Figure 41 : Analyse des tissus minéralisés des souris *Slc20a2*^{-/-} par microscopie électronique à balayage sur des incisives cryo fracturées de souris âgées de 1 mois sauvage (A, C, E, G) et *Slc20a2*^{-/-} (B, D, F, H) à différents grossissements 1000X (A, B, E, F), 2500X (C, D) et 5000X (G, H), au niveau du front de minéralisation dentinaire (E, F, G, H) et au niveau de l'émail (A, B, C, D). Barre=5µm / Analyse des tissus minéralisés des souris *Slc20a2*^{-/-} par microscopie électronique à balayage sur des coupes d'incisives mandibulaires incluses en résine de souris âgées de 8-9 mois sauvage (I, K, M, O) et *Slc20a2*^{-/-} (J, L, N, P) à différents grossissements 100X (I, J), 250X (K, L) et 1000X au niveau de la dentine (M, N) et de l'émail (O, P). Au niveau de la dentine, on observe de nombreux calcosphérîtes (flèche)(J) et des espaces interglobulaires anormaux (flèche)(L, N) chez les souris *Slc20a2*^{-/-}. Barre=20µm

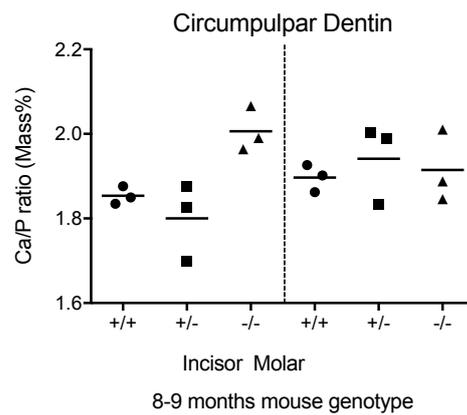
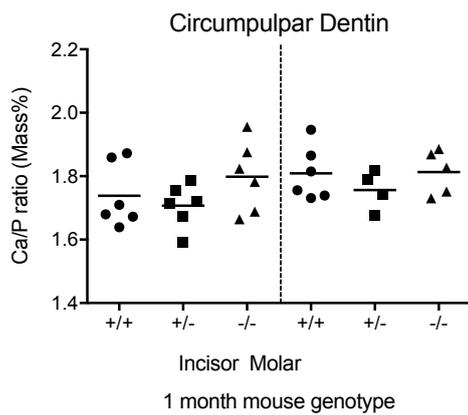
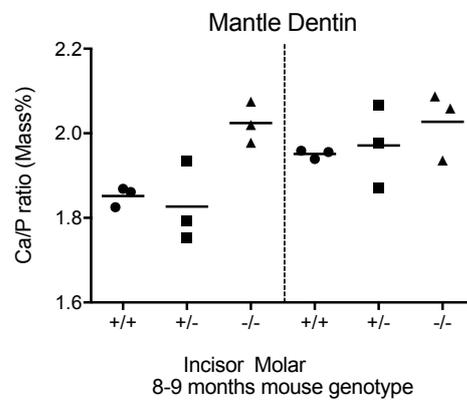
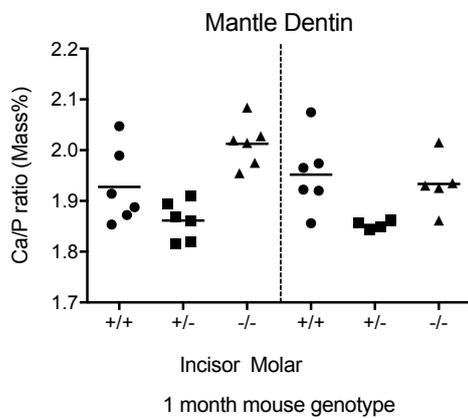
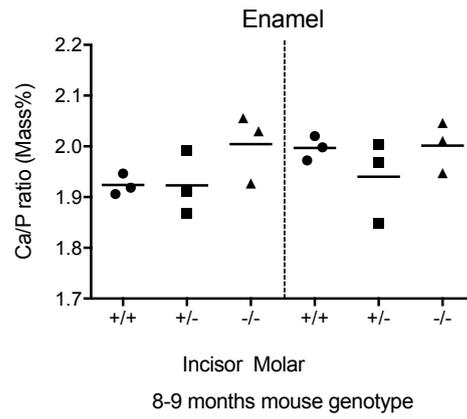
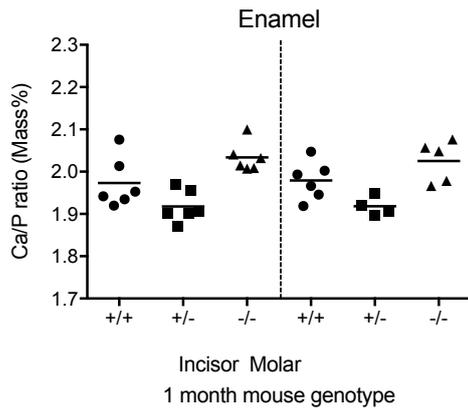
L'analyse par microscopie électronique à balayage montre :

- une absence de modification notable de l'émail (Figure 41. A-D O, P)
- une quantité anormalement importante de calcosphérîtes au front de minéralisation avec un aspect très irrégulier à fort grossissement (Figure 41. E-H I-L)
- de nombreux espaces interglobulaires (Figure 41. J, L, N)

- une absence de modification notable des tubulis dentinaires (longueur, trajectoire, diamètre) en dehors du front de minéralisation (Figure 41. E-H I-L)

L'analyse par microCT (Figure 42) confirme et quantifie les résultats obtenus par histologie à savoir :

- un volume d'émail non significativement modifié
- un volume de dentine minéralisé fortement diminué et ce de manière accentuée à 8-9 mois
- un volume de chambre pulpaire augmenté : ce volume en microCT inclut la prédentine (invisible en microCT car non minéralisée)
- une diminution du volume total des dents, ceci étant à rapporter au fait que les souris SLC20A2 KO sont plus petites que les sauvages quel que soit l'âge.



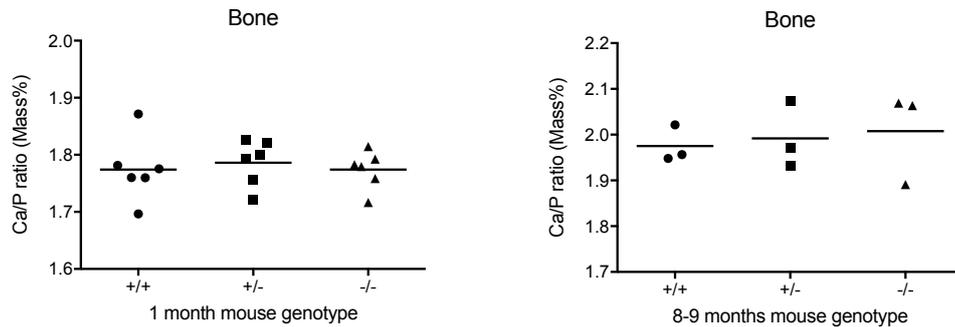


Figure 43 : Analyse du ratio Ca/P par EDX

L'acquisition des données par EDX a été réalisée sur des têtes de souris sauvages, hétérozygotes et *Slc20a2*^{-/-} âgées de 1 mois et 8-9 mois, au niveau de l'émail, du manteau dentinaire et de la dentine circumpulpaire des incisives et des molaires. Chaque point du graphique correspond à la moyenne d'au moins 10 points réalisés en EDX. Les différences qui peuvent être observées sont non significatives.

Les résultats obtenus par EDX (Figure 43) nous montrent des différences non significatives avec des tendances :

- des différences plus marquées au niveau des incisives par rapport aux molaires
- des différences plus marquées chez les souris âgées de 8-9 mois
- une tendance à l'augmentation du rapport Ca/P de la dentine et notamment au niveau du manteau dentinaire des incisives
- pas de modification au niveau de l'os

L'augmentation observée du rapport Ca/P dans le manteau dentinaire des incisives des souris SLC20A2 KO est due à une augmentation du calcium et non à une diminution du phosphate. Ces modifications observées sont inattendues (ces mêmes modifications ont été observées dans l'os long – données non publiées, Sarah Beck-Cormier) et nous ne sommes pas en mesure de leur donner un sens à ce jour.

Nous avons de plus observé des calcifications cérébrales importantes chez les souris SLC20A2KO âgées de 8-9 mois comme décrit précédemment (Figure 44) dans de nombreuses publications chez l'homme et reproduisant les aires cérébrales atteintes dans la maladie de Fahr.

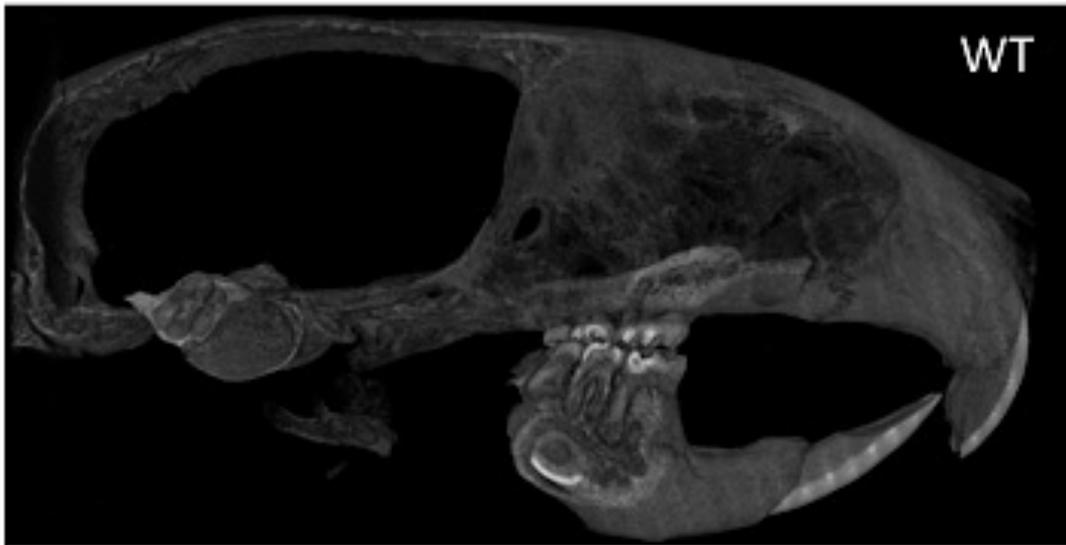


Figure 44 :Reconstructions des têtes de souris sauvage et SLC20A2 KO par microCT objectivant les nombreuses calcifications cérébrales de la souris invalidée pour SLC20A2

De plus, l'équipe du Pr Bloch Zupan (Strasbourg) a recherché des mutations de *SLC20A2* dans des cohortes de patients atteints d'anomalies du développement dentaire. Aucune modification n'a été retrouvée chez ces patients à ce jour.

2.4 Souris DMP1 – SLC20A1 et DMP1-SLC20A2

Les souris DMP1 Cre SLC20A1 ou SLC20A2 ont été étudiées au sein de l'équipe par Nina Bon dans le cadre de son étude du rôle de SLC20A1 et SLC20A2 dans le sensing du phosphate dans l'os. En effet, ces souris sont invalidées spécifiquement dans les ostéocytes, cellules « senseurs » de l'os, mais également dans les odontoblastes. Pendant ma thèse, j'ai souhaité analyser histologiquement des souris DMP1 Cre SLC20A1 et SLC20A2 avant d'obtenir les résultats montrant que ces deux transporteurs n'étaient pas exprimés par les odontoblastes. Ces résultats obtenus (Figure 45) à partir de ces souris étudiées au laboratoire et invalidées spécifiquement dans les odontoblastes permettent néanmoins de confirmer l'absence d'expression odontoblastique de SLC20A1 et SLC20A2. En effet, les souris DMP1 Cre SLC20A1 ou SLC20A2 ne présentent pas de phénotype dentaire modifié en comparaison aux souris sauvages. Nous ne retrouvons pas de retard de minéralisation dentinaire chez les souris invalidées spécifiquement dans les odontoblastes pour SLC20A2 comme pour chez souris KO total pour SLC20A2.

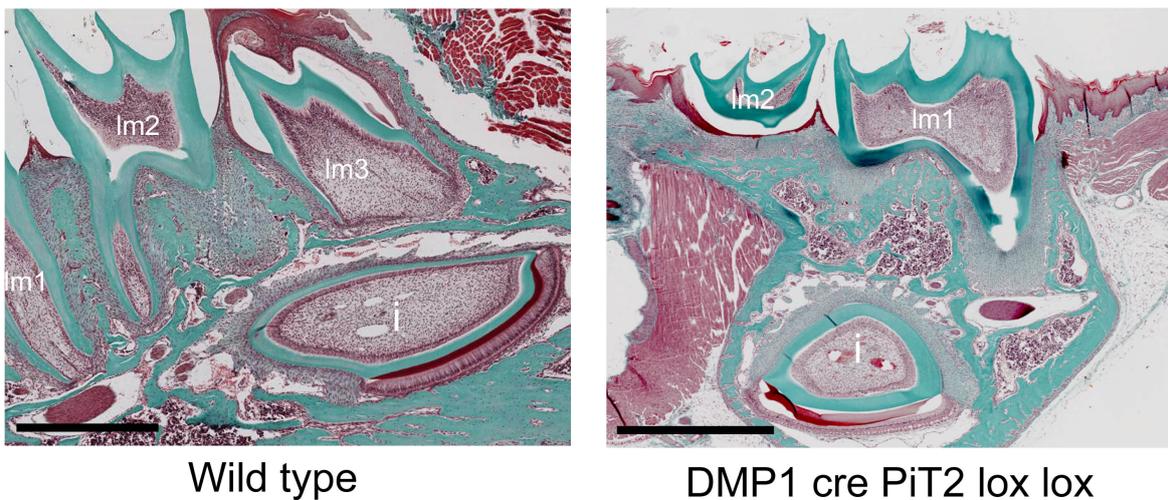


Figure 45 :Analyse histologique par coloration Masson sur coupes paraffine de têtes décalcifiées de souris *Dmp1 cre Slc20a2 loxlox* à 1 mois

Aucune modification des tissus minéralisés dentaires n'a été observé. Les souris *Dmp1 cre SLC20A1 loxlox* présentent des résultats similaires (résultats non montrés).

i : incisive ; *lm1* : molaire mandibulaire 1 ; *lm2* : molaire mandibulaire 2 ; *lm3* : molaire mandibulaire 3

Les résultats sur les souris DMP1 Cre SLC20A1 ou SLC20A2 sont évoqués dans la discussion de l'article soumis au Journal of Dental Research.

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

L'ambition de cette thèse a été, grâce à mes approches expérimentales et mon analyse de la littérature, de tenter d'apporter des réponses quant au rôle des transporteurs de Pi dans la minéralisation dentaire en général. Plus spécifiquement, cette problématique globale peut être divisée en questions plus spécifiques :

1 - Quels sont les transporteurs de phosphate exprimés au cours de l'odontogenèse ? Sont ils identiques chez la souris et chez l'homme ?

Quel est le rôle de ces transporteurs de phosphate dans :

2 - le développement dentaire, c'est à dire dans la mise en place des tissus constituant l'organe dentaire embryologique ?

3 - l'initiation de la minéralisation ?

4 - la croissance cristalline ?

5 - la maturation des tissus minéralisés ?

Mon travail a désormais permis de répondre à la première question : les transporteurs de phosphate majoritairement exprimés au cours de l'odontogénèse sont Slc34a2, Slc20a1 et Slc20a2 chez la souris, auxquels SLC34A3 peut être ajouté chez l'Homme. Cette question est primordiale car l'expression spatio-temporelle est souvent corrélée aux fonctions physiologiques importantes des protéines concernées. Par exemple, Slc34a1, exprimé quasi exclusivement dans les tubules proximaux rénaux responsables de la réabsorption du phosphate, a été identifié comme étant le transporteur de Pi principalement responsable de cette réabsorption (Beck *et al.* 1998). De même, la forte expression de Slc20a1 dans le foie durant le développement embryonnaire a été corrélée à son rôle dans le développement des hépatoblastes et la maturation érythrocytaire (Beck *et al.* 2010, Forand *et al.* 2013). Néanmoins, l'analyse de la littérature concernant l'expression des transporteurs de phosphate dans la dent est parcellaire et incomplète et ne permet pas de formuler des hypothèses consistantes concernant leur rôle au niveau de la dent. Ainsi, l'analyse des cinétiques d'expression a souvent été réalisée sur des intervalles très courts, sauf dans le cas de l'étude de Slc20a2 (Zhao *et al.* 2006), et elles se limitaient le plus souvent à un nombre restreint de transporteurs de phosphate et une seule approche technique, limitant les

possibilités de comparaison et de déduction de fonction physiologique. Ces données de la littérature ont néanmoins servi de comparaison au cours de ces travaux.

Si *Slc17a1* n'a été étudié que dans une seule étude *in vitro* (Tada *et al.* 2011), son absence *in vitro* et *in vivo* par hybridation *in situ* chez la souris a néanmoins pu être confirmé par RT PCR chez la souris et chez l'Homme. Une recherche de l'expression de SLC17A1 dans les banques GEO (Barrett *et al.*, 2011) a pu confirmer ces données expérimentales, et a permis d'émettre l'hypothèse que le rôle physiologique de SLC17A1 dans le développement et la minéralisation dentaire était vraisemblablement négligeable. *Slc34a3* a de même été écarté chez la souris pour des raisons similaires. Néanmoins, l'expression de SLC34A3 dans les germes dentaires humains par RT PCR est non négligeable et il est à noter que ce transporteur présente une expression rénale différente entre Homme et Souris. En effet, au niveau rénal, SLC34A3 est plus exprimé chez l'Homme que chez la souris. De plus, bien que SCL34A3 ait été identifié chez l'homme comme le gène muté chez les patients hypophosphatémique HHRH, les souris *Slc34a3*^{-/-} ne présentent pas de phénotype similaire. Pour des raisons éthiques, nous avons été limités dans l'obtention d'échantillons à des stades de développement dentaire précoces chez l'homme. Néanmoins, il est important de noter qu'aucune étude ne fait état d'anomalies dentaires majeures chez les patients atteints de HHRH. A l'heure actuelle, il apparaît que la contribution de SLC34A3 à la minéralisation dentaire ne soit donc pas majeure.

Une question plus spécifique émanant de ce travail a été de déterminer si les transporteurs de phosphate étaient impliqués dans le développement dentaire, c'est à dire dans la mise en place des tissus constituant l'organe dentaire embryologique. L'analyse de l'expression spatio-temporelle démontre qu'il est très peu probable que cela soit le cas puisque les transporteurs sont très tardivement exprimés par rapport aux étapes de développement connues de la dent. Aucun transporteur ne présente en effet une expression très précoce et les mutations de ces transporteurs chez la souris n'entraînent pas de modifications majeures de l'architecture de la dent ou de la mise en place de l'organe dentaire.

Malgré cette absence très probable de rôle dans le développement dentaire, une autre question centrale a été de savoir si les transporteurs de phosphate étaient nécessaires à l'initiation de la minéralisation de la dent. Leur fonction cellulaire inciterait à penser instinctivement qu'ils pourraient être importants pour cette étape, cependant cette hypothèse semble peu probable. La raison en est de nouveau la cinétique d'expression assez tardive des

transporteurs majoritairement exprimés (Slc34a2, Slc20a1 et Slc20a2) et non concomitante avec les temps d'initiation de la minéralisation. Seul Slc34a1 serait susceptible d'être candidat à cette fonction, compte tenu de son profil d'expression. En effet, une cinétique d'expression de Slc34a1 plus précoce avec un pic d'expression en périnatal a pu être observé chez la souris. Les résultats obtenus pour Slc34a1 étaient cependant négatifs en hybridation *in situ* et présentaient donc une cohérence avec les résultats plus anciens d'Onishi *et al.* (2007) obtenus en PCR sur des germes dentaires murins. Néanmoins, une recherche de l'expression de SLC34A1 dans les banques GEO (Barrett *et al.* 2011) a permis d'identifier une expression significative de SLC34A1 dans les germes dentaires murins en culture, dans le tissu pulpaire humain et dans des tissus gingivaux humains. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Lundquist *et al.* (2002) qui a identifié Slc34a1 en immunohistochimie chez la souris à 10 jours *post partum* au niveau des odontoblastes différenciés matures avec un marquage notamment dans la dentine circumpulpaire mais absent près de la zone cervicale, ainsi qu'au niveau des améloblastes sécréteurs et matures (stage ruffle ended). Cependant, l'anticorps utilisé dans cette étude est un anticorps "maison", et ces données n'ont pas été confirmées par d'autres équipes. De plus, si le phénotype osseux des souris Slc34a1^{-/-} a été décrit (Beck PNAS 1998, Gupta Bone 2001), aucune observation détaillée n'a été rapportée sur le phénotype dentaire, corroborant des observations préliminaires soulignant une absence de phénotype dentaire flagrant (Laurent Beck, non publié). Ainsi, si Slc34a1 est décrit comme le transporteur de phosphate majoritairement responsable de la réabsorption de Pi, son rôle lors de l'initiation de la minéralisation dentaire ne semble pas majeur.

A contrario, si les transporteurs de phosphate que nous avons étudié ne sont pas impliqués dans l'initiation de la minéralisation des tissus minéralisés dentaires *quid* de leur implication dans les vésicules matricielles ? En effet, les vésicules matricielles ont été décrites dans la dentine ou l'os mais pas dans l'émail (Takano *et al.* 2000). De plus, le transporteur de phosphate majoritairement décrit dans ces mécanismes est Slc20a1 (voir chapitre 3.1.1 page 46). Au vu de ces données, nous nous attendions par extension à une expression odontoblastique de Slc20a1. Néanmoins, si Slc20a1 est visible localement au niveau pulpaire, aucune expression de Slc20a1 au niveau de la couche odontoblastique n'a été observée et les rats surexprimants Slc20a1 ne présentaient aucune anomalie de la dentine. Par ailleurs, même si nous avons avancé Slc20a2 comme transporteur de phosphate plausible au sein des vésicules matricielles (voir chapitre 3.1.1 page 46) et que les souris Slc20a2^{-/-} présentent un phénotype dentinaire marqué, cette hypothèse ne me semble également pas valable au sein de

la dentine puisque Slc20a2 n'est pas exprimé dans les odontoblastes mais dans les cellules de Hoehl et que son expression est majoritairement postérieure aux phases d'initiation de la minéralisation dentinaire médiées par les vésicules matricielles.

Si aucun transporteur de phosphate ne semble impliqué dans l'initiation de la minéralisation, ils sont susceptibles d'être impliqués dans la croissance cristalline ou dans la maturation des tissus minéralisés. Les cinétiques d'expression dans les germes dentaires sont effectivement bien plus favorables à cette hypothèse en terme temporel, que cette implication soit directe ou indirecte. Ainsi, les études sur l'incorporation du phosphate au sein de l'émail au cours de l'odontogenèse et de la minéralisation dentaire (Robinson *et al.* 1974, Wennberg et Bawden 1978, McKee *et al.* 1989) montrent que la phase de maturation de l'émail est concomitante avec une augmentation de l'incorporation de phosphate. Il n'est donc pas déraisonnable de penser que cette phase implique un transport de phosphate plus important. Les candidats les plus probables semblent être SLC34A2, SLC20A1 et SLC20A2 d'après leur cinétique d'expression post-natale. Ils présentent en effet une expression tardive en RT PCR correspondant relativement bien à la cinétique des phénomènes de maturation amélaire. Cependant, SLC34A2 et SLC20A1 sont exprimés dans les améloblastes lors de la phase de maturation alors que SLC20A2 n'est pas exprimé dans les cellules responsables des phénomènes de maturation. Ces données d'expression concernant SLC34A2 et SLC20A1 sont concordantes avec les données de la littérature (Lundquist *et al.* 2002, Onishi *et al.* 2007, Yoshioka *et al.* 2011). Les hybridations *in situ* d'Onishi *et al.* (2007) montrent chez la souris sauvage une expression forte de SLC34A2 à 2-6-10 jours *post partum* au niveau du germe dentaire, avec un signal localisé dans les améloblastes sécréteurs et matures. Les résultats par immunohistochimie de Lundquist *et al.* obtenus pour Slc34a2 montrent une répartition spatio-temporelle chez la souris à 10 jours *post partum* au niveau des améloblastes sécréteurs et matures (stade ruffle ended). Or, les améloblastes au stade « ruffle ended » sont décrits comme contrôlant les flux de calcium et d'autres ions comme le bicarbonate afin de maintenir au sein de l'émail une capacité tampon et de conduire la croissance cristalline en surface (Smith 1998). De plus, Lacruz *et al.* (2012) ont montré une expression 64 fois plus importante de Slc34a2 dans les améloblastes en phase de maturation par rapport aux améloblastes d'incisives de rats adultes en phase de sécrétion. L'autre transporteur exprimé dans les améloblastes est Slc20a1. Nous avons en effet visualisé une expression importante de Slc20a1 dans les améloblastes matures et plus faible dans les améloblastes pré-sécréteurs et sécréteurs à des stades tardifs du développement dentaire mais aucune expression dans les odontoblastes

en hybridation *in situ* et en RT PCR, et ce quel que soit le stade. Ces résultats concordent avec l'étude de Yoshioka *et al.* (2011) portant sur l'utilisation de rats transgéniques surexprimants Slc20a1. Les rats mutants présentaient des anomalies dentaires observées sur les incisives notamment au moment de l'amélogénèse (hypoplasies et retard de minéralisation amélaire) conduisant à deux hypothèses causales : allongement de la phase sécrétoire des améloblastes et/ou délai de mise en route des améloblastes matures fonctionnels. Cette seconde hypothèse paraît nettement plus probable. Des anomalies de la fixation ferrique sur l'émail avec une baisse de la résistance à l'attrition de l'émail ont aussi été visualisées dans cette étude. Les hybridations *in situ* montrent dans cette étude une expression de Slc20a1 dans les odontoblastes, dans la papille dentaire ou pulpe, dans certains améloblastes sécréteurs et dans les améloblastes matures. Les améloblastes surexprimants Slc20a1 semblent avoir subi des anomalies de différenciation au cours de leur maturation, avec notamment des pertes de leur polarité, probablement en lien avec l'améloblastine - une molécule connue pour permettre le maintien de la polarité et de la différenciation des améloblastes (Fukumoto *et al.* 2004 et 2005). En résumé, les résultats de Yoshioka *et al.* chez le rat montrent que Slc20a1 est impliqué dans la minéralisation dentaire, directement ou indirectement, mais de façon tardive. Ainsi, l'ensemble de ces résultats est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle Slc34a2 et Slc20a1 sont des transporteurs de phosphate impliqués dans la maturation amélaire. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, en évitant la létalité embryonnaire des KO Slc20a1 et Slc34a2, il pourrait être envisagé d'étudier dans un second temps les répercussions d'une invalidation amélo-spécifique *via* des souris transgéniques K14 ; Slc20a1^{lox/lox} et K14-Cre ; Slc34a2^{lox/lox}. La lignée de souris K14Cre (Vasioukhin *et al.* 1999) a déjà été utilisée dans des études concernant les améloblastes (Xu *et al.* 2007) ; en effet, la cytokératine 14 (K14) est exprimée dans les cellules en division de l'épiderme et dans d'autres épithelia squameux stratifiés (épiderme, langue, œsophage). Une approche alternative serait d'utiliser notre modèle expérimental avec les germes dentaires invalidés et réimplantés en sous cutané mis en place lors de cette thèse et qui permettrait de déterminer si des modifications de minéralisation existent en l'absence de ces transporteurs. L'analyse phénotypique de ces germes invalidés *ex vivo* pourrait également fournir des indications sur le type de processus éventuellement engagé et peut-être nous orienter vers une implication de Slc20a1 et Slc34a2 vers dans la croissance cristalline, la maturation de l'émail ou d'autres hypothèses non encore envisagées. Les transporteurs de phosphate sus cités me semblent tout à fait susceptibles d'être impliqués dans la croissance cristalline ou dans la maturation des tissus minéralisés, de façon directe ou indirecte. Mais cette implication dans un mécanisme physiologique pourrait

elle présenter son pendant pathologique en cas de mutation ou d'inhibition des processus impliquant les transporteurs de phosphate ?

Les transporteurs de Pi que nous avons étudié pourraient-ils donc être impliqués dans des phénomènes de minéralisation pulpaire pathologique ? En effet, il est possible de relier l'expression de ces transporteurs de phosphate aux phénomènes de minéralisation pathologique dans les tissus mous comme la pulpe. En effet, ces phénomènes de minéralisation pathologique peuvent être liés à une levée de l'inhibition de la minéralisation (liées à une perte des inhibiteurs comme MGP ou OPN) dans certaines conditions comme l'inflammation et les études sur les calcifications vasculaires nous permettent d'établir un parallèle intéressant (Wu *et al.* 2013). Plusieurs candidats existent dans les protéines étudiées lors de cette thèse : SLC34A2, SLC20A1, SLC20A2 et XPR1. SLC34A2 est impliqué dans des phénomènes de minéralisation pathologique dans les tissus mous (microlithiases pulmonaires alvéolaires et testiculaires (Corut *et al.* 2006)). SLC20A1 et SLC20A2 ont été mis en évidence dans les phénomènes de calcifications vasculaires (Crouthamel *et al.* 2013). De plus, une mutation de SLC20A2 a récemment été impliquée dans la maladie de Fahr, une maladie neurodégénérative avec des calcifications cérébrales (IBGC) situées dans plusieurs zones du cerveau dont le ganglion de base et le noyau dentelé (Hsu *et al.* 2013). La maladie de Fahr est de façon intéressante, également provoquée par une mutation de XPR1 (Legati *et al.* 2015). Dans la maladie de Fahr, il a été montré que les dépôts de Ca/P sont préférentiellement situés au niveau des parois des artérioles et veinules (Wallingford *et al.* 2016). Or, les pulpolithes ont été décrits comme étant fréquemment localisés à proximité du réseau vasculaire pulpaire (Bernick et Nedelman, 1975 ; Bernick *et al.*, 1967a ; Bernick *et al.* ; 1967b). Cette observation permet donc d'envisager des hypothèses intéressantes quant au rôle de SLC20A2 présent dans des zones proches d'un réseau vasculaire terminal (stratum intermedium, couche subodontoblastique des cellules de Hoehl, pulpe). Nos travaux ont permis de prouver que XPR1 était fortement exprimé dans les germes dentaires murins. XPR1 est d'ailleurs le transporteur de phosphate le plus exprimé juste après SLC20A2, quelque soit le temps, signalant donc une importance fonctionnelle similaire. Nous avons en effet émis l'hypothèse d'un binôme Slc20a2/Xpr1 aux deux pôles cellulaires permettant le flux transcellulaire de Pi. Il est à noter, que c'est la première fois qu'un exportateur de phosphate est étudié dans la biominéralisation dentaire. Nos travaux montrent également que XPR1 présente un profil d'expression similaire à Slc20a2 de E14,5 à P15 dans des germes dentaires murins. Ainsi, on pourrait supposer que SLC20A2 soit nécessaire au transport de phosphate

au travers des parois vasculaires ce qui entraînerait en son absence une accumulation de phosphate au sein du réseau vasculaire, générant à la fois des calcifications vasculaires et un défaut de disponibilité de l'ion phosphate pour les cellules minéralisantes. Les défauts de minéralisation dentaires seraient donc équivalents à ceux observés lors d'une hypophosphatémie conduisant elle aussi à un défaut de disponibilité de l'ion phosphate. Et c'est effectivement ce qui est observé, puisque les souris hypophosphatémiques *Phex*^{-/-} et *Dspp*^{-/-} les souris normophosphatémiques *Slc20a2* KO (Jensen *et al.* 2016) ont un phénotype dentaire très similaire. Cependant, cette hypothèse, même si elle est tentante, ne permet pas de tout expliquer. En effet, selon cette hypothèse simplifiée, les défauts de minéralisation amélaire devraient être aussi importants que les défauts dentinaires. Nos travaux n'ont pas permis d'observer de modifications majeures amélaire chez les souris mutantes. Dans le même ordre d'idée, des calcifications pulpaires massives auraient logiquement dû être observées dans la pulpe des souris *Slc20a2*^{-/-}, ce qui n'a pas été le cas au sein des incisives des souris à 8-9 mois, notamment chez celles qui présentaient les calcifications cérébrales les plus visibles (une unique première molaire mandibulaire présentait ce genre d'anomalies). Ainsi, ces contradictions apparentes ne sont pas explicables par une hypothèse simplifiée sur le rôle de *Slc20a2* en tant que transporteur de Pi.

La difficulté à positionner *Slc20a2* comme le transporteur de phosphate nécessaire et suffisant aux flux importants de phosphate nécessaires à la biominéralisation nous amène à envisager une fonction autre que celle de pur transporteur. En effet, *Slc20a2* est un transporteur de phosphate de faible capacité, non compatible avec ce type de fonction. De plus, *Slc20a2* ne peut raisonnablement pas être considéré comme LE transporteur de phosphate responsable du transfert de ces quantités de phosphate du réseau vasculaire vers les sites de minéralisation étant donné son expression. En effet si l'expression correspond en termes spatiaux, elle ne correspond pas en termes temporels. Les résultats obtenus en qPCR et sur les souris *Slc20a2* KO montrent une expression spatio temporelle de *Slc20a2* située, d'après le modèle murin, au niveau du *stratum intermedium*, de la couche subodontoblastique et de la pulpe mais dans aucune cellule minéralisante et cette expression est tardive par rapport aux phénomènes de minéralisation en général. Ces éléments rejoignent les conclusions de l'étude de Zhao *et al.* (2006). Son expression est importante dans des zones hautement vascularisées mais pas dans les zones spécifiquement minéralisantes dentaires : *stratum intermedium* puis papille dentaire, reticulum stellaire et cellules de la couche subodontoblastique. Paradoxalement, les souris *Slc20a2* KO présentent un phénotype dentaire

marqué justement en lien avec la minéralisation. Mis à part l'absence de modifications locales de deux acteurs clés de la minéralisation dentaire (DSP et OPN), ce phénotype se rapproche de celui d'une dentinogénèse imparfaite comme celle causée par la mutation de DSPP (Zhang *et al.* 2001) ou d'une dyplasie dentinaire comme celle associée au rachitisme hypophosphatémique lié à l'X (mutation du gène Phex) (Gaucher *et al.* 2009). Cette absence de modification de protéines marqueurs de la minéralisation dentinaire conjuguée à l'ontogénèse de SLC20A2 dans les tissus dentaires (expression forte mais plutôt tardive, et dans des cellules non minéralisantes), permet de conforter l'hypothèse que Slc20a2 pourrait avoir une fonction essentielle aux processus de minéralisation dentaire mais médiée par une autre fonction que celle du transport de phosphate. Cette fonction envisagée pourrait être ici en lien avec le sensing de phosphate décrite par Salaun *et al.* 2002, 2004 dans d'autres modèles que la dent (chapitre 4.2.1.4 page 74) où Slc20a2 agit comme un récepteur captant les variations du phosphate extracellulaire et médiant des cascades de signalisation adaptées.

De manière similaire, l'expression amélaire majoritaire de Slc20a1 et Slc34a2 pourrait laisser penser que leur fonction de transport est importante. Cependant, au vu des quantités importantes de phosphate nécessaires à la minéralisation amélaire et de la faible capacité de transport de phosphate de ces protéines (Bindels *et al.* 1987, Quamme 1990), cette fonction semble peu probable notamment en ce qui concerne Slc20a1. Il semble plus raisonnable de postuler que des transporteurs à haute capacité et basse affinité soient impliqués dans ces phénomènes de transport massif d'ions phosphate. De tels transporteurs ont été décrits dans le rein (Barac-Nieto *et al.* 2001) mais non identifiés au niveau moléculaire, et il n'est pas déraisonnable de penser qu'ils puissent exister aussi dans le tissu dentaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion de ces travaux de thèse et en réponse à la question intitulée, j'ai pu identifier les transporteurs de phosphate impliqués lors de la minéralisation dentaire (soit Slc34a2, Slc20a1, Slc20a2 et Xpr1). J'ai également pu émettre l'hypothèse qu'ils n'étaient pas impliqués dans le développement dentaire *stricto sensu*. Si Slc34a2, Slc20a1, Slc20a2 et Xpr1 ne sont probablement pas impliqués dans l'initiation des phénomènes de minéralisation dentaire, des investigations ultérieures restent nécessaires pour Slc34a1 (une des suites de ces travaux consisterait à invalider Slc34a1 dans les germes dentaires par interférence ARN selon le modèle que j'ai mis en place, ce qui permettrait de déterminer si la faible expression en RT-PCR est néanmoins significative en termes d'implication fonctionnelle dans la minéralisation dentaire). En revanche, les données de la littérature et celles obtenues lors de cette thèse sont favorables à l'idée que Slc34a2 et Slc20a1 soient impliqués dans la maturation amélaire. Slc34a2, Slc20a1, Slc20a2 et Xpr1 pourraient également être impliqués dans des phénomènes de minéralisation pathologique. Les expérimentations futures d'invalidation *in vitro* et *ex vivo* permettront de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses. Au cours de cette discussion, est apparue la possibilité que ces protéines puissent être impliquées dans la minéralisation dentaire par l'intermédiaire de rôles différents que le transport de phosphate.

En ce qui concerne Slc34a2, Slc20a1 et Slc20a2, malgré les phénotypes des mutants pour Slc20a1 et Slc20a2, il est très probable que ces protéines ne soient pas impliquées dans la minéralisation dentaire en tant que purs transporteurs de phosphate. Un examen approfondi de la littérature permet de conforter ce point de vue. Les hypothèses de fonctions à considérer seraient, indépendamment du transport de phosphate, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Beck *et al.* 2009, Byskov *et al.* 2012, Salaun *et al.* 2010). Ces deux dernières fonctions pourraient peut-être avoir un lien à la fois avec le développement et des phénomènes de tumorigénèse. En effet, les preuves convergent indiquant que les gènes ayant des rôles critiques durant l'embryogénèse étaient aussi exprimés lors du développement des cancers, en particulier les gènes ayant été associés avec la déprogrammation cellulaire et le maintien d'un état indifférencié des cellules (Monk et Holding 2001, Dreesen et Brivanlou 2007). Or, les KO Slc20a1 et Slc34a2 sont létaux à l'état embryonnaire et les gènes concernés ont été reliés récemment à des processus tumoraux (Salaun *et al.* 2010, Heider *et al.* 2014, Wang *et al.* 2015, Ge *et al.* 2016).

L'autre hypothèse de fonction à considérer seraient, indépendamment du transport de phosphate, la détection du phosphate (phosphate sensing) (Khoshniat *et al.* 2011). En effet,

de nombreuses études *in vitro* décrivent Slc20a1 et Slc20a2 ayant la capacité à activer des voies de signalisation en réponse à la variation de phosphate extracellulaire, indépendamment de leur fonction de transport. Ils ont été identifiés en ce sens comme des récepteurs et non des transporteurs. La pertinence dans un tissu minéralisé de protéines revêtant une telle fonction de réponse au phosphate est non négligeable. Le sensing du phosphate, outre son transport, est un mécanisme à considérer sérieusement dans les mécanismes de minéralisation dentaire mais des expériences complémentaires sont nécessaires.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Albano G, Moor M, Dolder S, Siegrist M, Wagner CA, Biber J, Hernando N, Hofstetter W, Bonny O, Fuster DG. Sodium-dependent phosphate transporters in osteoclast differentiation and function. *PLoS One*. 2015 Apr 24;10(4):e0125104.

Aldred MJ, Crawford PJ, Roberts E, Thomas NS. Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Genet*. 1992 Dec;90(4):413-6.

Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*. 2006 Apr;13(7):611-20.

Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol*. 1969 Apr;41(1):59-72.

Anderson HC, Sipe JB, Hesse L, Dhanyamraju R, Atti E, Camacho NP, Millán JL, Dhanyamraju R. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol*. 2004 Mar;164(3):841-7.

Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci*. 2005 Jan 1;10:822-37.

Aparicio C et Maria Pau Ginebra MP. *Biomineralization and Biomaterials*, 1st Edition Woodhead Publishing. 482 pages. ISBN9781782423386

Arends J, Jongebloed WL. Ultrastructural studies of synthetic apatite crystals. *J Dent Res*. 1979 Mar;58(Spec Issue B):837-43.

Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000*. 2015 Feb;67(1):211-33.

Avery JK, Chiego Jr, Steele PF. *Essentials of Oral Histology and Embryology: A Clinical Approach*. Mosby 2nd Edition. 224 pages. ISBN-13: 978-0323004602

Bailleul-Forestier I, Molla M, Verloes A, Berdal A. The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 1: clinical and molecular aspects of non-syndromic dental disorders.

Baldassarri M, Margolis HC, Beniash E. Compositional determinants of mechanical properties of enamel. *J Dent Res.* 2008 Jul;87(7):645-9. *Eur J Med Genet.* 2008 Jul-Aug;51(4):273-91.

Barac-Nieto M, Alfred M, Spitzer A. Basolateral phosphate transport in renal proximal-tubule-like OK cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002 Sep;227(8):626-31.

Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D991-5.

Barros NM, Hoac B, Neves RL, Addison WN, Assis DM, Murshed M, Carmona AK, McKee MD. Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in Hyp mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res.* 2013 Mar;28(3):688-99.

Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, Wen X, White SN, Zhou YL. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol.* 2006;74:57-115.

Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS. Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 28;95(9):5372-7.

Beck L, Leroy C, Salaün C, Margall-Ducos G, Desdouets C, Friedlander G. Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity. *J Biol Chem.* 2009 Nov 6;284(45):31363-74.

Beck L, Leroy C, Beck-Cormier S, Forand A, Salaün C, Paris N, Bernier A, Ureña-Torres P, Prié D, Ollero M, Coulombel L, Friedlander G. The phosphate transporter PiT1 (Slc20a1) revealed as a new essential gene for mouse liver development. *PLoS One*. 2010 Feb 10;5(2):e9148.

Bei M. Molecular genetics of ameloblast cell lineage. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2009 Jul 15;312B(5):437-44.

Beniash E, Simmer JP, Margolis HC. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J Struct Biol*. 2005 Feb;149(2):182-90.

Beniash E. Biomaterials--hierarchical nanocomposites: the example of bone. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011 Jan-Feb;3(1):47-69.

Beniash E, Deshpande AS, Fang PA, Lieb NS, Zhang X, Sfeir CS. Possible role of DMP1 in dentin mineralization. *J Struct Biol*. 2011 Apr;174(1):100-6.

Berès F, Isaac J, Mouton L, Rouzière S, Berdal A, Simon S, Dessombz A. Comparative Physicochemical Analysis of Pulp Stone and Dentin. *J Endod*. 2016 Mar;42(3):432-8.

Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loredó-Ostí JC, Bastepe M, Abu-Zahra H, Frappier D, Burkett K, Carpenter TO, Anderson D, Garabedian M, Sermet I, Fujiwara TM, Morgan K, Tenenhouse HS, Juppner H. SLC34A3 mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter NaPi-IIc in maintaining phosphate homeostasis. *Am J Hum Genet*. 2006 Feb;78(2):179-92.

Bernick S. Age changes in the blood supply to human teeth. *J Dent Res*. 1967 May-Jun;46(3):544-50.

Bernick S. Effect of aging on the nerve supply to human teeth. *J Dent Res*. 1967 Jul-Aug;46(4):694-9.

Bernick S et Nedelman C. Effect of aging on the human pulp. *J Endod*. 1975 Mar;1(3):88-94.

Bevelander G et Johnson PL. Histogenesis and histochemistry of pulpal calcification. *J Dent Res.* 1956 Oct;35(5):714-22.

Biber J, Caderas G, Stange G, Werner A, Murer H. Effect of low-phosphate diet on sodium/phosphate cotransport mRNA and protein content and on oocyte expression of phosphate transport. *Pediatr Nephrol.* 1993 Dec;7(6):823-6.

Biber J, Hernando N, Forster I. Phosphate transporters and their function. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:535-50.

Bindels, R.J., L.A. van den Broek, C.H. van Os. Effect of pH on the kinetics of Na⁺-dependent phosphate transport in rat renal brush-border membranes. *Biochim Biophys Acta,* 1987. 897(1): p. 83-92.

Bonar LC, Shimizu M, Roberts JE, Griffin RG, Glimcher MJ. Structural and composition studies on the mineral of newly formed dental enamel: a chemical, x-ray diffraction, and ³¹P and proton nuclear magnetic resonance study. *J Bone Miner Res.* 1991 Nov;6(11):1167-76.

Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, Stevens MM. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Aug 28;109(35):14170-5.

Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res.* 2005 May;84(5):390-406.

Bourgine A, Pilet P, Diouani S, Sourice S, Lesoeur J, Beck-Cormier S, Khoshniat S, Weiss P, Friedlander G, Guicheux J, Beck L. Mice with hypomorphic expression of the sodium-phosphate cotransporter PiT1/Slc20a1 have an unexpected normal bone mineralization. *PLoS One.* 2013 Jun 13;8(6):e65979.

Bourgine A, Beck L, Khoshniat S, Wauquier F, Oliver L, Hue E, Alliot-Licht B, Weiss P, Guicheux J, Wittrant Y. Inorganic phosphate stimulates apoptosis in murine MO6-G3 odontoblast-like cells. *Arch Oral Biol.* 2011 Oct;56(10):977-83.

- Bouropoulos N, Moradian-Oldak J. Induction of apatite by the cooperative effect of amelogenin and the 32-kDa enamelin. *J Dent Res.* 2004;83(4):278–82.
- Boskey A. Bone mineral crystal size. *Osteoporos Int.* 2003 Sep;14 Suppl 5:S16-20; discussion S20-1.
- Boyde A. Enamel structure and cavity margins. *Oper Dent.* 1976 Winter;1(1):13-28.
- Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Methods Mol Biol.* 2013;1053:27-51.
- Cam Y, Neumann MR, Ruch JV. Immunolocalization of transforming growth factor beta 1 and epidermal growth factor receptor epitopes in mouse incisors and molars with a demonstration of in vitro production of transforming activity. *Arch Oral Biol.* 1990;35(10):813-22.
- Candéal E, Caldas YA, Guillén N, Levi M, Sorribas V. Na⁺-independent phosphate transport in Caco2BBE cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014 Dec 15;307(12):C1113-22.
- Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20; 277(51):49598-604.
- Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development.* 2000 Apr;127(8):1671-9.
- Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development.* 1996 Oct;122(10):3035-44.
- Chiba T, Matsuo H, Kawamura Y, Nagamori S, Nishiyama T, Wei L, Nakayama A, Nakamura T, Sakiyama M, Takada T, Taketani Y, Suma S, Naito M, Oda T, Kumagai H, Moriyama Y, Ichida K, Shimizu T, Kanai Y, Shinomiya N. NPT1/SLC17A1 is a renal urate

exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Jan;67(1):281-7.

Cho SW, Hwang HJ, Kim JY, Song WC, Song SJ, Yamamoto H, Jung HS. Lineage of non-cranial neural crest cell in the dental mesenchyme: using a lacZ reporter gene during early tooth development. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2003;52(6):567-71.

Cho ES, Kim KJ, Lee KE, Lee EJ, Yun CY, Lee MJ, Shin TJ, Hyun HK, Kim YJ, Lee SH, Jung HS, Lee ZH, Kim JW. Alteration of conserved alternative splicing in AMELX causes enamel defects. *J Dent Res.* 2014 Oct;93(10):980-7.

Chong SS, Kristjansson K, Zoghbi HY, Hughes MR. Molecular cloning of the cDNA encoding a human renal sodium phosphate transport protein and its assignment to chromosome 6p21.3-p23. *Genomics.* 1993 Nov;18(2):355-9.

Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV. Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int J Dev Biol.* 1999 May;43(3):261-7.

Corut A, Senyigit A, Ugur SA, Altin S, Ozcelik U, Calisir H, Yildirim Z, Gocmen A, Tolun A. Mutations in SLC34A2 cause pulmonary alveolar microlithiasis and are possibly associated with testicular microlithiasis. *Am J Hum Genet.* 2006 Oct;79(4):650-6.

Couve E et Schmachtenberg O. Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *J Dent Res.* 2011 Apr;90(4):523-8.

Crouthamel MH, Lau WL, Leaf EM, Chavkin NW, Wallingford MC, Peterson DF, Li X, Liu Y, Chin MT, Levi M, Giachelli CM. Sodium-dependent phosphate cotransporters and phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells: redundant roles for PiT-1 and PiT-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Nov;33(11):2625-32.

Cui Y1 Luan J1 Li H1 Zhou X1 Han J. Exosomes derived from mineralizing osteoblasts promote ST2 cell osteogenic differentiation by alteration of microRNA expression. *FEBS Lett.* 2016 Jan;590(1):185-92.

Davidovich E, Davidovits M, Eidelman E, Schwarz Z, Bimstein E. Pathophysiology, therapy, and oral implications of renal failure in children and adolescents: an update. *Pediatr Dent*. 2005 Mar-Apr;27(2):98-106.

De Coster PS, Cornelissen M, De Paepe A, Martens LC, Vral A. Abnormal dentin structure in two novel gene mutations [COL1A1, Arg134Cys] and [ADAMTS2, Trp795-to-ter] causing rare type I collagen disorders. *Arch Oral Biol* 2007;52:101–109.

Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001 Sep;45(5-6):695-706.

Dreesen O, Brivanlou AH. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. *Stem Cell Rev*. 2007 Jan; 3(1):7-17.

Eanes ED. Enamel apatite: chemistry, structure and properties. *J Dent Res*. 1979 Mar;58(Spec Issue B):829-36.

Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:230251.

Feild JA, Zhang L, Brun KA, Brooks DP, Edwards RM. Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 May 19;258(3):578-82.

Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 2006 Nov;38(11):1310-5.

Fincham AG, Simmer JP. Amelogenin proteins of developing dental enamel. *Ciba Found Symp*. 1997;205:118-30; discussion 130-4.

Forand A, Beck L, Leroy C, Rousseau A, Boitez V, Cohen I, Courtois G, Hermine O, Friedlander G. EKLf-driven PIT1 expression is critical for mouse erythroid maturation in vivo and in vitro. *Blood*. 2013 Jan 24;121(4):666-78.

Foster BL, Tompkins KA, Rutherford RB, Zhang H, Chu EY, Fong H, Somerman MJ. Phosphate: known and potential roles during development and regeneration of teeth and supporting structures. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2008 Dec;84(4):281-314.

Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB, Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol*. 2004 Dec 6;167(5):973-83.

Fukumoto S, Yamada A, Nonaka K, Yamada Y. Essential roles of ameloblastin in maintaining ameloblast differentiation and enamel formation. *Cells Tissues Organs*. 2005;181(3-4):189-95.

Gaucher C, Boukpepsi T, Septier D, Jehan F, Rowe PS, Garabédian M, Goldberg M, Chaussain-Miller C. Dentin noncollagenous matrix proteins in familial hypophosphatemic rickets. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):219-23.

Gattineni, J. et P.A. Friedman, Regulation of hormone-sensitive renal phosphate transport. *Vitam Horm*, 2015. 98: p. 249-306.

Ge G, Zhou C, Ren Y, Tang X, Wang K, Zhang W, Niu L, Zhou Y, Yan Y, He J. Enhanced SLC34A2 in breast cancer stem cell-like cells induces chemotherapeutic resistance to doxorubicin via SLC34A2-Bmi1-ABCC5 signaling. *Tumour Biol*. 2016 Apr;37(4):5049-62.

George A et Veis A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chem Rev*. 2008 Nov;108(11):4670-93.

Giachelli CM. Ectopic calcification: gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am J Pathol*. 1999 Mar;154(3):671-5.

Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Dec;15(12):2959-64.

Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res*. 2005 Apr 15;96(7):717-22.

Gibson CW. The Amelogenin Proteins and Enamel Development in Humans and Mice. *J Oral Biosci*. 2011;53(3):248-256.

Giovannini D, Touhami J, Charnet P, Sitbon M, Battini JL. Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor XPR1 in metazoans. *Cell Rep*. 2013 Jun 27;3(6):1866-73..

Glimcher MJ. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect*. 1987;36:49-69.

Glimcher MJ. The possible role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in the calcification of bone in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 1990 Jul;11:7-10.

Goga R, Chandler NP, Oginni AO. Pulp stones: a review. *Int Endod J*, 41 (2008), pp. 457–468

Goldberg M et Septier D. A comparative study of the transition between predentin and dentin, using various preparative procedures in the rat. *Eur J Oral Sci*. 1996 Jun;104(3):269-77.

Goldberg M et Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan 1;15(1):13-27.

Goldberg M, Kellermann O, Dimitrova-Nakov S, Harichane Y, Baudry A. Comparative studies between mice molars and incisors are required to draw an overview of enamel structural complexity. *Front Physiol*. 2014 Sep 19;5:359.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan 1;3:711-35.

Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? *Mediators Inflamm.* 2015;2015:347649.

Golub EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol.* 2011 Sep;33(5):409-17.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625-30.

Guicheux J, Palmer G, Shukunami C, Hiraki Y, Bonjour JP, Caverzasio J. A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone.* 2000 Jul;27(1):69-74.

Gupta A, Tenenhouse HS, Hoag HM, Wang D, Khadeer MA, Namba N, Feng X, Hruska KA. Identification of the type II Na⁽⁺⁾-Pi cotransporter (Npt2) in the osteoclast and the skeletal phenotype of Npt2^{-/-} mice. *Bone.* 2001 Nov;29(5):467-76.

Haider S, Wang J, Nagano A, Desai A, Arumugam P, Dumartin L, Fitzgibbon J, Hagemann T, Marshall JF, Kocher HM, Crnogorac-Jurcevic T, Scarpa A, Lemoine NR, Chelala C. A multi-gene signature predicts outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genome Med.* 2014 Dec 3;6(12):105.

Hale JE et Wuthier RE. The mechanism of matrix vesicle formation. Studies on the composition of chondrocyte microvilli and on the effects of microfilament-perturbing agents on cellular vesiculation. *J Biol Chem.* 1987 Feb 5;262(4):1916-25.

Hernando N, Myakala K, Simona F, Knöpfel T, Thomas L, Murer H, Wagner CA, Biber J. Intestinal Depletion of NaPi-IIb/Slc34a2 in Mice: Renal and Hormonal Adaptation. *Bone Miner Res.* 2015 Oct;30(10):1925-37.

Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I, Murer H, Biber J. Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 24;95(24):14564-9.

Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim HM, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol*. 1993 Oct;143(4):1003-8.

Hodge AJ et Petruska JA. Subunit model for the tropocollagen macromolecule *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964 May;51:871-6.

Hollis-Moffatt JE, Phipps-Green AJ, Chapman B, Jones GT, van Rij A, Gow PJ, Harrison AA, Highton J, Jones PB, Montgomery GW, Stamp LK, Dalbeth N, Merriman TR. The renal urate transporter SLC17A1 locus: confirmation of association with gout. *Arthritis Res Ther*. 2012 Apr 27;14(2):R92.

Hosoya A, Hiraga T, Ninomiya T, Yukita A, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Ito S, Nakamura H. Thy-1-positive cells in the subodontoblastic layer possess high potential to differentiate into hard tissue-forming cells. *Histochem Cell Biol*. 2012 Jun;137(6):733-42.

Hsu SC, Sears RL, Lemos RR, Quintáns B, Huang A, Spiteri E, Nevarez L, Mamah C, Zatz M, Pierce KD, Fullerton JM, Adair JC, Berner JE, Bower M, Brodaty H, Carmona O, Dobricić V, Fogel BL, García-Estevéz D, Goldman J, Goudreau JL, Hopfer S, Janković M, Jaumà S, Jen JC, Kirdlar S, Klepper J, Kostić V, Lang AE, Linglart A, Maisenbacher MK, Manyam BV, Mazzoni P, Miedzybrodzka Z, Mitarnun W, Mitchell PB, Mueller J, Novaković I, Paucar M, Paulson H, Simpson SA, Svenningsson P, Tuite P, Vitek J, Wetchaphanphesat S, Williams C, Yang M, Schofield PR, de Oliveira JR, Sobrido MJ, Geschwind DH, Coppola G. Mutations in SLC20A2 are a major cause of familial idiopathic basal ganglia calcification. *Neurogenetics*. 2013 Feb;14(1):11-22.

Hu JC, Zhang CH, Yang Y, Kärman-Mårdh C, Forsman-Semb K, Simmer JP. Cloning and characterization of the mouse and human enamel genes. *J Dent Res*. 2001 Mar;80(3):898-902.

Hu JC, Hu Y, Smith CE, McKee MD, Wright JT, Yamakoshi Y, Papagerakis P, Hunter GK, Feng JQ, Yamakoshi F, Simmer JP. Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10858–71.

Hubbard MJ. Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(4):437-66.

Iharada M, Miyaji T, Fujimoto T, Hiasa M, Anzai N, Omote H, Moriyama Y. Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J Biol Chem*. 2010 Aug 20;285(34):26107-13.

Ito M, Haito S, Furumoto M, Uehata Y, Sakurai A, Segawa H, Tatsumi S, Kuwahata M, Miyamoto K. Unique uptake and efflux systems of inorganic phosphate in osteoclast-like cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Jan;292(1):C526-34.

Jensen N, Autzen JK, Pedersen L. Slc20a2 is critical for maintaining a physiologic inorganic phosphate level in cerebrospinal fluid. *Neurogenetics*. 2016. 17(2):125-30.

Jensen N, Schrøder HD, Hejbøl EK, Füchtbauer EM, de Oliveira JR, Pedersen L. Loss of function of Slc20a2 associated with familial idiopathic Basal Ganglia calcification in humans causes brain calcifications in mice. *J Mol Neurosci*. 2013 Nov;51(3):994-9.

Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(2):179-200.

Kantaputra PN, Sumitsawan Y, Schutte BC, Tocharontanaphol C. Van der Woude syndrome with sensorineural hearing loss, large craniofacial sinuses, dental pulp stones, and minor limb anomalies: report of a four-generation Thai family. *Am J Med Genet*. 2002 Apr 1;108(4):275-80.

Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, Miller AD. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7071-5.

Kawashima N et Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016 Jul;56(4):144-53.

Kerebel B, Daculsi G, Kerebel LM. Ultrastructural studies of enamel crystallites. *J Dent Res*. 1979 Mar;58(Spec Issue B):844-51.

Kim KM, Lim J, Choi YA, Kim JY, Shin HI, Park EK. Gene expression profiling of oral epithelium during tooth development. *Arch Oral Biol*. 2012 Aug;57(8):1100-7.

Khoshniat S, Bourguine A, Julien M, Weiss P, Guicheux J, Beck L. The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Jan;68(2):205-18.

Kohri K, Nomura S, Kitamura Y, Nagata T, Yoshioka K, Iguchi M, Yamate T, Umekawa T, Suzuki Y, Sinohara H, et al. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):15180-4.

Lacruz RS, Smith CE, Bringas P Jr, Chen YB, Smith SM, Snead ML, Kurtz I, Hacia JG, Hubbard MJ, Paine ML. Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. *J Cell Physiol*. 2012 May;227(5):2264-75.

Lagerström M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Bäckman B, Landegren U, Pettersson U. A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics*. 1991 Aug;10(4):971-5.

Landis WJ, Hodgens KJ, Arena J, Song MJ, McEwen BF. Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microsc Res Tech*. 1996 Feb 1;33(2):192-202.

Landis WJ et Jacquet R. Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcif Tissue Int*. 2013 Oct;93(4):329-37.

Legati A, Giovannini D, Nicolas G, López-Sánchez U, Quintáns B, Oliveira JR, Sears RL, Ramos EM, Spiteri E, Sobrido MJ, Carracedo Á, Castro-Fernández C, Cubizolle S, Fogel BL, Goizet C, Jen JC, Kirdlar S, Lang AE, Miedzybrodzka Z, Mitarnun W, Paucar M, Paulson H, Pariente J, Richard AC, Salins NS, Simpson SA, Striano P, Svenningsson P, Tison F, Unni VK, Vanakker O, Wessels MW, Wetchaphanphesat S, Yang M, Boller F, Champion D,

Hannequin D, Sitbon M, Geschwind DH, Battini JL, Coppola G. Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export. *Nat Genet.* 2015 Jun;47(6):579-81.

Lesot H, Brook AH. Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol.* 2009 Dec;54 Suppl 1:S25-33.

Li X et Giachelli CM. Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007 Jul;16(4):325-8.

Lignon G, de la Dure-Molla M, Dessombz A, Berdal A, Babajko S. [Enamel: a unique self-assembling in mineral world]. *Med Sci (Paris).* 2015 May;31(5):515-21.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(5):679-728.

Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL. DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *Bone Miner Res.* 2005 Dec;20(12):2169-77.

Lisi S, Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H. Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:167-70.

Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pagès A, Amyere M, Wagenstaller J, Müller-Barth U, Badenhop K, Kaiser SM, Rittmaster RS, Shlossberg AH, Olivares JL, Loris C, Ramos FJ, Glorieux F, Vikkula M, Jüppner H, Strom TM. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nat Genet.* 2006 Nov;38(11):1248-50.

Lu Y, Xie Y, Zhang S, Dusevich V, Bonewald LF, Feng JQ. DMP1-targeted Cre expression in odontoblasts and osteocytes. *J Dent Res.* 2007 Apr;86(4):320-5.

Lu Y, Ye L, Yu S, Zhang S, Xie Y, McKee MD, Li YC, Kong J, Eick JD, Dallas SL, Feng JQ. Rescue of odontogenesis in *Dmp1*-deficient mice by targeted re-expression of DMP1

reveals roles for DMP1 in early odontogenesis and dentin apposition in vivo. *Dev Biol.* 2007 Mar 1;303(1):191-201.

Lundquist, P. Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis. *Swed Dent J Suppl*, 2002(154): p. 1-52.

Lundquist P, Ritchie HH, Moore K, Lundgren T, Linde A. Phosphate and calcium uptake by rat odontoblast-like MRPC-1 cells concomitant with mineralization. *J Bone Miner Res.* 2002 Oct;17(10):1801-13.

Magen D, Berger L, Coady MJ, Ilivitzki A, Militianu D, Tieder M, Selig S, Lapointe JY, Zelikovic I, Skorecki K. A loss-of-function mutation in NaPi-IIa and renal Fanconi's syndrome. *N Engl J Med.* 2010 Mar 25;362(12):1102-9.

Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res.* 2001 Aug;15:46-50.

Magne D, Bluteau G, Lopez-Cazaux S, Weiss P, Pilet P, Ritchie HH, Daculsi G, Guicheux J. Development of an odontoblast in vitro model to study dentin mineralization. *Connect Tissue Res.* 2004;45(2):101-8.

Mahamid J, Addadi L, Weiner S. Crystallization pathways in bone. *Cells Tissues Organs.* 2011;194(2-4):92-7.

Margolis HC, Beniash E, Fowler CE. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *Dent Res.* 2006 Sep;85(9):775-93.

Marks SC Jr et Schroeder HE. Tooth eruption: theories and facts *Anat Rec.* 1996 Jun;245(2):374-93.

McCulloch CA, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontol 2000.* 2000 Oct;24:56-72.

McKee MD, Warshawsky H, Nanci A. Cyclical incorporation of ³³P into rat incisor enamel in vivo as visualized by whole-mount radioautography. *Arch Oral Biol.* 1989;34:989-993

McKee MD, Hoac B, Addison WN, Barros NM, Millán JL, Chaussain C. Extracellular matrix mineralization in periodontal tissues: Noncollagenous matrix proteins, enzymes, and relationship to hypophosphatasia and X-linked hypophosphatemia. *Periodontol* 2000. 2013 Oct;63(1):102-22.

Miletich I et Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004 Jun;72(2):200-12.

Miyamoto K, Haito-Sugino S, Kuwahara S, Ohi A, Nomura K, Ito M, Kuwahata M, Kido S, Tatsumi S, Kaneko I, Segawa H. Sodium-dependent phosphate cotransporters: lessons from gene knockout and mutation studies. *J Pharm Sci.* 2011 Sep;100(9):3719-30.

Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene.* 2001 Dec 6; 20(56):8085-91.

Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jun 1;17:1996-2023.

Murer H, Forster I, Biber J. The sodium phosphate cotransporter family SLC34. *Pflugers Arch* 2004. 447:763-767

Nakata A, Kameda T, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Sep 5;308(4):834-9.

Nancollas GH, Zawacki SJ. Calcium phosphate mineralization. *Connect Tissue Res.* 1989;21(1-4):239-44; discussion 245-6.

Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 10;98(8):4516-21.

Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D. Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther.* 2002 Aug;6(2):199-209.

Ninomiya M, Ohishi M, Kido J, Ohsaki Y, Nagata T. Immunohistochemical localization of osteopontin in human pulp stones. *J Endod.* 2001 Apr;27(4):269-72.

Nudelman F, Lausch AJ, Sommerdijk NA, Sone ED. In vitro models of collagen biomineralization. *J Struct Biol.* 2013 Aug;183(2):258-69.

O'Hara B, Johann SV, Klinger HP, Blair DG, Rubinson H, Dunn KJ, Sass P, Vitek SM, Robins T. Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Differ.* 1990 Mar;1(3):119-27.

Olah Z, Lehel C, Anderson WB, Eiden MV, Wilson CA. The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent phosphate transporter. *J Biol Chem.* 1994 Oct 14;269(41):25426-31.

Onishi T, Okawa R, Ogawa T, Shintani S, Ooshima T. Phex mutation causes the reduction of npt2b mRNA in teeth. *J Dent Res.* 2007 Feb;86(2):158-62.

Osborne JW et Ten Cate AR. *Advanced Dental Histology*. Edité par Wright PSG, 1983. ISBN 10: 0723606714

Palmer G, Zhao J, Bonjour J, Hofstetter W, Caverzasio J. In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone.* 1999 Jan;24(1):1-7.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003 Apr;111(2):117-27.

Pansky B. *Review of Medical Embryology*. McGraw-Hill, 1 août 1982 - 527 pages

Pasteris, J.D.B., and Eugenia, B. Wopen, and E. Valsami-Jones, Bone and Tooth Mineralization: Why Apatite? *Elements (Que)*, 2008. 4(2): p. 97-104.

Pellegrino ED et Biltz RM. Bone carbonate and the Ca to P molar ratio. *Nature*. 1968 Sep 21;219(5160):1261-2.

Peterková R, Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Ruch JV. Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int J Dev Biol*. 1996 Oct;40(5):1009-16.

Piette E et Goldberg M. La dent normale et pathologique. *De Boeck Supérieur*, 2001 - 392 pages

Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1985 Nov;(200):87-99.

Poulter JA, Murillo G, Brookes SJ, Smith CE, Parry DA, Silva S, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 2014 Oct 15;23(20) :5317-24.

Quamme, G.A., Effect of pH on Na(+)-dependent phosphate transport in renal outer cortical and outer medullary BBMV. *Am J Physiol*, 1990. 258(2 Pt 2): p. F356-63.

Quamme GA, Walker JJ, Yan TS. pH gradient-stimulated phosphate transport in outer medullary brush-border membranes. *Am J Physiol*. 1989 Oct;257(4 Pt 2):F639-48.

Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 2001 Aug 1;10(16) :1673-7

Robinson C, Hiller CR, Weatherell JA. Uptake of ³²P-labelled phosphate into developing rat incisor enamel. *Calcif Tissue Res*. 1974. 15:143-152.

Rohde M, Mayer H. Exocytotic process as a novel model for mineralization by osteoblasts in vitro and in vivo determined by electron microscopic analysis. *Calcif Tissue Int.* 2007 May;80(5):323-36.

Roberts SJ, Stewart AJ, Sadler PJ, Farquharson C. Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. *Biochem J.* 2004 Aug 15;382(Pt 1):59-65.

Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jan;106 Suppl 1:282-91.

Rothová M, Feng J, Sharpe PT, Peterková R, Tucker AS. Contribution of mesoderm to the developing dental papilla. *Int J Dev Biol.* 2011;55(1):59-64.

Ruch JV. Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: candid questions and critical comments. *Connect Tissue Res.* 1995;32(1-4):1-8.

Ruch JV, Lesot H, Bègue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):51-68.

Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C, Schiavi SC. Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Nov;20(11):2348-58.

Salaün C, Gyan E, Rodrigues P, Heard JM. Pit2 assemblies at the cell surface are modulated by extracellular inorganic phosphate concentration. *J Virol.* 2002 May;76(9):4304-11.

Salaün C, Maréchal V, Heard JM. Transport-deficient Pit2 phosphate transporters still modify cell surface oligomers structure in response to inorganic phosphate. *J Mol Biol.* 2004 Jun 25;340(1):39-47.

Salaün C, Leroy C, Rousseau A, Boitez V, Beck L, Friedlander G. Identification of a novel transport-independent function of PiT1/SLC20A1 in the regulation of TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2010 Nov 5;285(45):34408-18.

Salmon B, Bardet C, Coyac BR, Baroukh B, Naji J, Rowe PS, Opsahl Vital S, Linglart A, Mckee MD, Chaussain C. Abnormal osteopontin and matrix extracellular phosphoglycoprotein localization, and odontoblast differentiation, in X-linked hypophosphatemic teeth. *Connect Tissue Res.* 2014 Aug;55 Suppl 1:79-82.

Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S, Miyamoto K. Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J Biol Chem.* 2002 May 31;277(22):19665-72.

Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009 Sep;297(3):F671-8.

Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami F, Matsumoto N, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K. Type IIc sodium-dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Soc Nephrol.* 2009 Jan;20(1):104-13.

Segawa H, Aranami F, Kaneko I, Tomoe Y, Miyamoto K. The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism. *Bone.* 2009 Jul;45 Suppl 1:S2-7.

Sigal MJ, Pitaru S, Aubin JE, Ten Cate AR. A combined scanning electron microscopy and immunofluorescence study demonstrating that the odontoblast process extends to the dentinoenamel junction in human teeth. *Anat Rec.* 1984 Nov;210(3):453-62.

Simmer JP, Hu Y, Lertlam R, Yamakoshi Y, Hu JC. Hypomaturational enamel defects in *Klk4* knockout/*LacZ* knockin mice. *J Biol Chem.* 2009 Jul 10; 284(28):19110-21.

Slavkin HC, Mino W, Bringas P Jr. The biosynthesis and secretion of precursor enamel protein by ameloblasts as visualized by autoradiography after tryptophan administration. *Anat Rec.* 1976 Jul;185(3):289-312.

Smith CE et Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995 Feb;39(1):153-61.

Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):128-61.

Smith AJ et Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(5):425-37.

Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303.

Staines KA, Mackenzie NC, Clarkin CE, Zelenchuk L, Rowe PS, MacRae VE, Farquharson C. MEPE is a novel regulator of growth plate cartilage mineralization. *Bone.* 2012 Sep;51(3):418-30.

Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* 2002 Dec;161(6):2035-46.

Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009 May;28(4):221-9.

Tada, Hiroyuki et al. Phosphate Increases Bone Morphogenetic Protein-2 Expression through cAMP-Dependent Protein Kinase and ERK1/2 Pathways in Human Dental Pulp Cells. *Bone* 48.6 (2011): 1409–1416.

Takuma S et Nagai N. Ultrastructure of rat odontoblasts in various stages of their development and maturation. *Arch Oral Biol.* 1971 Sep;16(9):993-1011.

Teixeira CS, Santos Felipe MC, Tadeu Felipe W, Silva-Sousa YT, Sousa-Neto MD. The role of dentists in diagnosing osteogenesis imperfecta in patients with dentinogenesis imperfecta. *J Am Dent Assoc.* 2008 Jul;139(7):906-14.

Ten Cate's Oral Histology, 8th Edition. Development, Structure, and Function by Antonio Nanci. 400 pages

Tenenhouse HS, Klugerman AH, Neal JL. Effect of phosphonoformic acid, dietary phosphate and the Hyp mutation on kinetically distinct phosphate transport processes in mouse kidney. *Biochim Biophys Acta*. 1989 Sep 4;984(2):207-13.

Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jul;281(1):C1-C11.

Termine JD et Posner AS. Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. *Science*. 1966 Sep 23;153(3743):1523-5.

Thesleff I, Partanen AM, Rihniemi L. Localization of epidermal growth factor receptors in mouse incisors and human premolars during eruption. *Eur J Orthod*. 1987 Feb;9(1):24-32.

Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A*. 2006 Dec 1;140(23):2530-5.

Thouverey C, Bechkoff G, Pikula S, Buchet R. Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Jan;17(1):64-72.

Torres-Quintana MA, Gaete M, Hernandez M, Farías M, Lobos N. Ameloblastin and amelogenin expression in postnatal developing mouse molars. *J Oral Sci*. 2005 Mar;47(1):27-34.

Traub W, Arad T, Weiner S. Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):9822-6.

Ueno A, Kitase Y, Moriyama K, Inoue H. MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biol*. 2001 Sep;20(5-6):347-55.

Vasioukhin V, Degenstein L, Wise B, Fuchs E. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jul 20;96(15):8551-6.

Villa-Bellosta R, Sorribas V. Compensatory regulation of the sodium/phosphate cotransporters NaPi-IIc (SCL34A3) and Pit-2 (SLC20A2) during Pi deprivation and acidosis. *Pflugers Arch*. 2010 Feb;459(3):499-508.

Wagner CA, Hernando N, Forster IC, Biber J. The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters. *Pflugers Arch*. 2014 Jan;466(1):139-53.

Walker JJ, Yan TS, Quamme GA. Presence of multiple sodium-dependent phosphate transport processes in proximal brush-border membrane. *Am J Physiol*. 1987 Feb;252(2 Pt 2):F226-31.

Wallingford MC, Chia J, Leaf EM, Borgeia S, Chavkin NW, Sawangmake C, Marro K, Cox TC, Speer MY, Giachelli CM. SLC20A2 deficiency in mice leads to elevated phosphate levels in cerebrospinal fluid and glymphatic pathway-associated arteriolar calcification, and recapitulates human idiopathic basal ganglia calcification. *Brain Pathol*. 2016. Jan 29. doi: 10.1111/bpa.12362.

Wang Y, Azaïs T, Robin M, Vallée A, Catania C, Legriel P, Pehau-Arnaudet G, Babonneau F, Giraud-Guille MM, Nassif N. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nat Mater*. 2012 Jul 1;11(8):724-33.

Wang Y, Yang W, Pu Q, Yang Y, Ye S, Ma Q, Ren J, Cao Z, Zhong G, Zhang X, Liu L, Zhu W. The effects and mechanisms of SLC34A2 in tumorigenesis and progression of human non-small cell lung cancer. *J Biomed Sci*. 2015 Jul 9;22:52.

Weller M, Overton T, Rourke J, Armstrong F. *Inorganic Chemistry 6th Edition* Oxford University Editions Published: 23 January 2014. 912 Pages. ISBN: 9780199641826

Wennberg A, Bawden JW. Comparison of ³³P with ⁴⁵Ca distribution in developing rat molar enamel in vivo and in vitro. *J Dent Res* 1987. 57:111-117.

Werner A, Moore ML, Mantei N, Biber J, Semenza G, Murer H. Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 1;88(21):9608-12.

Wittrant Y, Bourguine A, Khoshniat S, Alliot-Licht B, Masson M, Gatus M, Rouillon T, Weiss P, Beck L, Guicheux J. Inorganic phosphate regulates Glvr-1 and -2 expression: role of calcium and ERK1/2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 3;381(2):259-63.

Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int*. 2013 Oct;93(4):365-73.

Wuthier RE et Lipscomb GF. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jun 1;16:2812-902.

Xu Y, Zhou YL, Gonzalez FJ, Snead ML. CCAAT/enhancer-binding protein delta (C/EBPdelta) maintains amelogenin expression in the absence of C/EBPalpha in vivo. *Biol Chem*. 2007 Oct 12;282(41):29882-9.

Yadav MC, Bottini M, Cory E, Bhattacharya K, Kuss P, Narisawa S, Sah RL, Beck L, Fadeel B, Farquharson C, Millán JL. Skeletal Mineralization Deficits and Impaired Biogenesis and Function of Chondrocyte-Derived Matrix Vesicles in Phospho1(-/-) and Phospho1/PiT1 Double-Knockout Mice. *J Bone Miner Res*. 2016 Jun;31(6):1275-86.

Yamakoshi Y, Tanabe T, Oida S, Hu CC, Simmer JP, Fukae M. Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin. *Arch Oral Biol*. 2001;46(11):1005-14.

Yamauchi M, Katz EP, Otsubo K, Teraoka K, Mechanic GL. Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues. *Connect Tissue Res*. 1989;21(1-4):159-67; discussion 168-9.

Yoshioka H, Yoshiko Y, Minamizaki T, Suzuki S, Koma Y, Nobukiyo A, Sotomaru Y, Suzuki A, Itoh M, Maeda N. Incisor enamel formation is impaired in transgenic rats

overexpressing the type III NaPi transporter Slc20a1. *Calcif Tissue Int.* 2011 Sep;89(3):192-202.

Zhang X, Zhao J, Li C, Gao S, Qiu C, Liu P, Wu G, Qiang B, Lo WH, Shen Y. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nat Genet.* 2001 Feb;27(2):151-2.

Zhao D, Vaziri Sani F, Nilsson J, Rodenburg M, Stocking C, Linde A, Gritli-Linde A. Expression of Pit2 sodium-phosphate cotransporter during murine odontogenesis is developmentally regulated. *Eur J Oral Sci.* 2006 Dec;114(6):517-23.

Zhao N, Foster BL, Bonewald LF. The Cementocyte-An Osteocyte Relative? *J Dent Res.* 2016 Jul;95(7):734-41.

Zheng L, Seon YJ, Mourão MA, Schnell S, Kim D, Harada H, Papagerakis S, Papagerakis P. Circadian rhythms regulate amelogenesis. *Bone.* 2013 Jul;55(1):158-65.

Zhou X, Cui Y, Zhou X, Han J. Phosphate/pyrophosphate and MV-related proteins in mineralisation: discoveries from mouse models. *Int J Biol Sci.* 2012;8(6):778-90.

Thèse de Doctorat

Laure MERAMETDJIAN

Phosphate et minéralisation dentaire : quel rôle pour les transporteurs de phosphate

Phosphate and dental mineralization : what role for phosphate transporters ?

Résumé

La place essentielle du phosphate dans la composante minérale dentaire laisse supposer un rôle physiologique déterminant pour les protéines membranaires permettant son entrée dans les cellules dentaires. Contrairement aux données disponibles pour le calcium, les molécules permettant la production et la régulation du flux de phosphate aux sites de formation du minéral par les cellules minéralisantes dentaires sont peu connues. Ces informations sont pourtant déterminantes pour la compréhension des mécanismes de minéralisation dentaire. La première étape dans la compréhension du rôle des six transporteurs de phosphate connus (SLC17A1, SLC34A1, SLC34A2, SLC34A3, SLC20A1 et SLC20A2) pendant l'odontogenèse et la minéralisation dentaire a été de déterminer leur expression spatio-temporelle par différentes techniques. Nos résultats ont montré que SLC34A2, SLC20A1 et SLC20A2 sont les transporteurs de phosphate exprimés pendant le développement dentaire. Cependant le schéma spatio-temporel d'expression de ces transporteurs ne coïncidant pas avec la cinétique de minéralisation la question de leur implication fonctionnelle dans les processus de minéralisation, en tant que transporteurs de phosphate dans la dent, ou en tant que protéines multifonctionnelles restait ouverte. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place plusieurs modèles d'analyse *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Les résultats les plus importants, issus de l'analyse phénotypique des dents des souris *Slc20a2*^{-/-} ont montré que l'absence de *Slc20a2* entraîne des anomalies de la dentine avec des calcosphérites au front de minéralisation avec un retard de minéralisation dentaire.

Mots clés

Transporteurs de phosphate. Minéralisation dentaire. Odontogenèse. Expression génique

Abstract

The importance of phosphate in dental mineralization suggests a key role for membrane proteins controlling Pi uptake into dental cells. In contrast to calcium, there is no study assessing the functional implication of the different sodium-phosphate transporters in tooth mineralization and odontogenesis. As a first step to determine the functional involvement of the six known phosphate transporters (Npt1/SLC17A1, Npt2a/SLC34A1, Npt2b/SLC34A2, Npt2c/SLC34A3, PiT1/SLC20A1 and PiT2/SLC20A2) during tooth development and mineralization, we have determined their spatiotemporal expression in mouse model during large timescale of odontogenesis by different techniques. Our results obtained by Real Time PCR as well as by *in situ* hybridization, immunohistochemistry and Xgal staining unravel that SLC34A2, SLC20A1 and SLC20A2 are the main phosphate transporters expressed during tooth development. These results coincide with our results on human dental samples. Considering the spatiotemporal pattern of expression, it remains so to be determined the functional implication of these transporters in mineralization processes, and whether these proteins act indeed as transporters of phosphate in the tooth, or as multifunctional proteins. To answer this question we addressed several models: *in vitro* (cell lines culture) *ex vivo* (dental germ culture) and *in vivo* (transgenic mouse models). Multimodal analysis (histology, microCT, SEM, EDX, immunohistochemistry) on *Slc20a2*^{-/-} mice dental structures show that absence of *Slc20a2* leads to abnormal dentin structures displaying calcospherites at the mineralization front, together with delayed dentin mineralization.

Key Words

Phosphate transporters. Tooth calcifications. Odontogenesis. Gene expression