

Université de Montréal

Rôle et impact des protéines associées à la lame basale spécialisée dans l'attache gingivale et la maladie parodontale

par Aurélien Fouillen

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en Biochimie et Médecine moléculaire

Avril 2018

© Aurélien Fouillen, 2018

Résumé

Le corps est entouré d'une enveloppe épithéliale afin de se protéger de l'environnement agressif qui l'entoure. La dent est la seule structure dans le corps qui crée une brèche de cette barrière épithéliale. Elle est de plus constamment exposée à un environnement humide, chaud et riche en nutriment qui est un milieu parfait pour la croissance de micro-organismes. Pour prévenir et contrôler l'intrusion de corps étrangers tels que des bactéries, le corps a élaboré une jonction dite dento-gingivale. Celle-ci sépare les tissus du parodonte sous-jacent du milieu buccal septique en créant un scellement autour de la dent formant ainsi une véritable barrière contre les bactéries. Ces dernières sont reconnues comme les agents causatifs dans l'initiation et le développement de la maladie parodontale. En effet, par leurs activités enzymatiques, les bactéries orales affectent le scellement de la jonction dento-gingivale exposant ainsi les tissus sous-jacents aux toxines et micro-organismes menant à la maladie parodontale.

Les maladies parodontales affectent une grande partie de la population et leurs gravités augmentent avec l'âge. Les formes légères à modérées touchent plus de 80% des adultes, tandis qu'environ 15% souffrent de parodontite. Dans les cas les plus sévères, la maladie parodontale mène éventuellement à la perte de dent et d'os. Au-delà des graves conséquences de cette maladie sur la cavité buccale, il y a de plus en plus de preuves que la maladie parodontale est reliée à différentes maladies systémiques telles que les maladies cardio-vasculaires et respiratoires mais aussi le diabète. La maladie parodontale a ainsi une incidence sur la qualité de vie mais représente également un lourd fardeau financier et sanitaire pour le patient et la société. Il n'y a actuellement aucun remède pour cette maladie répandue et le traitement repose sur une gestion continue et chirurgicale. Il est alors urgent et nécessaire de développer de nouveaux traitements.

Il est crucial de comprendre l'architecture et la composition de la matrice extracellulaire permettant le scellement dento-gingival afin d'ouvrir de nouveaux horizons à la lutte contre la maladie parodontale et pour le développement de traitement préventif et/ou thérapeutique.

Mots-clés : Épithélium de jonction, lame basale spécialisée, matrice extracellulaire, maladies parodontales, bactéries

Abstract

The body is surrounded by an epithelial envelope to protect itself from the aggressive environment around it. The tooth is the only structure in the body that creates a breach of this epithelial barrier. It is also constantly exposed to a humid, warm and nutrient-rich environment that is a perfect medium for the growth of micro-organisms. To prevent and control the intrusion of external organisms such as bacteria, the body has developed the so-called dento-gingival junction. This epithelial attachment separates the underlying periodontal tissues from the septic oral medium by creating a seal around the tooth, thus forming a true barrier against bacteria. These are recognized as causative agents in the initiation and development of periodontal disease. Indeed, by their enzymatic activities, oral bacteria break the seal of the dento-gingival junction to expose underlying tissues to toxins and microorganisms leading to periodontal diseases.

Periodontal diseases affect a large part of the population and their severity increases with age. Mild to moderate forms affect more than 80% of adults, while about 15% suffer from periodontitis. In the most severe cases, periodontal disease eventually leads to loss of tooth and bone. Beyond the serious consequences of this disease on the oral cavity, there is growing evidence that periodontal disease is related to various systemic diseases such as cardiovascular and respiratory diseases but also diabetes. Periodontal disease affects the quality of life but also represents a heavy financial and health burden for the patient and society. There is currently no cure for this widespread disease and the treatment is based on continuous and surgical management. It is then urgent and necessary to develop new treatments.

It is crucial to understand precisely the architecture and composition of the extracellular matrix allowing sealing to open up new horizons for the fight against periodontal disease and for the development of preventive and / or therapeutic treatment.

Keywords : Junctional epithelium , specialized basal lamina, extracellular matrix, periodontal diseases, bacteria

Table des matières

Résumé	<i>i</i>
Abstract	<i>ii</i>
Table des matières	<i>iii</i>
Liste des tableaux	<i>viii</i>
Liste des figures	<i>ix</i>
Liste des abréviations	<i>xiii</i>
Remerciements	<i>xvii</i>
Chapitre I – Introduction	1
I.1 – L’organe de l’émail	2
I.2 – L’épithélium de jonction	3
I.3 – La lame basale spécialisée	6
I.3.1 – Groupe de gènes <i>Scpp</i>	7
I.3.2 - AMTN	8
I.3.3 – Laminine-332	11
I.3.4 – ODAM	13
I.3.5 – SCPPPQ1	16
I.4 – Rôles des protéines	19
I.4.1 - Dans des animaux transgéniques	19
I.4.2 - Dans la maladie	21
I.5 – La maladie parodontale	25
I.5.1 – Tissus impliqués	25
I.5.2 – Bactéries impliquées	26
I.5.3 – Mécanismes d’attaque	27
I.5.4 – La maladie parodontale et les protéines de la lame basale spécialisée	29
I.5.5 – Les péri-implantites	30
I.6 - Problématique et hypothèse de travail	31
I.7 – Justification des méthodes utilisées	33
I.7.1 - Biologie moléculaire	33
I.7.2 – Biochimie	34
I.7.3 – Protéomique	35
I.7.4 – Biochimie structurale	36
I.7.5 – Animaux	40

Chapitre II – Premier article scientifique - Laminin γ2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects	42
II.1 – Description de l’article et contribution des auteurs	42
II.2 - Abstract	45
II.3 - Keywords	45
II.4 - Introduction	46
II.5 - Results	47
II.5.1 - Visual and micro-computed tomographic analyses	47
II.5.2 - Histological and structural changes in amelogenesis in LAMC2-Dox mice	47
II.5.3 - Immunohistochemistry	48
II.6 - Discussion	49
II.7 – Experimental procedures	52
II.7.1 - Generation and genotyping of LAMC2-Dox mice	52
II.7.2 - Tissue preparation for light and electron microscopy and micro-computed tomography	53
II.7.3 - Immunohistochemistry	54
II.8 - Acknowledgments	55
II.9 - References	55
II.10 – Figures legends	61
II.11 - Figures	64
II.12 – Appendix table	71
Chapitre III – Second article scientifique - Interactions of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins of a specialized basal lamina that attaches epithelial cells to tooth mineral	74
III.1 – Description de l’article et contribution des auteurs	74
III.2 - Abstract	77
III.3 - Keywords	77
III.4 - Introduction	78
III.5 - Results	80
III.5.1 - Spatial distribution of AMTN, ODAM, and SCPPPQ1 in the sBL	80
III.5.2 - Analysis of the secondary structure of AMTN and ODAM	80
III.5.3 - Protein-protein interaction studies	81
III.5.4 - Gel filtration characterization of AMTN and ODAM	82
III.5.5 - Structural characterization of supramolecular complexes formed by AMTN, ODAM and SCPPPQ182	
III.6 - Discussion	83

III.6.1 - ODAM, AMTN and SCPPPQ1 are differential distributed across the sBL _____	83
III.6.2 - AMTN, ODAM and SCPPPQ1 exhibit propensity to interact _____	83
III.6.3 - Structural evidence that the proteins form supramolecular complexes _____	84
III.7 - Conclusion _____	85
III.8 - Methods _____	86
III.8.1 - Tissue processing for light and electron microscopy _____	86
III.8.2 - Immunofluorescence _____	86
III.8.3 - Post-embedding colloidal gold immunocytochemistry _____	87
III.8.4 - Cloning procedures _____	88
III.8.5 - BTH _____	88
III.8.6 - CoIP _____	89
III.8.7 - Protein overexpression and purification _____	89
III.8.8 - Circular Dichroism _____	90
III.8.9 - Atomic Force Microscopy _____	90
III.8.10 - Transmission Electron Microscopy _____	91
III.9 - Acknowledgments _____	91
III.10 - References _____	92
III.11 – Figures legends _____	97
III.12 – Figures _____	99
III.13 – Supplemental figures _____	106
III.14 – Supplemental tables _____	109
<i>Chapitre IV – Troisième article scientifique - Bacteria selectively degrade the extracellular matrix attaching the gingiva to the tooth _____</i>	<i>111</i>
IV.1 – Description de l’article et contribution des auteurs _____	111
IV.2 - Abstract _____	114
IV.3 - Keywords _____	114
IV.4 - Introduction _____	115
IV.5 - Results _____	117
IV.5.1 - In vitro susceptibility of sBL proteins to oral bacteria _____	117
IV.5.2 - Enzymatic degradation of the sBL proteins _____	118
IV.5.3 - Degradation of the supramolecular network of the sBL _____	118
IV.5.4 - Degradation of the native sBL _____	119
IV.6 - Discussion _____	119
IV.7 – Conclusion _____	121
IV.8 – Experimental procedures _____	122

IV.8.1 - Cloning procedures	122
IV.8.2 - Protein overexpression and purification	122
IV.8.3 - Prediction of cleavage sites	123
IV.8.4 - Enzymology assays	123
IV.8.5 - Bacterial cultures	123
IV.8.6 - Tissue preparation	124
IV.8.7 - Preparation of enamel organ and JE caps	124
IV.8.8 - Bacterial incubation with purified proteins	124
IV.8.9 - Bacterial incubation with enamel organ and JE caps	125
IV.8.10 - Top-down LC-MS/MS analysis	125
IV.8.11 - Atomic force microscopy	126
IV.8.12 - Scanning electron microscopy	126
IV.9 - Acknowledgement	126
IV.10 - References	127
IV.11 – Figures legends	131
IV.12 – Figures	133
IV.13 – Supplemental figures	140
IV.14 – Supplemental tables	145
Chapitre V –Brevet provisoire	150
V.1 – Description du brevet et contribution des auteurs	150
V.2 – Brevet provisoire	151
V.2.1 - BACKGROUND	151
V.2.2 - SUMMARY	153
V.2.3 - BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS	159
V.3.4 - DETAILED DESCRIPTION	160
V.3.5 - EXAMPLE 1	165
V.3.6 - CLAIMS	169
V.3.7 - ABSTRACT	172
V.3.8 – FIGURES LEGENDS	173
V.3.9 - FIGURES	174
Chapitre VI – Discussion	180
VI.1 – Le rôle des protéines de la LBS	180
VI.1.1 – L’importance de la Lam332	180
VI.1.2 – L’implication d’AMTN et d’ODAM	184
VI.1.3 – Les modifications post-traductionnelles	185
VI.1.4 – La relation d’ODAM avec les cancers épithéliaux	188
VI.2 – La caractérisation du réseau de la LBS	189

VI.2.1 – Les protéines au sein de la LBS _____	189
VI.2. 2 – La capacité d’interaction des protéines _____	190
VI.2.3 – La structure des protéines _____	192
VI.3 – La relation de la maladie parodontale avec la LBS _____	194
VI.3.1 – Les bactéries _____	195
VI.3.2 – L’influence de la maladie parodontale sur les protéines de la LBS _____	195
VI.3.3 – Comprendre la maladie afin de lutter contre elle _____	196
VI.4 – Du fondamental à l’appliqué _____	197
VI.4.1 – SCPPPQ1 face à la maladie parodontale _____	197
VI.4.2 – Mécanismes des OMVs _____	198
Conclusion _____	200
Bibliographie _____	201

Liste des tableaux

Chapitre II : Premier article scientifique

Appendix table II.1 : Clarification of the animal models used and of their diet _____ 73

Chapitre III : Deuxième article scientifique

Supplementary Table III.1 : Primers and restriction site for cloning procedures _____ 110

Chapitre IV : Troisième article scientifique

Supplementary Table IV.1 : Top down Mass Spectrometry of the AMTN fragments created by *P. gingivalis* after 2 h of incubation _____ 146

Supplementary Table IV.2 : Top down Mass Spectrometry of the ODAM fragments created by *P. gingivalis* after 2 h of incubation _____ 148

Supplementary Table IV.3 : In silico analysis of the cleavage of sBL proteins _____ 149

Liste des figures

Chapitre I : Introduction

Figure I.1 : Représentation histochimique de l'organe de l'émail	2
Figure I.2 : Différentes étapes d'une dent en éruption	3
Figure I.3 : Représentation de la jonction dento-gingivale	3
Figure I.4 : Représentation de l'épithélium de jonction (EJ)	4
Figure I.5 : Observation par microscopie électronique à transmission de la lame basale spécialisée (LBS).	6
Figure I.6 : Expériences d'immunolocalisation d'AMTN	10
Figure I.7 : Comparaison de deux isoformes de laminines	12
Figure I.8 : Comparaison du poids moléculaire d'ODAM	14
Figure I.9 : Expériences d'immunolocalisation d'ODAM	16
Figure I.10 : Expériences d'immunolocalisation de SCPPPQ1	19
Figure I. 11 : Représentation de la correspondance des exons d'ODAM pour APIN et la région amyloïdogène	23
Figure I.12 : Différents stades de développement de la maladie parodontale	26
Figure I.13 : Différents stades d'évolution de la péri-implantite	30
Figure I.14 : Représentation des spectres typiques suivant la structure secondaire d'une protéine	34
Figure I.15 : Représentation de la microscopie à force atomique	36
Figure I.16 : Représentation de la microscopie électronique à balayage	37
Figure I.17 : Représentation de la microscopie électronique à transmission	39
Figure I.18 : Représentation basique d'une expérience de SAXS	40

Chapitre II : Premier article scientifique

Figure II.1 : Comparative micro-CT views of hemimandibles from wild type (WT) and human <i>Lamc2</i> -rescued transgenic mice (<i>Lamc2</i> -Dox) mice	64
Figure II.2 : Comparative amelogenesis wild-type (WT) and human <i>Lamc2</i> -rescued transgenic mice (<i>Lamc2</i> -Dox) mice	65
Figure II.3 : Photomicrographs from hematoxylin and eosin stained histological sections of <i>Lamc2</i> -Dox mice incisors	66
Figure II.4 : Transmission electron micrographs of <i>Lamc2</i> -Dox mice incisors	67
Figure II.5 : Immunolocalization of laminin-332	68

Figure II.6 : Immunolocalization of albumin in wild type (WT) and human Lamc2-rescued transgenic (Lamc2-Dox) mice _____ 69

Figure II.7 : Immunohistochemical preparations for amelotin (AMTN), odontogenic ameloblast-associated (ODAM) and secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1 (SCPPPQ1) during maturation in Lamc2-Dox mice incisors _____ 70

Appendix figure II.1 : Représentation schématique de l'allèle LamC2 et des transgènes utilisés dans l'article original..... 71

Appendix figure II.2 : Différentes façon de générer des modèles LamC2 72

Chapitre III : Deuxième article scientifique

Figure III.1 : AMTN, ODA M and SCPPPQ1 localize at the cell-tooth interface _____ 99

Figure III.2 : Dual immunofluorescence labeling for AMTN, ODA M and SCPPPQ1 visualized by Structured Illumination Microscopy _____ 100

Figure III.3 : High resolution immunogold labeling demonstrates that AMTN, ODA M and SCPPPQ1 distribute differentially across the specialized basal lamina (sBL) _____ 101

Figure III.4 : Interaction analysis between AMTN, ODA M and SCPPPQ1 _____ 102

Figure III.5 : Visual characterization of aggregation behaviour of AMTN and ODA M _____ 103

Figure III.6 : Atomic force microscope characterization of AMTN, ODA M and SCPPPQ1 proteins _____ 104

Figure III. 7 : Schematic model of the distribution of AMTN, ODA M and SCPPPQ1 within the supramolecular organisation of the specialized basal lamina (sBL) _____ 105

Supplementary figure III.1 : Structural analysis by circular dichroism spectroscopy _____ 106

Supplementary figure III. 2 : Interspecies bacterial two-hybrid interaction analysis _____ 107

Supplementary figure III.3 : Analysis of expression of hODA M and hAMTN by E. coli _____ 108

Chapitre IV : Troisième article scientifique

Figure IV.1 : Western blot analysis following in vitro exposure of AMTN, ODA M and SCPPPQ1 to bacteria ____ 133

Figure IV.2 : Top-down Mass spectrometry of (A) AMTN, (B) ODA M and (C) SCPPPQ1 before (Blue) and after (orange) incubation with P. gingivalis _____ 134

Figure IV.3 : Scanning electron microscopy of bacteria after a two hour exposure to (A) buffer alone and (B) buffer containing SCPPPQ1 _____	135
Figure IV.4 : SDS-PAGE analysis of the in vitro digestion of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 with various enzymes	136
Figure IV.5 : Atomic Force and Scanning electron microscopies of the supramolecular network _____	137
Figure IV.6 : Scanning electron microscopy of enamel organ caps preparations _____	138
Figure IV.7 : Scanning electron microscopy of junctional epithelium caps exposed to <i>P. gingivalis</i> (Pg) for six hours _____	139

Supplementary figure IV.1 : SDS-PAGE (top) and Western-blot (bottom) analysis of in vitro digestion assays of AMTN and ODAM by <i>P. gingivalis</i>	140
Supplementary figure IV.2 : SDS-PAGE analysis of the in vitro digestion of AMTN and ODAM by <i>P. gingivalis</i> in the presence of a cocktail of protease inhibitors.....	141
Supplementary figure IV.3 : Western blot analysis of the in vitro digestion of Lm332 over time with <i>P. gingivalis</i>	142
Supplementary figure IV.4 : Exposure to <i>P.gingivalis</i> to a reconstituted sBL causes a pericellular destruction area	143
Supplementary figure IV. 5 : Exposure to <i>A. actinomycetemcomitans</i> to both reconstituted and native sBL reveals no destruction area.....	144

Chapitre V : Brevet provisoire

Figure V.1 : Western blot analysis following in vitro digestion assay of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 after incubations with different oral bacteria _____	174
Figure V.2 : Top-down mass spectrometry of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins before and after incubation with <i>P. gingivalis</i> _____	175
Figure V.3 : Scanning electron microscopy (SEM) of <i>P. gingivalis</i> after incubation without protein, with ODAM protein and with SCPPPQ1 protein _____	176
Figure V.4 : Scanning electron microscopy of <i>P. gingivalis</i> after incubation with SCPPPQ1 _____	177
Figure V.5 : Scanning electron microscope (SEM) images of <i>P. gingivalis</i> show a large number of outer membrane vesicles (OMVs) only in presence of SCPPPQ1 _____	178
Figure V.6 : Lysis test on agar plates to assess the antibacterial activity _____	179

Chapitre VI : Discussion

Figure VI.1 : Immunomarquage de la zone de maturation des animaux ne recevant pu de doxycycline	182
Figure VI.2 : Observation en DIC et fluorescence d'une incisive de rat d'un animal Off-Dox	183
Figure VI.3 : Comparaison de l'émail d'un animal sauvage avec celui d'un animal LAMC2 déficient conditionnellement en la chaîne $\gamma 2$ de la Lam332	184
Figure VI.4 : Immunomarquage en utilisant de billes d'or des animaux recevant de la tunycamicine	186
Figure VI.5 : Résultats des infections de cellules par ODAM	187
Figure VI.6 : Test de croissance des cellules HEK293 suivant leurs infections	188
Figure VI.7 : Évaluation de l'affinité d'AMTN (A) et ODAM (B) avec l'hydroxyapatite	189
Figure VI.8 : Évaluation de l'importance des acides aminés sélectionnée par « phage display » en utilisant le double hybride bactérien	191
Figure VI.9 : Sommaire des données de « phage display », double hybride bactérien et de l'évolution	192
Figure VI.10 : Données de Kratky représentative d'ODAM	193

Liste des abréviations

µm	Micromètre
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AA	Acides aminées
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
AI	Amélogénèse Imparfait
AKT	Protéine kinase B
AMBN	Améloblastine
AMEL	Amélogénine
AMTN	Amelotin
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BTH	Double hybride bactérien
<i>B. forsythus</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>
Co-IP	Co-immunoprécipitation
Da	Daltons
DIC	Contraste interférentiel différentiel
Dox	Doxycycline
<i>E. coli</i>	<i>Escherishia coli</i>
EB	Épidermolyse bulleuse
EJ	Épithélium de jonction
EO	Organe de l'émail

<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Gln	Glutamine
HPA	“Helix pomatia agglutinin”
KLK4	Kallikrein-4
KO	“Knock-out”
Lam332	Laminin-332
LB	Lame basale
LBS	Lame basale spécialisée
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
MMP-20	“Matrix metalloproteinase-20”
Motif RGD	Tripeptide Arginine-Glycine-Acide aspartique
MP	Maladie parodontale
Nm	Nanomètre
ODAM	“Odontogenic associated-ameloblast”
OMV	Vésicules de la membrane externe
ONPG	Ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PI3K	“Phosphoinositide 3-kinase”
Pro	Proline
PTEN	“Phosphatase and tensin homolog”
qPCR	“Polymerase Chain Reaction” quantitative
RCA	“Ricinus communis agglutinin”

REM	Restes Épithéliaux de Malassez
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SAXS	“Small angle X-rays scattering”
<i>Scpp</i>	“ <i>Secretory calcium-binding phosphoprotein</i> ”
SCPPPQ1	“Secretory calcium-binding phosphoprotein proline-glutamine rich 1”
Ser	Sérine
SR-SIM	“Super-Resolution Structured Illumination Microscopy”
<i>Sparcl1</i>	“Secreted protein, acidic, cysteine-rich like 1”
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
TOEC	Tumeurs odontogènes d'épithélium calcifié
WGA	“Wheat germ agglutinin”
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
X-ray	Rayons X

À tous ceux qui me sont chers,

“Imagination is more important than knowledge”

Albert Einstein

“In a dark place we find ourselves, and a little more knowledge lights our way”

Yoda, Maître Jedi

Remerciements

Une telle expédition à travers la jungle de la science ne se fait pas tout seul. J'ai eu la chance d'être entouré d'un grand nombre de personnes qui m'ont soutenu et poussé vers l'infini et l'au-delà afin de me permettre d'arriver là où j'en suis aujourd'hui.

Merci tout d'abord à mon directeur de recherche, Dr Antonio Nanci. Vous savez à quel point j'ai eu du plaisir à faire partie de votre équipe et que je vous suis reconnaissant de m'avoir tant impliqué dans votre vaste univers scientifique. La confiance que vous avez eue en moi m'a permis de m'épanouir scientifiquement mais aussi de développer des acquis dans la gestion d'un laboratoire et d'une plateforme qui me seront utiles dans le futur. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et votre encadrement qui feront que mon passage dans votre laboratoire me sera bénéfique tout au long de ma carrière. Je n'attends plus que ma photo sur le « wall of fame » et le tant attendu barbecue.

Le laboratoire de Dr Nanci ne serait rien sans ses membres. Merci pour votre contribution, gentillesse et pour tous les bons souvenirs que nous avons partagé autant au sein du laboratoire qu'à l'extérieur. Merci à Ana, Dominick, Jean-Daniel, Luiz, Renan et Sandra pour votre générosité et bonne humeur. Je n'oublie pas Rima qui m'a mis sur les rails au cours des deux premières années. Je remercie plus particulièrement Dainelys et Katia pour votre aide ces dernières semaines et pour votre efficacité et rigueur à toutes les deux qui font que ce laboratoire a du succès et aura un futur radieux.

Merci au Dr Christian Baron et Dr Jurgen Sygusch pour vos disponibilités, conseils et de m'avoir laissé évoluer librement dans vos laboratoires respectifs. Merci aussi aux membres de mon comité, Dre Joëlle Pelletier et Dr Pierre Moffatt, de m'avoir suivi et si bien conseillé au cours de ces 5 dernières années. Merci également à l'ensemble des membres de ce jury de doctorat d'avoir accepté la tâche de juger cette thèse.

J'aimerais remercier le personnel administratif, de la laverie, des livraisons mais aussi le personnel enseignant-encadrant, pour nous avoir aidé, dirigé et encouragé, et pour qui j'ai une grande sympathie.

Ces dernières années ont été aussi l'occasion de faire de belles rencontres amicales. Je pense à Alix & Séb, Bastien & Julie, Driss, Doaa, Dursun, Émilie, Emma & Séb, Fadi, Jaafar, Jean-François, Jon & Hannah, Heddy & Camila, Lian & David, Mathieu, Paul, Rodolfo, Sacha, Sam, Tarun, Zak. Merci à vous tous pour tous ces bons moments passé ensemble. Merci spécialement à Benoit de m'épauler dernièrement à 50%. Merci pour toutes les bonnes discussions, pizzas, conseils mais aussi pour ton soutien pour les manips qui a été d'une grande aide ces dernières semaines et qui ont apporté des résultats tant attendus.

Il y a toujours des personnes un peu plus spéciales. Je pense à Camille & Hadrien & Sarah, Flore & Pierre, Mathieu & désormais Carine et enfin Max & Sexy. On a partagé de nombreux moments inoubliables, tant de parties de jeux de société et D&D, de si bon repas en bonne compagnie. Pour cela je voudrais vous remercier d'avoir fait du Québec bien plus qu'une expérience « professionnelle » et j'espère que nous resterons en contact encore longtemps.

Je n'oublie pas les amis « restés » en France, Benjamin, Geoffrey, Janfi et Alex entre autres qui ont toujours été présents malgré les années et la distance.

Je ne serai jamais arrivé à cette étape de ma vie sans le soutien de mes parents et de ma sœur. Malgré la distance, merci d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir laissé libre court à ma folie de venir ici. Hey, finalement je vais pouvoir vous donner une date de thèse ;) Je pense aussi à mes grand parents, oncle et tante, cousin cousine, ma belle-famille, mes neveux et nièces que j'ai hâte de retrouver autour d'une bonne table à la française.

Enfin, on garde toujours le meilleur pour la fin. Merci ma Charline d'avoir su me supporter durant ces 9 dernières années mais surtout d'être encore là à le faire. Cette aventure je n'aurais su la vivre qu'avec toi et je suis plus que fier que nous en soyons tous les deux arrivés là où nous en sommes. Merci de ta bonne humeur, de tes conseils, de ton amour, de ta patience, bref d'être toi. Ton soutien a été le moteur de ma réussite et je dois celle-ci à ta présence dans ma vie. Tu es une personne merveilleuse.

Chapitre I – Introduction

L'épithélium de jonction (EJ) découle de la fusion des cellules formant l'émail avec la muqueuse orale lorsque la dent entre en éruption dans la cavité buccale [1]. C'est un épithélium unique en raison de son statut incomplètement différencié et de sa relation adhésive avec la dent [2]. Cette capacité adhésive est cruciale pour protéger les tissus de soutien des dents contre le microbiome agressif environnant [3]. La perturbation de l'intégrité de l'EJ peut déclencher une phase agressive de la maladie parodontale, pouvant conduire ultimement à la perte osseuse et dentaire. Les cellules de l'EJ se fixent à la surface de la dent minéralisée via une lame basale spécialisée (LBS), créant ainsi une interface étanche [4]. Bien qu'il puisse encore y avoir des composants encore inconnus, actuellement la LBS comprend seulement 4 protéines. Elle est enrichie en Laminine-332 (Lam332) et ne contient pas de collagènes de type IV et VII, ce qui la différencie des lames basales typiques qui relient les cellules épithéliales aux tissus conjonctifs sous-jacents. Notre groupe a identifié les 3 autres composants nommés AMTN, ODAM et SCPPPQ1 [5-8]. Les gènes codant pour ces 3 protéines appartiennent au groupe *Scpp* dont les membres codent principalement pour des protéines qui interviennent dans le dépôt de CaPO_4 . On pense que AMTN, ODAM, SCPPPQ1 et Lam332 structurent l'organisation supramoléculaire de la LBS et représentent des candidats solides dans le maintien de l'intégrité adhésive de l'EJ [9, 10]. Parmi les trois protéines récemment identifiées, ODAM se démarque en étant à la fois présente en permanence parmi les cellules de l'EJ en plus de s'accumuler dans la LBS et on la retrouve surexprimée dans des cancers épithéliaux alors que la cellule saine n'exprime pas la protéine [6, 11]. Nous suggérons alors qu'ODAM serait une protéine matricellaire, c'est-à-dire ayant des fonctions cellulaires et matricielles. En tant que tel, elle participe à la structuration de la LBS pour jouer un rôle dans l'attachement à l'EJ et serait aussi impliquée dans la définition du statut des cellules de l'EJ pour la cohésion cellulaire.

Cette thèse s'intéresse donc à exploiter les caractéristiques biochimiques des composants de la LBS afin d'étendre nos connaissances sur ces protéines encore énigmatiques. L'analyse de la structure de ces molécules apportera ainsi des données plus précises sur leurs fonctions afin de parvenir à une compréhension globale de la biologie interfaciale de l'EJ.

I.1 – L'organe de l'émail

L'organe de l'émail (OE) est associé à la formation de la matrice minéralisée la plus dure du corps humain, l'émail dentaire. L'OE est composé de 4 couches de cellules dont notamment les améloblastes qui représentent la couche la plus externe [1]. Ces dernières ont un cycle de vie complexe avec distinctes étapes [1]. L'incisive inférieure de rongeurs est en éruption continue, faisant du rat ou des souris des modèles d'intérêt pour l'étude de l'OE puisqu'on peut aisément distinguer les différentes étapes de différenciation, c'est-à-dire les phases de pré-sécrétion, sécrétion, transition et maturation (**Fig. I.1**). Au cours de la phase pré-sécrétoire, une lame basale (LB) typique sépare les améloblastes des odontoblastes (cellules formant la dentine). Au moment de passer à l'étape de sécrétion, cette LB est supprimée et en parallèle un dépôt actif de protéines de l'émail permet de guider la formation, l'organisation et la minéralisation partielle de la couche de l'émail. Au début de la maturation, les améloblastes sécrètent des constituants formant une lame basale dite spécialisée qui va permettre d'attacher la surface apicale des améloblastes à la surface de l'émail en maturation. Ceci permet de créer un espace confiné pour la dégradation enzymatique de protéines menant à l'expansion des cristaux d'émail en épaisseur et en largeur. Cette LBS a une composition atypique (que nous détaillerons plus bas). Une fois que l'émail a complètement terminé sa minéralisation, la dent fait éruption et une partie de l'OE recouvrant la couronne dentaire fusionne avec l'épithélium oral. Cette fusion entraîne la formation d'une structure appelée épithélium de jonction (EJ), qui adhère à la surface de la dent via une LBS de composition similaire à celle trouvée durant la maturation de l'OE.

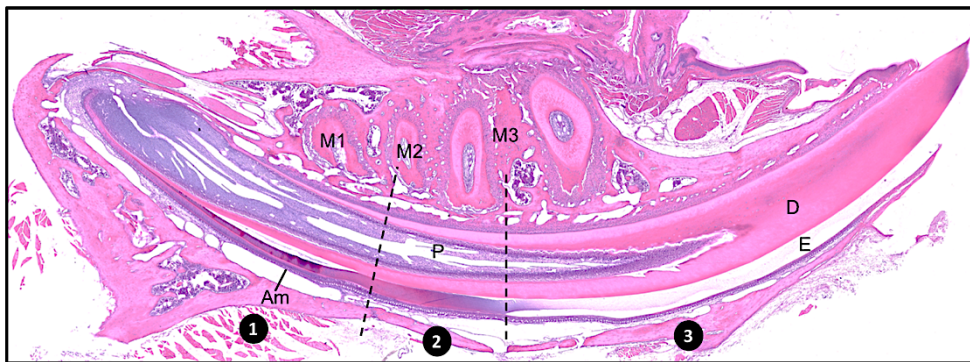


Figure I.1 :
Représentation
histochimique de
l'organe de
l'émail

1 – stade de sécrétion; 2- stade de transition; 3- stade de maturation.

Am = Améloblastes; D= Dentine; E= Émail; M= Molaire; P= Pulpe

I.2 – L'épithélium de jonction

La gencive et l'attache épithéliale se forme au fur et à mesure que la dent fait son éruption dans la cavité buccale. Avant l'éruption, la surface de l'émail est recouverte par un épithélium réduit de l'émail qui est composé d'améloblastes réduits qui sont attachés d'un côté à l'émail et de l'autre aux cellules papillaires du côté du tissu conjonctif (**Fig. I.2**).

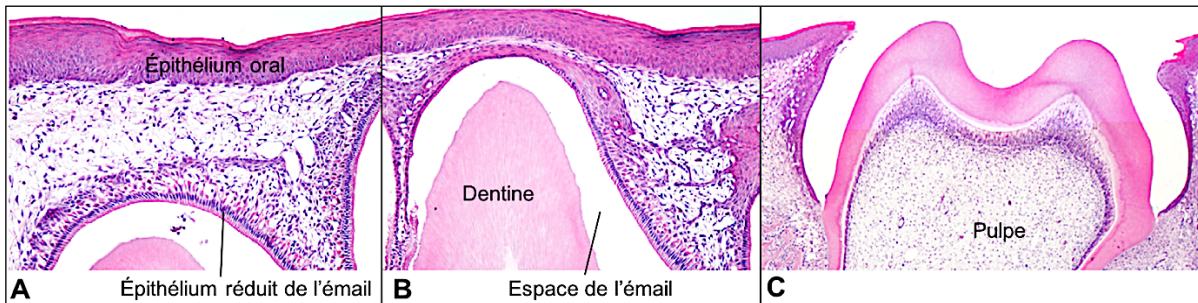


Figure I.2 : Différentes étapes d'une dent en éruption

(A) Une fine couche de tissu conjonctif sépare l'épithélium réduit de l'émail de l'épithélium oral. (B) Lorsque la dent rentre en éruption, cette fine couche est progressivement perdue jusqu'à (C) la fusion des deux épithéliums qui va maintenir une continuité épithéliale et former l'épithélium de jonction autour de la couronne de la dent. Adapté de Nanci, Ten Cate's Oral Histology, 2017 [2].

Lors de l'éruption, la couronne de la dent recouverte de l'épithélium réduit de l'émail s'approche de l'épithélium oral entraînant la fusion des deux épithéliums. Au niveau du site de fusion, une apoptose des cellules donne lieu à un canal tapissé de chaque côté d'épithélium permettant de ne jamais perdre la continuité de l'épithélium pendant et après l'éruption. Cette fusion résulte en la formation de la gencive et de l'EJ. La jonction dento-gingivale (**Fig. I.3**) est alors formée. C'est une adaptation de la muqueuse de la bouche divisée en trois parties : l'épithélium gingival, l'épithélium sulculaire et l'EJ. L'épithélium gingival est un épithélium kératinisé qui tapisse

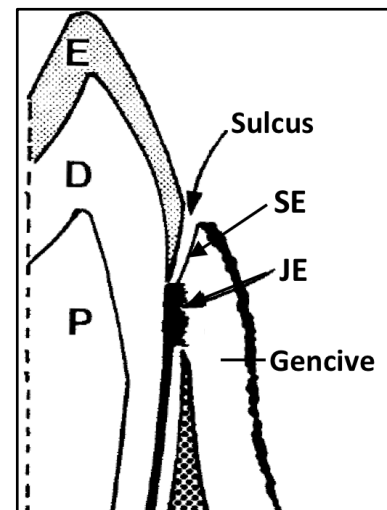


Figure I.3 : Représentation de la jonction dento-gingivale

E= Émail, D= Dentine, P= Pulpe, SE = Épithélium sulculaire, JE = Épithélium de jonction

la partie de la gencive se trouvant du côté du vestibule buccale. Cet épithélium est en continuité avec l'épithélium sulculaire qui lui recouvre la partie interne de la gencive dite libre et qui fait face à la dent délimitant ainsi un espace naturel, le sulcus gingival [1]. Dans cette espace, on retrouve un liquide dit crévicaire. L'épithélium sulculaire est non-kératinisé et consiste en une couche multicellulaire de 15 à 20 cellules au niveau coronaire. Il s'amincit en direction apicale pour devenir l'EJ qui est lui aussi non-kératinisé. Ce dernier est en contact avec la surface minéralisée de la dent et crée une « ventouse » au niveau de la liaison de la racine de la dent avec sa couronne. Cette spécificité unique à un tissu épithélial permet de protéger les tissus parodontaux de l'environnement agressif de la bouche et par conséquent, son intégrité est essentielle pour le maintien de la santé parodontale.

Ce doctorat se concentre donc sur l'étude de l'EJ qui peut être considéré comme la structure la plus intéressante de la gencive. C'est en effet, un épithélium stratifié squameux non-kératinisé possédant de nombreuses caractéristiques uniques. Tout d'abord, l'EJ est un épithélium incomplètement différencié [12]. Il est constitué d'une couche superficielle comprenant deux-trois couches de cellules qui adhèrent fermement à la surface de la dent et d'une couche basale qui fait face au tissu conjonctif gingival (**Fig. I.4**). Les cellules sont plates et orientées parallèlement à la surface de la dent. Malgré le statut cellulaire unique de cet épithélium, il conserve son habilité à se diviser ainsi qu'à se reformer rapidement chez certaines espèces [13]. Les cellules de toutes les couches sont en constante division cellulaire, migrent vers la base du sulcus et desquament, permettant ainsi de régénérer continuellement les cellules de la couche

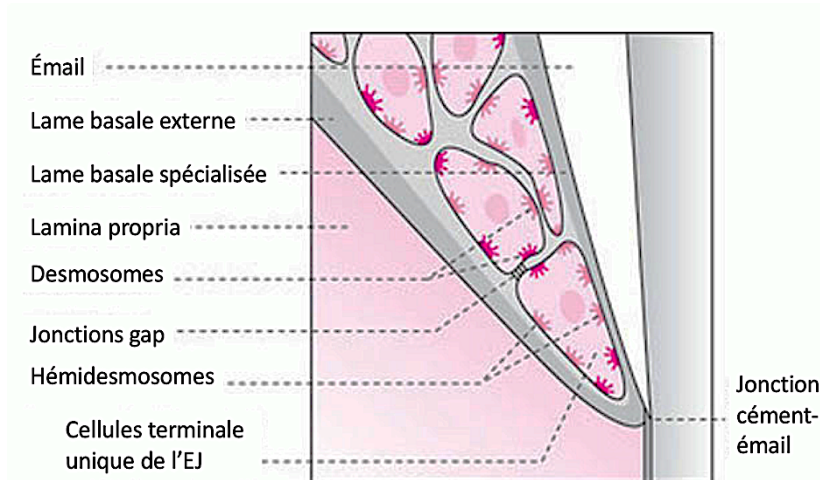


Figure I.4 : Représentation de l'épithélium de jonction (EJ)

Adaptée de pocketdentistry.com

superficielle de l'EJ. En effet, chez l'homme le renouvellement cellulaire de l'EJ est de 4 à 6 jours alors que celui de l'épithélium sulculaire est d'environ 10 jours. C'est en accord avec le fait qu'il est continuellement exposé à plusieurs forces, telles que le brossage des dents ou encore la mastication de nourritures denses, qui peuvent causer des blessures. Grâce à sa capacité de conservation de la division cellulaire, l'EJ peut se reconstituer de lui-même lors de petites blessures. Lors d'opération consistant à enlever chirurgicalement une portion de la gencive, l'EJ a la capacité de se reformer grâce à une repopulation des cellules basales de l'épithélium gingival [14]. La formation d'un tel épithélium venant entourer les implants dentaires pour solidifier l'attachement de la gencive à ces structures, moins bien définies que celle de la dent, conforte le potentiel de l'épithélium gingival pour la formation de l'épithélium de jonction [15]. Cet épithélium est aussi, de façon unique, composé de deux membranes basales (**Fig. I.4**). L'une externe relie les cellules épithéliales au tissu conjonctif sous-jacent alors que la seconde interne, la LBS, fait face à la surface minéralisée de la dent. À la partie la plus apicale de l'épithélium de jonction, ces deux lames basales sont en contact. Les cellules basales reposent sur la LB typique externe qui est similaire à celles qui attachent les différentes structures épithéliales au tissu conjonctif ailleurs dans la muqueuse buccale [1]. Les cellules suprabasales sont aplaties, orientées parallèlement à la surface de la dent et passent d'une épaisseur de 15 à 30 couches coronairement pour atteindre 3 à 4 couches apicalement. Du côté de la dent, on retrouve une lame basale interne unique dite spécialisée puisqu'elle se lie à des surfaces calcifiées plutôt qu'à du tissu conjonctif. Cette structure est maintenue par de nombreuses cellules superficielles aplaties attachées entre elles par des hémidesmosomes.

Cependant sa plus flagrante caractéristique est sa capacité unique d'interagir avec la surface minéralisée de la dent et ainsi d'éviter le passage de toxine/micro-organismes afin de protéger les tissus du parodonte sous-jacents. Cette adhésion spécialisée est due à la LBS qui est caractérisée par sa composition atypique.

I.3 – La lame basale spécialisée

Les LB sont des matrices extracellulaires reliant les cellules épithéliales au tissu conjonctif sous-jacent [16]. Elles ont un rôle de barrière physique, fournissent des limites au tissu conjonctif, permettent un soutien structural, influencent l'organisation cellulaire et servent de médiateur à la signalisation intracellulaire [17]. Elles sont typiquement composées de collagène de types IV et VII, de protéoglycanes et de glycoprotéines telles que les laminines [18]. Cette organisation moléculaire semble commune à toutes les LB des épithéliums exceptés pour la lame basale spécialisée (LBS) de l'EJ.

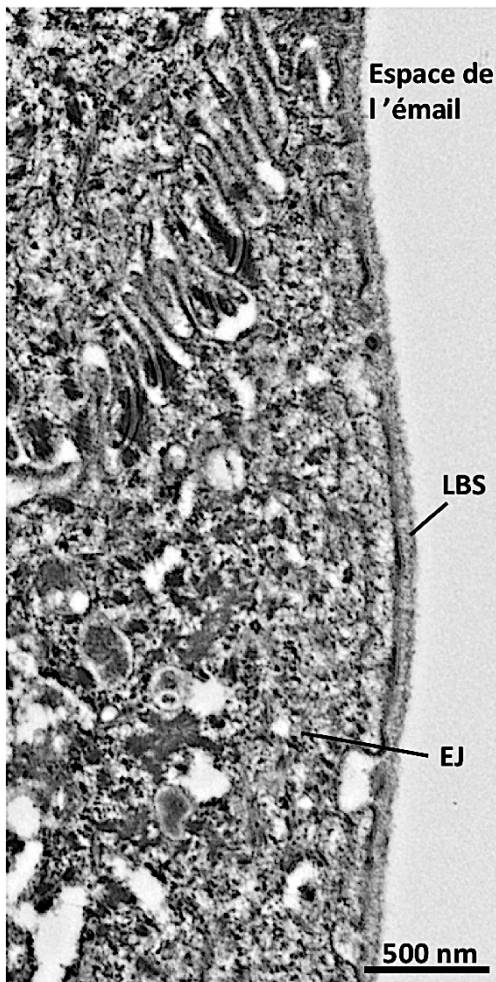


Figure I.5 : Observation par microscopie électronique à transmission de la lame basale spécialisée (LBS).

EJ = Épithélium de jonction

Au niveau de la dent, une LBS lie les cellules épithéliales aux surfaces minéralisées plutôt qu'au tissu conjonctif, créant ainsi des environnements isolés de l'environnement oral agressif qui sont critiques pour la minéralisation ainsi que pour la protection des tissus de soutien dentaire [19] (**Fig I.5**). Cette adhésion unique à du minéral nécessite donc des constituants spécialisés, puisque les composants que l'on retrouve normalement dans les LB ne sont pas retrouvés au sein de la LBS excepté pour la Lam332 [4, 20, 21].

Des approches génomiques permettant de cribler le sécrétome ont été utilisées afin d'identifier les protéines produites par les améloblastes [5], c'est-à-dire les cellules formant l'émail de la dent. Le sécrétome correspond à l'étude des protéines qui sont produites par la cellule puis expulsées dans le milieu extracellulaire par le processus de sécrétion. Ce large criblage du sécrétome de l'OE a permis l'identification de nouvelles protéines de sécrétion - Amelotin (AMTN) [5, 7, 22], Odontogenic

associated-ameloblast (ODAM) [6] et Secretory calcium-binding phosphoprotein proline-glutamine rich 1 (SCPPPQ1) [8]– qui n'étaient alors pas annotées dans le génome. Elles font également partie de la grande famille des protéines provenant du regroupement de gènes « *Secretory calcium-binding phosphoprotein* » (*Scpp*).

I.3.1 – Groupe de gènes *Scpp*

Les protéines appartenant au regroupement de gènes *Scpp* ont pour origine le gène ancestral *Sparc11* (« *Secreted protein, acidic, cysteine-rich like 1* ») lui-même dérivant initialement de *Sparc* [23]. La protéine SPARC est considérée comme un régulateur de la calcification, en plus d'être impliquée dans les changements de morphologie de cellules et dans la synthèse de matrice extracellulaire [24]. On peut aussi associer SPARC avec la prolifération de tumeurs [25]. Les gènes codant pour les SCPPs sont séparés en deux catégories, l'une donnant des protéines très acides alors que l'autre génère des protéines riches en proline (Pro) et glutamine (Gln). Les SCPPs acides auraient un rôle dans la minéralisation des matrices de collagènes alors que celles riches en Pro et Gln seraient associées avec la formation de la surface de la dent. Les protéines SCPPs sont principalement retrouvées au niveau des structures de la dent (dentine, émail et os) mais elles sont aussi présentes dans le lait et dans la salive [26, 27]. Elles sont reconnues pour stabiliser les ions de calcium et de phosphates et guider de façon structurée la déposition de sels minéraux dans les tissus calcifiés [28].

Chez l'homme, 22 gènes *Scpp* sont localisés sur le chromosome 4q [26] formant deux larges régions. La première région 4q21 comprend le groupe des gènes reliés à la dentine et l'os, alors que la seconde région 4q13 correspond aux gènes codant les protéines associées à l'émail qui incluent les trois protéines récemment découvertes par le groupe – AMTN, ODA1 et SCPPPQ1 – et qui font l'objet de cette thèse [6-8]. La composition en acides aminés de ces protéines fait qu'elles possèdent des structures ouvertes et flexibles [29]. Malheureusement, ces protéines ne possèdent aucun homologue ni de motifs avec les protéines actuellement connues, excepté pour le peptide signal qui est utilisé pour sécréter la protéine mature dans le milieu extracellulaire.

I.3.2 - AMTN

AMTN, connu sous le nom « Amelotin », est une protéine uniquement associée avec la LBS mais qui pourrait également avoir un lien avec la minéralisation de la dent [30].

I.3.2.1 – Le gène codant pour AMTN

Le gène *Eo-017*, codant pour la protéine AMTN, a été découvert en 2005 lors de l'étude du criblage de l'OE chez le rat par l'équipe du Dr Nanci [5]. Ce même gène a été identifié par l'équipe du Dr Ganss au même moment en utilisant une PCR « Differential Display » sur différents tissus du parodonte chez la souris [22]. Ainsi, *Eo-017*, aussi connu sous le nom *Amtn*, est composé de 9 exons et de 8 introns. Cette organisation est conservée entre l'homme et la souris. Chez la souris, on retrouve le gène sur le chromosome 15 alors que chez l'humain il est présent dans le groupe de gènes des *Scpp*, c'est-à-dire sur le chromosome 4 en position q13. Plusieurs études concernant l'évolution du gène codant pour AMTN ont montré une importante conservation chez les mammifères les dernières 220 millions d'années [31]. Cependant, des variations sont observées au niveau des gènes des non-mammifères [32] où deux transcrits de taille plus importante sont retrouvés, en plus de celui présent chez les mammifères. Le plus grand transcrit comporte un exon supplémentaire nommé 2b ainsi qu'un exon 8 contenant un motif RGD et le second transcrit a perdu l'exon 2b. Le transcrit sélectionné et conservé chez les mammifères n'a ni exon 2b ni exon 8, l'exon 8 ayant été perdu par épissage alternatif [33].

I.3.2.2 – Caractéristiques physicochimiques

AMTN est une protéine de 209 acides aminés chez l'humain pour un poids moléculaire de 21,6 kDa et un point isoélectrique de 5,4. La séquence murine, homologue à hauteur de 60 %, possède 213 acides aminés résultant en une protéine de 22,1 kDa. Une étude de comparaison de séquence utilisant l'outil « Blast » a montré la conservation d'AMTN chez les mammifères possédant une similarité moyenne de 50 %. La plus grande similarité est entre l'humain, le singe et le macaque. Le signal peptide est très bien conservé à travers les espèces [7]. Ce sont des séquences riches en proline, glutamine, leucine et thréonine, ce qui représentent la moitié de leur poids alors qu'elles ne possèdent pas de résidus cystéine. Une étude de prédiction des modifications post-traductionnelles révèlent la présence d'un site de phosphorylation par la CK2 sur le résidu Ser

115 de la séquence consensus SXXE [7]. Ce site est également très bien conservé entre les espèces. On note aussi de nombreux sites potentiels de O-glycosylation mais un seul de N-glycosylation [7]. Cette capacité à être modifiée post-traductionnellement a été confirmée après des essais de transfection transitoire dans des cellules HEK293. De manière intéressante et d'après des études d'immunobavardage, 48 h après la transfection, la protéine était retrouvée dans le milieu extracellulaire mais rien n'était décelable dans les extraits cellulaires. La protéine sécrétée possédait un poids moléculaire d'environ 37 kDa, c'est-à-dire 10 à 15 kDa de plus que la version procaryote à environ 22 kDa.

I.3.2.3 – Profil d'expression

Des différents tissus du parodonte testés *dans Iwasaki K et al.* [22], l'expression du gène se fait seulement dans les améloblastes d'incisive de souris âgés de 10 jours. Une étude plus détaillée de l'expression des ARNs messager au niveau des molaires en développement et des incisives ont montré une expression seulement dans l'étape de maturation dans les dents en développement. *Moffatt et al.* a confirmé l'observation d'une expression importante dans les mandibules ainsi qu'au cours de l'étape de maturation de l'OE dans des tissus de souris [7].

I.3.2.4 – Localisation

Un peptide « GG₁₄₃QTGAKPDVQNGALPTRQ₁₆₀GGC », correspondant aux résidus 143 à 160 de la séquence d'AMTN de rat, a été synthétisé puis injecté dans un lapin afin de produire des anticorps. Cela a permis des études de localisation par immunofluorescence, immunohistochimie mais a aussi permis d'évaluer la présence et la pureté de la protéine lors de diverses études de production de la protéine procaryote ou eucaryotes.

La protéine a été localisée par hybridation *in situ* le long de la zone de maturation de l'OE [22]. Une microscopie en utilisant un marquage fluorescent a ensuite permis de montrer plus précisément que l'expression de la protéine débute au niveau de l'appareil de Golgi lors de l'étape de post-sécrétion/transition des améloblastes [34]. Ce marquage golgien est encore présent au début de la maturation puis disparaît par la suite pour laisser place à un important marquage à l'interface entre les améloblastes et la surface minéralisée de la dent [7]. En d'autres mots, la production transitoire de la protéine débute à la fin de la zone de sécrétion jusqu'au

début de la maturation. La protéine mature est sécrétée et va se localiser au niveau de la LBS dès l'étape de transition et jusqu'à la fin de la maturation (**Fig. I.6**). D'ailleurs plus on avance dans l'étape de maturation, plus l'intensité du marquage est importante. *Moffatt et al.* a également montré la présence de la protéine le long de l'EJ de molaires. Ces observations ont été faites chez le rat et la souris. Toutes ces observations ont été confirmées par un immunomarquage utilisant des billes d'or et une observation soit en microscopie électronique à balayage [7] soit à transmission [35], où l'on peut constater avec plus de précision, la présence d'AMTN au sein de la LBS soit de l'OE soit de l'EJ (**Fig. I.6**). Il est intéressant de préciser que bien qu'il y a une importante présence de la protéine au sein de la LBS de l'EJ par des études d'immunofluorescence ou d'immunomarquage par billes d'or, des études d'hybridation *in situ* ne révèlent aucun marquage de l'ARNm d'AMTN au sein de l'EJ [21]. D'après sa localisation, de récentes études mettent en avant un rôle d'AMTN dans la minéralisation et plus précisément dans l'expansion de l'émail [30, 36], chose que nous débattons plus en détail dans la discussion.

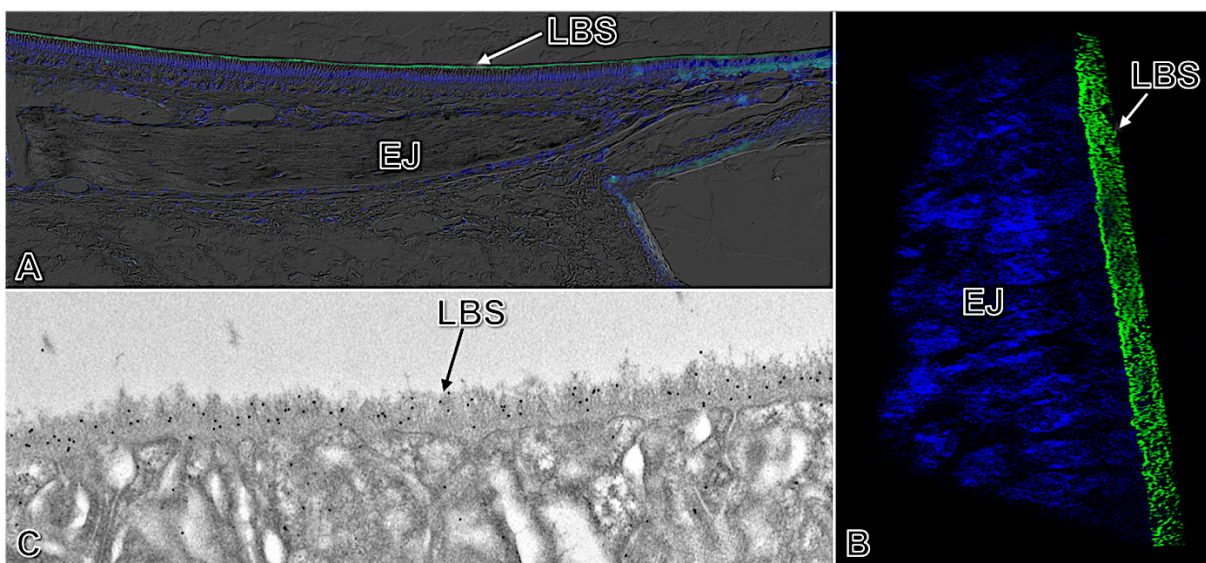


Figure I.6 : Expériences d'immunolocalisation d'AMTN

Localisation de la protéine (en vert) par immunofluorescence couplée au DIC durant l'étape de maturation (**A**) et au niveau de l'épithélium de jonction (EJ) en utilisant la méthode SR-SIM (**B**). L'immunomarquage avec des billes d'or (**C**) de la zone de maturation permet d'observer avec précision la localisation de la protéine au sein de la lame basale spécialisée (LBS).

I.3.3 – Laminine-332

I.3.3.1 – Les gènes codant pour Lam332

Avec le collagène, les laminines sont des constituants essentiels des LB. Les laminines ont pour la première fois été identifiées par l'équipe du Dr Timpl en 1978 comme des glycoprotéines de haut poids moléculaire consistant en au moins deux chaînes polypeptidiques [37]. Par la suite, il a été mis en avant que les laminines sont des hétérotrimères en forme de croix composées de chaînes nommées α , β et γ [38]. Chacune des chaînes est codée par un gène distinct et mène à la génération de plusieurs isoformes de la laminine puisque l'on retrouve 5 sous-unités différentes pour la chaîne α , 3 pour la β , et 3 pour la γ . Pour ce projet de thèse nous nous concentrons sur l'étude de la Lam332 (aussi appelée Laminine-5), c'est-à-dire une laminine composée d'une chaîne α_3 , une β_3 et une γ_2 [38]. Ces chaînes sont codées par les gènes *LAMA3*, présent sur le chromosome 8 chez l'humain, et *LAMB3* et *LAMC2*, tous les deux présents sur le chromosome 1 chez l'humain. Une fois chaque chaîne produite, elles sont sécrétées soit par les cellules épithéliales pour la chaîne α soit par les cellules conjonctives pour les deux autres.

I.3.3.2 – Caractéristiques physicochimiques

De manière générale, une fois les chaînes produites et sécrétées, lorsqu'elles se retrouvent à proximité les unes des autres, elles s'entrecroisent et se lient par des ponts disulfures formant ainsi le fameux hétérotrimère en forme de croix (**Figure I.7**). La Lam332 est unique puisque les chaînes β_3 et γ_2 sont seulement présentes dans cette isoforme et les bras qui la composent sont plus courts et certains domaines de liaisons sont absents (**Figure I.7**). En effet, l'hétérotrimère est initialement de 460 kDa mais dès sa sécrétion les chaînes α_3 et γ_2 sont partiellement clivées menant à un complexe final de 400 kDa. Le domaine LG3 de la chaîne α_3 de la Lam332 [39] fixe la portion externe des intégrines $\alpha_6\beta_4$ sur les bords des cellules et sur les collagènes de type VII qui quant à eux ancrent les fibrilles sur le tissu conjonctif adjacent. Les chaînes β_3 [40] et γ_2 [41] ainsi que le domaine LG4-5 de la chaîne α_3 [42] contiennent quant à eux des sites nécessaires pour l'assemblage du réseau extracellulaire des Lam332.

Les laminines sont reconnues pour être des protéines très glycosylées, principalement par des N-glycosylations, puisque les sucres peuvent représenter jusqu'à 1/3 de leur poids moléculaire

[43]. La N-glycosylation de la Lam332 apparait cruciale dans la régulation de fonctions biologiques telles que l'adhésion, la migration et la diffusion cellulaire [44].

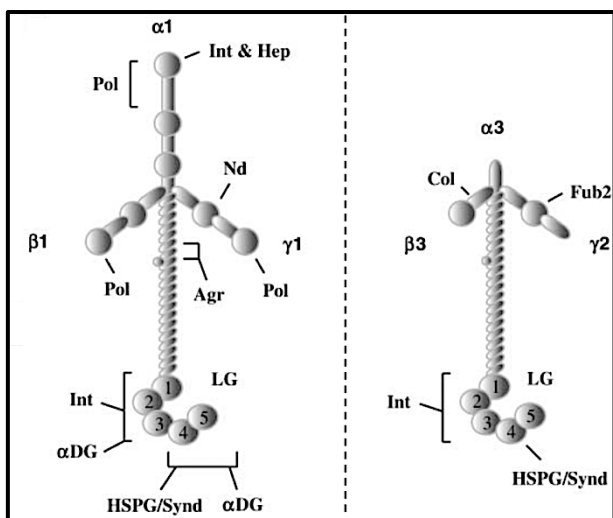


Figure I.7 : Comparaison de deux isoformes de laminines

On observe que les chaînes de la Lam332 (à droite) ont été tronquées comparé à la Lam111 (à gauche) résultant en un hétérotrimère de plus petite taille.

Adapté de *Miyazaki et al.* [38]

I.3.3.3 – Localisation

Comme nous l'avons mentionné auparavant, la LBS se distingue des LB typiques de par sa composition atypique. En effet, celle-ci est enrichie en Lam332 mais ne contient ni les laminines contenant la chaîne $\gamma1$, ni de collagène de type IV ou VII. La Lam332 n'est pas uniquement présente au sein de la LBS puisque c'est également un composant important des LB de l'épiderme [37]. Dans le contexte de l'OE, la Lam332 est impliquée dans la différenciation des améloblastes durant l'étape de pré-sécrétion [45] mais aucune étude ne montrait le rôle de la protéine durant la maturation, ce qui sera discuté dans le premier article présenté dans cette thèse. La présence d'ARNm spécifique à la production de la chaîne $\gamma2$ de la Lam332 a été récemment observée au sein de l'EJ [21]. On peut y observer un marquage plus important à la partie coronaire de l'EJ.

I.3.4 – ODAM

La protéine « Odontogenic ameloblast-associated », abrégée ODAM, est une protéine que l'on retrouve au sein de la LBS mais qui aurait également un rôle dans le statut cellulaire particulier de l'EJ.

I.3.4.1 – Le gène codant pour ODAM

Le gène *Eo-009*, codant pour ODAM, a été identifié lors de l'étude du sécrétome de l'OE chez le rat [5]. Ce gène a une taille de 9kb et comporte 12 exons. Il fait, comme ceux codant pour ces deux protéines sœurs AMTN et SCPPPQ1, parti du groupe *Scpp* et partage ainsi des caractéristiques communes aux gènes de la même famille telles que la présence du site de phosphorylation SXE à la fin de l'exon 3. Le gène est très conservé entre les espèces mais il est possible de voir un épissage de l'exon 2 chez l'humain résultant en l'absence des acides aminés 18 à 31 de la protéine mature entière. Les comparaisons de séquences d'ODAM entre espèces ont permis d'observer un haut degré de conservation d'ODAM chez les mammifères.

I.3.4.2 – Caractéristiques physicochimiques

Le gène *Eo-009* code pour la protéine mature ODAM qui possède un point isoélectrique négatif de 4,5 et trois acides aminés - Glutamine > Proline > Leucine - représentent environ 40% du poids de la protéine. Les modifications post-traductionnelles prédites comprennent de nombreux sites de O-glycosylation et plusieurs sites de phosphorylation (Ser / Thr / Tyr). Le comportement migratoire d'ODAM sur gels SDS- PAGE comparant les protéines recombinantes de systèmes bactériens à des extraits de cultures cellulaires ou d'échantillons d'OE entiers montre des différences de 15-20 kDa (**Figure I.8**) [6], ceci confirmant que la protéine dans son état natif produite en système mammalien possède plusieurs modifications post-traductionnelles [6]. Au cours de l'évolution, ODAM est restée conservée et une comparaison de séquence montre une importante similarité entre les espèces (par exemple 72% entre le rat et l'humain, 87% entre la souris et le rat). Les comparaisons de séquences ont mis aussi en avant que la portion d'ODAM correspondant aux résidus 127 à 279 correspond à une protéine humaine de 153 acides aminés préalablement découverte et nommée APin que l'on retrouve associée aux tumeurs de Pindborg [46]. Les tumeurs de Pindborg sont des tumeurs odontogènes épithéliales calcifiantes que l'on

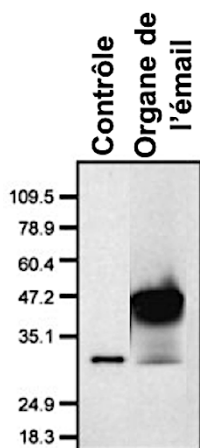


Figure I.8 : Comparaison du poids moléculaire d'ODAM

On observe une différence d'environ 15kDa entre ODAM recombinant et d'ODAM provenant de l'organe de l'émail [5]

retrouve essentiellement au niveau de la mandibule lorsqu'une dent n'a pas fait éruption ou qu'une dent incluse est recouverte d'os. Ce sont des tumeurs bénignes mais qui peuvent être localement invasives lorsqu'elles croissent. Ces tumeurs restent rares car elles ne touchent que 4 personnes mondialement par an et

représentent moins de 1% des tumeurs odontogènes. Il est cependant intéressant de noter le potentiel amyloïdique de ces tumeurs et que les 153 résidus d'APin seraient les précurseurs de ces plaques amyloïdes [47]. Amélogénine, une autre protéine du regroupement *Scpp*, est également connue pour avoir un potentiel à former des plaques amyloïdes [48]. Durant les premières années suite à la découverte d'ODAM et donc la séquence entière de 279 acides aminés, certaines études utilisaient encore la nomenclature d'APin pour parler d'ODAM, ce qui apportait des confusions. Il a ensuite été clarifié qu'ODAM correspond à la chaîne protéique de 279 résidus alors qu'APin correspond à celle de 153 acides aminés.

I.3.4.3 – Profil d'expression

Le niveau d'expression du gène *Eo-009* est le plus élevé dans l'OE et de l'EJ [47, 49]. Plus particulièrement, on observe une expression du gène *Eo-009* au niveau de la zone de maturation de l'OE. Des études de « Reverse Transcriptase-PCR » et « Northern-blot » montrent l'expression du gène également dans d'autres tissus tels que les glandes salivaires ou nasales mais à des niveaux beaucoup plus faibles. D'autres études basées sur des approches transcriptomiques ont isolé des fragments de l'ADN complémentaire de la protéine ODAM ou des fragments d'APin au niveau des glandes lacrymales [50], de la langue [51] et de la dent [52, 53]. Par contre, nous retrouvons une surexpression du gène *Eo-009* dans de nombreux cancers épithéliaux dont les tissus d'origine ne produisent pas la protéine [11, 54]. D'ailleurs, il est important de mettre en avant que le gène codant pour APin, « *FLJ20513* » qui était inconnu à l'époque, a été identifié dans les cellules KATO III qui sont des cellules cancéreuses gastriques [55]. Suite à une gingivectomie, l'expression d'ODAM apparaît très tôt durant la régénération

de l'EJ comparée à ses deux protéines sœurs, suggérant un rôle d'ODAM dans la formation de l'EJ et dans le maintien de l'intégrité parodontale [14].

I.3.4.4 – Localisation

Des études d'expression d'ODAM dans différentes lignées cellulaires montrent un marquage golgien de la protéine au sein de la cellule [6, 47]. La protéine est aussi détectée par immunobuvardage dans le milieu de culture des cellules transfectées (HEK293, HeLa, et ALC), excepté lors d'un traitement à la Brefeldin A qui est un composé reconnu pour inhiber la sécrétion [47]. Ainsi, l'ensemble de ces données confirme qu'ODAM est une protéine sécrétée par un peptide signal.

Park et al. ont été les premiers à localiser ODA M, alors encore appelée APin, au sein de l'OE et de l'EJ par des études d'immunohistochimie [47]. Ils ont montré un léger marquage de la protéine à la fin de la zone de sécrétion et un marquage plus important dans les zones de transition et maturation. Un marquage équivalent à celui observé dans la zone de maturation est visible au sein de l'EJ. L'étude de l'ARNm corrèle avec les données observées [47]. Par la suite des études d'immunofluorescence ont apporté plus de détails quant à la localisation de la protéine à travers l'OE [6]. On observe un marquage golgien dans la zone de post-sécrétion/transition avec un début de marquage au niveau de la LBS. Plus on avance dans la maturation, plus le marquage de la LBS s'intensifie mais on conserve toujours un marquage au sein des cellules (**Figure I.9**). En comparaison avec AMTN et SCPPPQ1, ODA M est la seule des trois protéines nouvellement identifiées à avoir une présence au sein de la cellule en plus de sa présence au sein de la LBS. Ceci a aussi été visualisé par microscopie électronique avec plus de détails, où l'on voit un marquage par billes d'or au niveau des cellules et de la LBS [35] (**Figure I.9**). D'ailleurs dans le second article présenté dans cette thèse [9], nous avons mis en avant le fait qu'ODAM a une présence plus importante du côté de la cellule alors qu'AMTN et SCPPPQ1 se trouvent plus du côté de la dent. Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, ODA M est visible en grande quantité au début de la régénération de l'EJ suite à une gingivectomie [14], ou suite à des mouvements orthodontiques de la dent [56]. Suite à une gingivectomie, on retrouve une expression importante d'ODAM au sein des restes épithéliaux de Malassez (REM) qui sont des résidus de la membrane d'Hertwig se trouvant au

sein du ligament périodontaire et qui seraient activés lors de la régénération ou la guérison des tissus du parodonte [57].

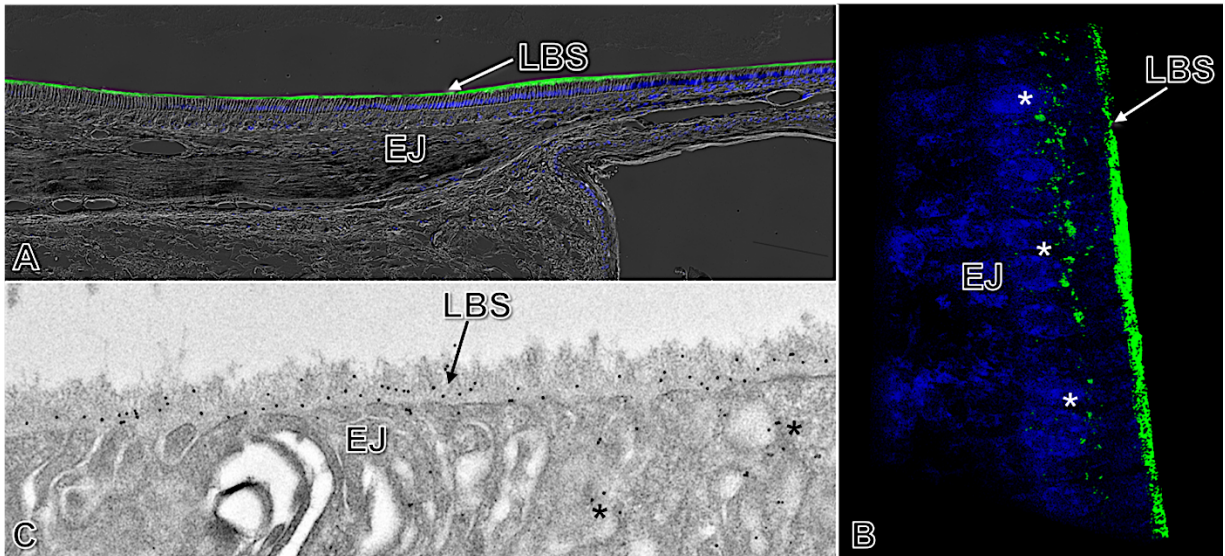


Figure I.9: Expériences d'immunolocalisation d'ODAM

Localisation de la protéine (en vert) par immunofluorescence couplée au DIC durant l'étape de maturation (A) et au niveau de l'épithélium de jonction (EJ) en utilisant la méthode SR-SIM (B). L'immunomarquage avec des billes d'or (C) de la zone de maturation permet d'observer avec précision la localisation de la protéine au sein de la lame basale spécialisée (LBS). La protéine est localisée également au niveau des cellules (*).

I.3.5 – SCPPPQ1

SCPPPQ1, aussi connue sous le nom « Secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1 », est la protéine la moins caractérisée parmi les constituants de la LBS.

I.3.5.1 – Le gène codant pour SCPPPQ1

Le gène *Eo-463*, codant pour SCPPPQ1, a été identifié en 2005 lors de l'étude du sécrétome de l'OE [5] et la caractérisation du gène et de la protéine associée a été faite par le groupe du Dr Nanci en 2014 [8]. Chez le rat, le gène *Eo-463* se trouve sur le chromosome 14 dans le groupe de gène *Scpp* et il est à proximité du gène *Sparcl1*. Il est composé de 10 exons pour une taille

totale d'environ 9 kb. À partir des séquences d'ADN complémentaire déduites du rat ou de l'humain, des études utilisant l'outil « Blast » ont permis de rechercher les séquences similaires chez les génomes de mammifère. Cet alignement a permis de montrer une conservation de la séquence de la protéine à travers les espèces puisque la similarité de séquence est de 68% entre le rat et l'humain mais est aussi de 94 % entre la souris et le rat.

I.3.5.2 – Caractéristique physicochimique

La séquence de la protéine est composée de 87 à 95 résidus dépendamment des espèces et comprend un peptide signal clivable de 15 acides aminés. C'est une petite protéine d'environ 9 kDa qui est considérée acide due à son point isoélectrique d'approximativement 6. Sa structure, comme son nom l'indique, contient 20 % de proline, 17 % de leucine, 12 % de glutamine et 10 % de phénylalanine. Malheureusement, l'absence actuelle d'homologue ou de la présence de motifs retrouvés dans d'autres molécules ne permet pas de déterminer une structure secondaire fiable. Cependant, SCPPPQ1 est prédit comme étant une molécule hydrophobe et contenant principalement une structure « random coil ».

I.3.5.3 – Profil d'expression

Une expérience d'immunobuvardage de type « Northern blot » a permis de déterminer l'expression du gène *Eo-463* par la détection de transcrit d'ARN à travers différents tissus de rat. De tous les tissus testés, l'expression de *Eo-463* est seulement visible au niveau de la mandibule, de la gencive et de l'OE. Ce dernier étant globalement divisé en deux parties, la sécrétion et la maturation, des études plus poussées de réaction de polymérisation en chaînes quantitative (qPCR) et d'immunobuvardage de type « Northern blot » ont permis d'établir que l'expression de *Eo-463* se fait uniquement au niveau de la zone de maturation de l'OE [8]. Plus précisément, l'expression est à son plus haut niveau dans la zone dite tardive de la maturation alors qu'elle est environ 20 fois moins importante dans les zones dite précoce et centrale [8].

I.3.5.4 – Localisation

Les études de localisation n'auraient pas été possibles sans la génération d'anticorps ciblant spécifiquement la protéine [8]. Pour cela, une version procaryote de SCPPPQ1 a été produite et purifiée grâce à la fusion d'une étiquette comportant six histidines à la partie N-terminale de la

protéine. La protéine a été purifiée par colonne de chromatographie d'affinité comportant des billes de nickel et une fois la pureté de celle-ci évaluée à plus de 95% par une coloration Coomassie d'un gel SDS, la protéine a été utilisée comme immunogène chez le lapin pour la production d'anticorps. L'efficacité de ces derniers ont été testés par immunobuvardage ainsi que par immunomarquage en immunofluorescence de cellules HEK293 qui surexprimaient la protéine SCPPPQ1 de rat suite à une transfection transitoire. Cette dernière expérience a mis en avant un marquage au niveau de l'appareil de Golgi dans les cellules, suggérant l'utilisation d'une voie de sécrétion de la protéine.

Comme attendu suite aux études d'expression, des études immunohistochimiques ont permis de détecter une faible présence de la protéine dans la dernière portion de la zone centrale de la maturation entre les améloblastes et la surface minéralisée des dents de l'OE de rat [8]. Le marquage devient plus important lorsque la maturation progresse. Une immunohistochimie similaire a été réalisée sur des embryons de souris et sur les deuxième et troisième molaires en développement chez des rats d'une semaine. Aucun marquage n'a été observé ce qui était attendu puisque pour de tels animaux l'amélogénèse n'était qu'au stade de sécrétion. Seule la première molaire, qui elle débutait l'étape de maturation, a un léger marquage qui est décelable. Enfin, une fois que la dent a fait éruption, un marquage le long de l'EJ est présent à l'interface entre les cellules épithéliales et la surface minéralisée de la dent, là où se trouve la LBS.

Pour obtenir plus de détails, des immunomarquages utilisant des billes d'or ou des anticorps secondaires fluorescent ont été utilisés (**Fig. I.10**). Ceci permet d'observer une localisation précise des protéines en utilisant la microscopie électronique à transmission (MET) ou de fluorescence [9]. La protéine est ainsi présente au sein de la LBS de tissus provenant de l'OE (étape de maturation) ou de l'EJ de rat. Au sein du laboratoire, de nombreuses visualisations en microscopie conventionnelle, de fluorescence ou électronique à transmission ont permis de confirmer ces visualisations et ont amené à des figures qui sont présentes dans les deux premières publications associées à cette thèse [9, 58].

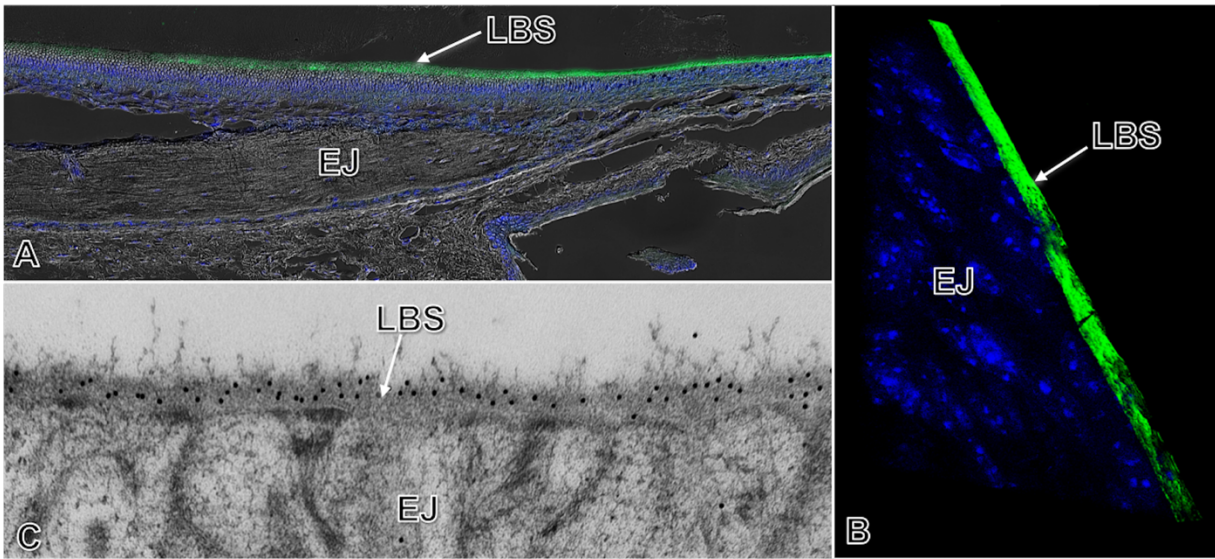


Figure I.10: Expériences d'immunolocalisation de SCPPPQ1

Localisation de la protéine (en vert) par immunofluorescence couplée au DIC durant l'étape de maturation (A) et au niveau de l'épithélium de jonction (EJ) en utilisant la méthode SR-SIM (B). L'immunomarquage avec des billes d'or (C) de la zone de maturation permet d'observer avec précision la localisation de la protéine au sein de la lame basale spécialisée (LBS).

I.4 – Rôles des protéines

I.4.1 - Dans des animaux transgéniques

Les animaux transgéniques sont très utilisés afin de déterminer le rôle d'une protéine. Des animaux sont générés afin de sur-exprimer ou au contraire d'être déficient en une protéine cible. Par la suite, une évaluation des changements phénotypiques est réalisée afin de définir le rôle d'une protéine. Plusieurs animaux ont été générés pour l'étude des protéines que nous étudions, excepté pour SCPPP1.

I.4.1.1 – AMTN

Suite à la découverte d'AMTN, des souris transgéniques ont été générées afin d'évaluer le rôle de la protéine. La première souris transgénique a été produite pour surexprimer AMTN sous le contrôle du promoteur de l'amélogénine (*Amel*) [59]. Cette étude met en avant que la

surexpression d'AMTN entraîne des défauts dans la microstructure de l'émail de la dent, faisant varier l'organisation des cristaux d'hydroxyapatite. Aucun effet n'est visible au sein de la structuration de la LBS [59].

Par la suite, un « Knock-Out » (KO) d'AMTN a été généré [60] cependant celui-ci est remis en question concernant les données sur la minéralisation qui ne sont pas significatives [61]. Le « KO » consiste en l'invalidation d'un gène dans un modèle transgénique afin de comprendre le rôle d'un gène spécifique ainsi que celui de la protéine qui lui est associé. Aucun phénotype n'a été observé au niveau de la LBS, ni pour les molaires et les incisives du maxillaire qui paraissent avoir un émail normal. Seules les incisives des mandibules semblent avoir un retard dans la minéralisation de surface et l'émail à la pointe de l'incisive a tendance à s'effriter facilement [60]. Une étude complémentaire d'un animal déficient en AMTN et en KLK4 (une protéase produite pendant les étapes de transition et de maturation des améloblastes et ayant un rôle dans la dégradation des protéines de l'émail [62]) montre que ces protéines semblent uniquement importantes lors de la maturation de l'émail [63], KLK4 ayant pour rôle de contrôler et supprimer les protéines extracellulaires alors qu'AMTN aurait un rôle dans le dépôt d'ions CaPO_4 pour l'expansion en épaisseur de l'émail.

I.4.1.2 – Laminine-332

La suppression d'une des chaînes de la Lam332 mène à des effets majeurs dans le développement de l'animal résultant en son décès prématuré. En effet, l'ablation du gène *LAMA3* génère des cloques similaires à l'épidermolyse bulleuse (EB) chez l'humain [64]. L'EB est un désordre fragilisant la peau qui peut être causé par une déficience de Lam332 et dans 80% des cas le gène *LAMB3* est affecté [65]. Le même phénotype a été visualisé lors de la suppression du gène *LAMC2* dans un modèle murin [66]. Un animal doublement transgénique, où la chaîne $\gamma 2$ humaine inductible par la Doxycycline (Dox) remplace la chaîne $\gamma 2$ de la Lam332 de souris, a été développé pour étudier l'effet de cette chaîne sans avoir de phénotype létal pour l'animal [67]. Cependant, même si aucun phénotype n'est visible pour les tissus épithéliaux, l'animal présente d'important défauts au niveau de l'EJ, comme nous le montrons dans le premier article présenté dans cette thèse [58].

I.4.1.3 – ODAM

Notre équipe a entrepris des études de « KO » d'ODAM sur des colonies de souris [68]. Ainsi, l'absence totale de transcription et d'immunomarquage d'ODAM dans l'EJ de souris « KO » valide que le gène a été inactivé fonctionnellement et qu'aucune protéine ODAM n'est produite. L'absence de la protéine n'affecte ni l'organisation cellulaire ni l'intégrité de l'émail. Bien que l'EJ apparait normal dans de jeunes animaux, l'histologie d'animaux vieillissant exhibe de multiples similarités à celle de la jonction dento-gingivale de patients atteints de maladies parodontales [69]. En effet, on observe un décollement de la jonction dento-gingivale, l'épithélium normalement non-kératinisé devient partiellement parakératinisé empêchant l'adhérence à la surface de la dent, l'EJ migre apicalement et il y a une infiltration en grand nombre de leucocytes mononucléaires au sein de l'épithélium [68]. Ces derniers descendent le long de la racine et le résultat de l'infection mime l'état de la maladie parodontale. Au niveau de la LBS, nous observons qu'elle est inégale puisqu'elle est absente dans certaines zones et là où elle est présente, elle semble plus épaisse vis-à-vis des mesures préliminaires qui avaient été obtenues sur des animaux sauvages [68]. Ainsi, ces données indiquent que l'absence de la protéine ODAM cause des changements structurels qui confortent notre hypothèse centrale qu'ODAM est nécessaire à l'intégrité de l'épithélium de jonction et confirme son possible rôle dans la maladie parodontale.

I.4.2 - Dans la maladie

Au travers des études concernant les protéines de la LBS, celles-ci ont montré une implication d'AMTN et d'ODAM dans différentes maladies, comme nous l'avons légèrement mentionné auparavant. Cependant, aucune étude n'a pu déterminer de phénotype menant à une maladie pour SCPPPQ1. Aussi, les maladies associées à Lam332 sont principalement des défauts de l'épiderme tels que l'EB que nous avons définis dans le paragraphe précédent.

I.4.2.1 – AMTN

D'après des études concernant l'évolution du gène ou d'une famille de Costaricains présentant une hypominéralisation, il se pourrait que le gène d'AMTN soit un candidat pour l'amélogénèse imparfaite (AI) [31, 70]. L'AI est une anomalie du développement, affectant la structure et

l'apparence de l'émail de l'ensemble des dents, liée à plusieurs facteurs génétiques [71]. Cependant, aucune preuve matérielle n'associe ce gène à l'AI et les nombreux candidats potentiels à cette dégénérescence déjà répertoriée ne représentent seulement que 50% des cas de l'AI [72]. On peut aussi voir AMTN associée à quelques tumeurs odontogènes adénomatoïdes ou plus rarement à des tumeurs odontogènes épithéliales calcifiantes (TOEC) comme c'est le cas pour ODAM [73]. Dans les deux cas ce sont des tumeurs bénignes qui proviennent de dents qui n'ont pas fait éruption et possédant ainsi des résidus de la LBS de l'OE.

I.4.2.2 –ODAM

Des études réalisées en 2003 sur la calcification et le dépôt d'amyloïdes ont permis de caractériser des TOECs, aussi connus sous le nom de tumeurs de Pindborg [46]. Des études morphologiques ont montré un dépôt dont l'ultrastructure a les particularités des plaques amyloïdes et forment ainsi une succession de fibrilles. Des analyses immunologiques de ces fibrilles ont permis d'identifier la protéine APin, correspondant donc à 153 acides aminés que l'on retrouve chez ODAM (279AA) qui était à l'époque inconnue.

Une étude sur les gènes spécifiques au cancer de l'estomac, qui fait partie des cancers les plus communs à travers le monde, a révélé la présence de la protéine APin chez les patients atteints [54]. Basé sur des données de librairies SAGE, ils ont montré qu'APin est le gène le plus surexprimé dans les cancers gastriques. Plus précisément, l'expression est 200 fois plus grande de ce gène dans l'estomac portant le cancer que dans l'organe sain (expression quasi absente mais normalisée à 1).

Suite à la découverte d'ODAM par notre laboratoire, il a pu être déterminé au niveau génomique qu'APin représente les exons 5 à 10 d'ODAM sur le chromosome 4q13. Des études sur quatre autres cas de TOECs ont montré des taux variables des fragments protéiques provenant des exons 1 à 4 de la protéine ODAM. Cette étude a permis de prédire qu'ODAM entier contient 279 acides aminés dont 125 proviennent des quatre premiers exons. Pour rappel, les 153 autres acides aminés correspondant à APin, et donc les exons 5 à 10 appartenant à la séquence d'ADN codant pour la protéine ODAM, représente la partie C-terminal d'ODAM. L'étude a pu également localiser biochimiquement et immunologiquement la région amyloïdogène qui correspondrait alors aux résidus 127 à 172 [74] (**Fig. I.11**).

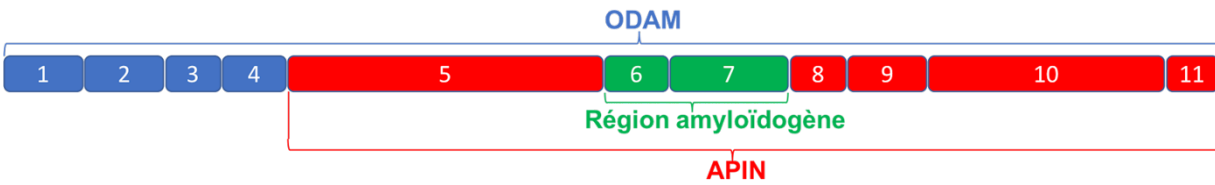


Figure I. 11 : Représentation de la correspondance des exons d'ODAM pour APIN et la région amyloïdogène

Pour obtenir plus de connaissances sur l'implication d'ODAM dans les tissus sains et les tumeurs, une étude utilisant des anticorps anti-ODAM monoclonaux et polyclonaux a été entreprise afin d'analyser des tissus humains normaux et cancéreux [11]. Cette étude a confirmé la présence d'ODAM dans les glandes salivaires, nasales ou encore lacrymales, mais aussi au niveau de la trachée humaine, du colon ou des poumons. Ils ont également détecté une surexpression d'ODAM au niveau de certains cancers épithéliaux comme celui du poumon ou celui de l'estomac. On retrouve aussi fréquemment les anticorps dans le sérum de patients atteints de cancers. La détection d'anticorps IgG anti-ODAM dans le sérum de patients comportant un cancer de type épithélial implique que ces composants représentent une réponse immunitaire qui pourrait avoir un impact ainsi qu'un apport fonctionnel. Cette étude suppose alors qu'ODAM aurait un rôle fonctionnel dans la pathogénicité des tumeurs épithéliales [75]. Un autre aspect de l'étude montre qu'ODAM est supposée moduler l'expression d'au moins une métalloprotéine (MMP-20) impliquée dans des cancers agressifs et métastatiques [76, 77]. Une relation entre ODAM et MMP-20 avait déjà été mise en avant dans des études sur la minéralisation [49]. Ils proposent aussi que le gène d'ODAM est surexprimé dans la voie *Shh* impliquée dans la carcinogenèse et retrouvée dans les cancers de l'estomac, du poumon et aussi du sein. Pour conclure cette étude suppose que les anticorps anti-ODAM pourraient servir de bio-marqueurs pour pronostiquer les cancers de type épithéliaux. D'autres études suggèrent aussi la présence d'ODAM dans diverses voies de signalisation [78].

D'après les résultats préliminaires et en admettant qu'ODAM est un nouveau bio-marqueur dans le pronostic du cancer du sein, le Dr Kestler a cherché à comprendre son rôle exact dans la régulation de la croissance de la tumeur ainsi que dans les métastases [79]. Ils ont pu observer une diminution par 4 du nombre de cellules lorsque celles-ci comportent ODAM. En effet, nous

observons une augmentation de l'activation de la caspase-3 en présence d'ODAM. Cette molécule fait partie d'un cycle qui entraîne l'apoptose, c'est-à-dire la mort cellulaire. Des études pour observer les effets de l'expression d'ODAM sur les propriétés métastatiques et la formation de tumeurs agressives montrent que les tumeurs comportant O DAM ont poussé 16 fois moins que les tumeurs contrôles en six semaines [79]. Cette étude suggère donc qu'ODAM limite le développement du cancer du sein, et ce rôle dans la diminution de l'invasion a également été visualisé dans les mélanomes humains [80] suggérant un potentiel inhibiteur dans le développement de tumeur. Néanmoins, des études menées par le même groupe sur les niveaux d'expression d'ODAM dans des tumeurs à des stades avancés contredisent l'effet inhibiteur observé au niveau du cancer du sein [75]. Une très récente étude sur des métastases de la prostate, met en évidence une relation entre O DAM et MMP-20 et suggère qu'ODAM n'inhibe pas la pousse des cellules cancéreuses mais diminue la migration et le développement du cancer de la prostate [81]. O DAM aurait également un rôle dans l'expression de PTEN (« phosphatase and tensin homolog ») qui dans la voie de signalisation avec AKT (« Protéine kinase B ») diminuerait la phosphorylation de PI3K (« Phosphoinositide 3-kinase ») et donc de AKT menant alors à l'apoptose [80]. Dans des tumeurs gastro-intestinales, la présence d'ODAM diminuerait la mitose et les tumeurs seraient de petite taille alors que l'inverse serait observé en présence de grande quantité de AKT phosphorylée [82]. AKT est reconnue pour être un régulateur important lors de la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse [83]. Dans le modèle des souris déficientes en O DAM, on n'observe pas de développement de tumeurs ce qui peut mener à la l'hypothèse qu'ODAM pourrait avoir un rôle de promoteur [68]. De nombreux membres de la famille SCPP ont un lien avec la progression de tumeurs supportant un rôle possible d'ODAM dans les néoplasies [84].

Il est admis que les tumeurs se forment par la dédifférenciation des cellules saines. La particularité de l'épithélium de jonction et des tumeurs montrent un parallèle qui permet d'avancer qu'ODAM a un possible rôle sur la détermination de l'état cellulaire en plus de participer à l'assemblage de la lame basale. Cette protéine matricellulaire semble posséder un très grand potentiel, mais il nous reste à déterminer si sa surexpression dans certains cancers en est la cause ou simplement une coïncidence et si elle a une valeur de pronostic ou de diagnostic.

I.5 – La maladie parodontale

Les maladies parodontales (MP) sont des maladies multifactorielles touchant 4 adultes sur 5 mondialement résultant en des maladies orales mais aussi systémiques [85]. Il est admis que les bactéries sont les agents causatifs de cette maladie [86, 87] et que la maladie est reliée au système d'attache de la dent [88]. En effet, l'invasion des bactéries au niveau des zones internes du parodonte vont entraîner dans un premier temps des inflammations et pourront mener dans des cas plus sévères à la perte de dent ou d'os [89]. Pour permettre leur pénétration dans les tissus, les bactéries ont besoin de créer un décollement de l'EJ qui est considéré comme une prémisses au développement de la MP [90]. Pour cela, elles développent des poches parodontales soit en détachant des cellules de l'EJ de la surface de la dent soit en affaiblissant/fissurant la cohésion cellulaire [69]. Les événements contribuant à la formation de poches sont encore méconnus [91] et méritent une attention particulière puisque la compréhension de ce système permettra le développement de thérapies.

I.5.1 – Tissus impliqués

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la dent est la seule structure dans le corps qui franchit la barrière épithéliale et, en tant que tel, la jonction dento-gingivale joue un rôle essentiel dans la prévention de l'infiltration bactérienne [3]. En effet, comme nous l'avons précédemment développé l'EJ se fixe à la surface de la dent afin de créer un scellement pour protéger les tissus de soutien dentaire de l'environnement buccal. Cet épithélium est directement en contact avec le sulcus qui est une véritable niche écologique pour la colonisation microbienne. Cette proximité des bactéries le rend susceptible aux attaques qui pourraient perturber son intégrité structurelle et fonctionnelle (**Fig. I.12**). Essentiellement, l'adhésion de l'EJ à la dent et la cohésion des cellules de l'EJ sont les deux principales caractéristiques impliquées dans le maintien de l'intégrité du scellement. La rupture de l'un ou l'autre conduit à un détachement de l'EJ provoquant un approfondissement du sulcus créant alors une poche parodontale tapissée par un EJ qui va se modifier avec le temps en se parakératinisant. Les poches sont d'une importance particulière dans la progression de la MP car les bactéries peuvent maintenant libérer des toxines sur une plus grande surface pour compromettre davantage l'intégrité de l'EJ. Cette activité étendue empêche le rattachement et aggrave le

dysfonctionnement cellulaire de l'EJ, et étend les dommages aux tissus de soutien [90]. Ainsi, la transformation de l'EJ en un épithélium de poche est largement considérée comme un événement crucial dans le développement de la parodontite chronique [91]. Il n'existe actuellement pas de traitement pour la MP, le traitement est uniquement préventif et consiste essentiellement au maintien de la plaque dentaire [92].

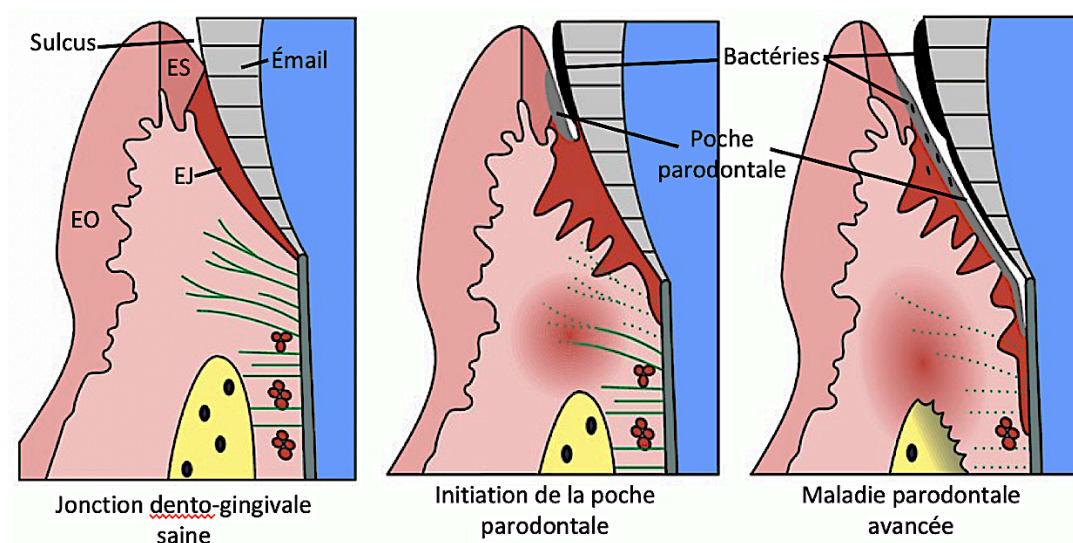


Figure I.12 : Différents stades de développement de la maladie parodontale

Les ligaments périodontaires sont en vert, l'os en jaune, la dentine en bleu et le cément en vert foncé. EO = Épithélium oral; ES = Épithélium sulculaire; EJ = Épithélium de jonction.

Adapté de Pöllänen et al., 2003 [93]

I.5.2 – Bactéries impliquées

Les dents sont des organes transmuqueux, c'est-à-dire qu'ils sont exposés de façon permanente à un environnement contaminé puisque la cavité buccale de par ses caractéristiques est un incubateur parfait pour les micro-organismes. Ces derniers se regroupent sur la surface des dents afin de former des biofilms, la plaque dentaire, qui sont des systèmes écologiques complexes. Ce biofilm est en contact direct avec les tissus scellant la dent et cherche constamment à s'étendre en éprouvant donc la jonction dento-gingivale. La plaque sous-gingivale humaine abrite plus de 700 espèces bactériennes. Parmi celles-ci, seule une minorité est virulente et

conduit à la MP lorsque l'équilibre du microbiome oral est compromis [89]. *Socransky et al.* ont classé les bactéries présentes dans la cavité orale suivant 5 groupes, et nous nous intéresserons qu'au groupe « rouge » (les colonisateurs tardifs) et au groupe « orange » (les premiers colonisateurs) qui ont tous deux un lien avec la MP et la formation de poche [94]. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Bacteroides forsythus* (*B. forsythus*) et *Treponema denticola* (*T. denticola*) sont considérées comme des colonisateurs tardifs et sont fortement associées aux lésions actives de la MP [95]. Ce sont toutes trois des bactéries à Gram-négatif, généralement non-motiles qui vivent dans des conditions anaérobiques [96-98]. Parmi d'autres, *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) et *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) sont considérées comme les premiers colonisateurs menant à la MP et leur rôle est de stimuler et faciliter l'agrégation des colonisateurs tardifs [94]. Elles sont également toutes à Gram-négatif et anaérobiques [99-101]. De nombreuses bactéries sont connues pour interagir ensemble afin de former la plaque dentaire [95, 102]. Cette plaque dentaire leur sert de zone protectrice d'où elles sécrètent une variété de facteurs de virulence [103]. Par exemple, *P. gingivalis* - l'une des espèces bactériennes buccales les plus étudiées - produit un groupe d'enzymes nommées gingipaines qui sont impliquées dans la destruction et la colonisation des tissus ainsi que dans la perturbation de la défense de l'hôte [104, 105]. Il a également été récemment proposé que les biofilms bactériens libèrent un facteur qui affecte l'intégrité cellulaire et le rôle protecteur de l'EJ contre la MP [106].

1.5.3 – Mécanismes d'attaque

Comme nous l'avons mentionné, la jonction dento-gingivale et plus particulièrement l'EJ sont les derniers remparts contre l'invasion bactérienne [107]. Les plaques dentaires étant à la surface des dents vont être en contact direct avec le sulcus permettant donc d'attaquer soit l'épithélium sulculaire soit l'EJ. Il est connu que ces deux épithéliums sont non kératinisés et se protègent principalement à l'aide de neutrophiles qui sont produits par les cellules et qui migrent en direction du sulcus [108]. Les études actuelles se sont principalement intéressées à l'attaque des bactéries sur les cellules associées à l'EJ. Il a été proposé que plus l'inflammation augmente, plus le nombre de leucocytes présents affecterait localement l'épithélium de jonction [3]. En d'autres mots, l'inflammation déclenche une réponse défensive de l'organisme hôte qui va, en

se défendant contre les bactéries, partiellement affecter l'intégrité de l'EJ [109]. Bien sûr, les bactéries ont quand même une influence directe sur le détachement de l'EJ. En effet, les bactéries produisent un grand nombre de protéases et de facteurs de virulence afin d'envahir les tissus. *A. actinomycetemcomitans* possède par exemple des leucotoxines qui agissent contre les neutrophiles et les monocytes, ou encore des collagénases pour pénétrer les tissus [110]. Les gingipaines produites par *P. gingivalis* ont la capacité de dégrader les composants des jonctions intracellulaires [111]. Ces mêmes protéases ont la capacité de cliver les molécules d'adhésion intercellulaires entre les cellules épithéliales telles que CD54 [112]. Cette dernière est une molécule permettant l'interaction entre les intégrines $\beta 4$ des leucocytes et les cellules adjacentes lors d'inflammation, sa dégradation peut donc permettre la pénétration des bactéries au sein de l'EJ plus facilement [113]. Cet exemple de dégradation parmi d'autres montre à quel point les bactéries ont la capacité de perturber l'adhésion des cellules de l'épithélium de jonction ce qui mènera ultimement au détachement de l'EJ de la surface minéralisée et donc à la formation de poche. Si la virulence bactérienne persiste, cette poche va s'agrandir puisque l'EJ va migrer apicalement, c'est-à-dire descendre le long de la dent [91] (**Fig. I.12**). Une fois la poche formée, la diffusion des bactéries se fait bien plus loin qu'au niveau de la cavité buccale et de plus en plus d'études montrent l'implication importante des pathogènes buccaux dans des maladies systémiques ou même dans le cancer [114, 115].

Très peu d'études se sont intéressées au fait que les bactéries peuvent agir directement sur la « colle » qui permet l'attachement de l'EJ à la dent. Les bactéries étant en contact direct avec la LBS ont autant l'opportunité d'attaquer directement cette structure ou les cellules. De plus, attaquer la LBS décollera l'EJ et permettra (a) d'augmenter la surface de contact des bactéries pour pénétrer à l'intérieur du tissu conjonctif et (b) au biofilm de s'étendre. La découverte récente par le laboratoire du Dr Nanci des protéines composant la LBS a ainsi ouvert la porte sur la possibilité d'étudier cette facette de la MP qui avait été alors mise de côté [5-8]. Le troisième manuscrit présenté dans cette thèse explore donc cette théorie [116].

I.5.4 – La maladie parodontale et les protéines de la lame basale spécialisée

Excepté pour SCPPPQ1, des études sur les protéines d'intérêt ont montré une relation entre les composants de la LBS et la MP, particulièrement pour ODAM. Pour AMTN, on observe seulement une diminution importante de son expression au cours de l'évolution de la MP [117]. L'histologie de l'EJ chez la souris ODAM « KO » ressemble à celle de la jonction dento-gingivale des patients atteints de MP [68]. Les poches parodontales se forment sans lésions apparentes au niveau des cellules de l'EJ, et un EJ long s'étend apicalement le long de la surface radiculaire. L'absence d'ODAM altère structurellement la LBS puisque celle-ci augmente en épaisseur et semble ne pas être continue ce qui entraîne des changements dans la distribution de l'immunomarquage pour AMTN et SCPPPQ1 [68]. Alors que l'interprétation du phénotype ODAM « KO » est probablement plus complexe, on peut supposer que son absence provoque un affaiblissement de la LBS qui peut initier la formation de poche. *Nishio et al.* ont aussi montré qu'ODAM est surexprimée dans les REMs lorsque l'EJ est perturbé [57]. Il faut rappeler que les REMs sont des compartiments de cellules souches épithéliales qui jouent un rôle dans la maintenance parodontale.

On observe également une expression d'ODAM réduite dans les modèles animaux où la MP est induite par traitement utilisant *P. gingivalis* / sulfate de dextran ou par lésion [118]. Cette diminution d'expression s'explique aussi par l'augmentation de sa présence dans le liquide créviculaire retrouvé dans les poches parodontales des patients atteints de parodontites [118]. D'ailleurs plus la poche devient profonde, plus ODAM est retrouvée au sein du sulcus. Il a aussi été noté que l'expression d'ODAM au sein de l'EJ est modulée en fonction de l'avancement de la maladie suggérant un rôle dans la résistance à l'inflammation ou la gestion de l'activité bactérienne [117]. Finalement, des études en cours au laboratoire avec une souris déficiente en amélogénine (une protéine majeure de la matrice impliquée dans la formation de l'émail) révèlent des altérations secondaires semblables à la MP. Chez ces souris, le nombre de cellules de l'EJ exprimant ODAM ainsi que l'intensité de l'immunomarquage de la protéine sont considérablement réduits. ODAM semble avoir un rôle important dans la gestion de la MP comme c'est le cas dans la reconstitution de l'EJ suite à une gingivectomie.

I.5.5 – Les péri-implantites

Dans le cas où la dent doit être remplacée, la restauration se fait à l'aide de la pose d'implants transgingivaux. Cette technique courante est également propice à une forme de MP appelée péri-implantite [119]. C'est un processus inflammatoire qui affecte les tissus bordant l'implant et qui peut mener à une perte d'os et dans les cas les plus extrêmes au retrait de l'implant vu qu'il n'y a plus assez d'os pour le maintenir [120] (**Fig. I.13**). Un implant atteint d'une péri-implantite perd de l'os beaucoup plus rapidement qu'une dent car les structures naturelles de la dent telles que les fibres gingivales sont absentes ce qui facilite la propagation de l'inflammation bactérienne [121]. Il y a de plus en plus de preuves que c'est une complication clinique majeure menant à une défaillance de l'implant [121]. La péri-implantite est un processus qui se développe rapidement suite à la pose de l'implant et peut être due à un EJ non-fonctionnel. En effet, comme nous l'avons mentionné, l'EJ a la capacité de se régénérer mais sa non fonctionnalité peut résulter de l'absence des composants adhésifs de la LBS ou d'une relation inadéquate entre cette matrice extracellulaire unique et la nature chimique ou l'état de la surface de l'implant. ODAM est d'ailleurs retrouvée dans le liquide crévulaire chez les patients atteints de péri-implantite [78], tout comme ceux atteints de parodontite.

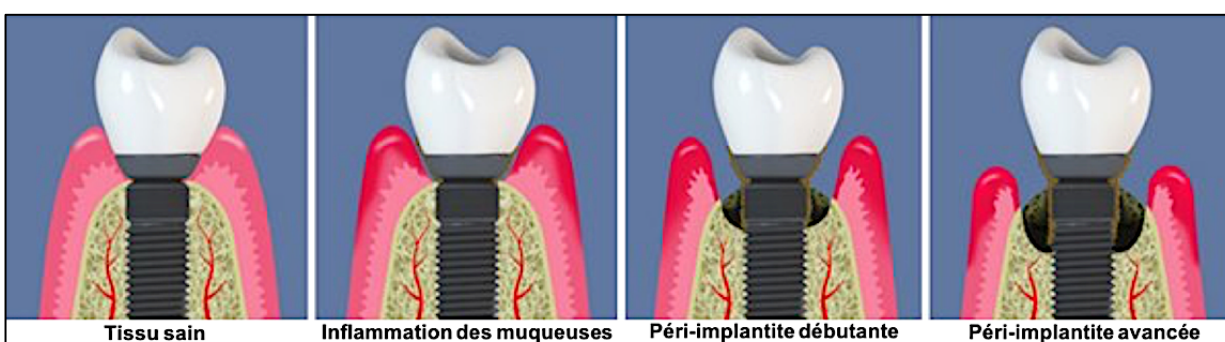


Figure I.13 : Différents stades d'évolution de la péri-implantite

(Adaptée de webdentiste.fr)

I.6 - Problématique et hypothèse de travail

La structure et la composition de la LBS qui lie l'EJ à la dent est d'une importance critique, l'intégrité de la santé parodontale en dépendant. Cette interaction unique par sa manière de fixer des tissus épithéliaux à une surface calcifiée n'est pas encore connue. Sa structure se distingue de celle d'autres épithéliums en raison de sa composition, du substrat sur lequel elle adhère et de l'environnement immédiat chimique et physique agressifs auquel elle doit résister. De récentes études sur ces structures ont révélé la présence de protéines épithéliales uniques, AMTN, ODAM et SCPPPQ1 [35]. Nous ne pouvons pour le moment que spéculer sur leurs rôles éventuels car en plus de ne pas avoir d'homologues structuraux, aucun motif aisément reconnaissable dans leurs séquences n'est présent afin d'avoir un potentiel aperçu de leurs fonctions. Une participation putative au mécanisme d'adhésion de la LBS a été déduite à partir des études préalablement décrites.

Notre hypothèse générale est qu'AMTN, ODAM et SCPPPQ1 interagissent afin de former une LBS permettant de relier les cellules épithéliales de l'EJ à la surface minéralisée de la dent. Comprendre comment ces protéines récemment découvertes se structurent avec la Lam332 est incontournable pour l'élucidation de la question critique qui est de savoir comment se fait l'adhésion unique de la LBS à la dent et promet de mener à des stratégies innovantes pour maintenir le scellement épithélial autour des dents et ainsi limiter la formation de poches parodontales. En effet, bien qu'il y ait eu plusieurs études axées sur le rôle des bactéries et la réponse de l'hôte dans la MP, peu ont abordé la question de l'intégrité cellulaire et structurelle de l'EJ. Nous croyons que mieux définir et contrôler la biologie interfaciale de l'EJ offrira un nouveau paradigme pour la lutte contre la MP. Plus précisément, notre but ultime est de maintenir l'attachement et la cohésion de l'EJ et de promouvoir sa reformation dans les cas plus avancés de la maladie.

Pour ce projet, nous avons associé de façon originale la biologie structurale et moléculaire afin d'aborder ce problème. Ce type de techniques est utilisé dans le développement de médicaments au stade précoce. La biologie structurale est essentielle à l'identification de sites fonctionnels et

des cibles cellulaires afin de développer des stratégies thérapeutiques. Comme la structure d'une protéine est en relation directe avec sa fonction, ces données amèneront à une meilleure compréhension des mécanismes dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium de jonction qui revêt une importance fondamentale et clinique. Les études que nous proposons vont dans le sens de cet objectif translationnel. Nous avons d'ailleurs développé cet aspect dans la soumission d'un brevet provisoire qui sera présenté dans le chapitre V de cette thèse.

I.7 – Justification des méthodes utilisées

Lors de ce doctorat, nous avons combiné des techniques de biologie moléculaire, de biochimie et de biologie structurale afin de caractériser les protéines *in vitro* mais aussi de déterminer avec plus de précision leurs rôles *in vivo*

I.7.1 - Biologie moléculaire

I.7.1.1 – Généralités

Plusieurs procédures de clonage ont été réalisées afin de préparer les plasmides à des fins de production des protéines recombinantes et pour les études de double hybride bactérien (les amorces sont détaillés dans le deuxième article de cette thèse [9]). Les souches XL1 et BL21star (Δ DE3) de *E. coli* sont utilisées comme vecteurs pour le clonage et la production de protéines.

I.7.1.2 – Double hybride bactérien

C'est une technique quantitative très utilisée pour déterminer l'interaction *in vivo* entre deux protéines au sein d'un système bactérien [122]. Les gènes d'intérêt sont fusionnés à des séquences codant pour les fragments T25 ou T18 du domaine catalytique de l'adénylate cyclase (AC) de *Bordetella pertussis* et ces nouvelles constructions sont co-exprimées dans les cellules *E. coli* BTH101 qui sont déficientes en AC. Si les protéines interagissent, le domaine AC est reconstitué permettant, grâce à une voie de signalisation, la production de β -galactosidase menant à une couleur bleue de la bactérie en utilisant l'essai X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Cette interaction peut-être ensuite quantifiée en utilisant le substrat ONPG (ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside).

I.7.1.3 – « Phage display »

La technique de « phage display » consiste à la mise en contact de phages, qui produisent une petite séquence peptidique à leur surface, avec une protéine immobilisée [123]. Certains phages interagissent avec la protéine grâce à leur séquence puis sont récupérés après lavage et élution. Enfin les phages élués sont utilisés pour infecter des bactéries afin d'augmenter leur nombre

avant de récupérer leur ADN et de le séquencer pour caractériser les peptides qui s'étaient fixés. Une analyse comparative permet par la suite d'identifier où les fragments se sont fixés.

I.7.2 – Biochimie

I.7.2.1 – Généralités

De nombreuses méthodes de production et de purification des protéines ont été utilisées et ont permis au final d'obtenir de haut rendement des protéines d'intérêt avec une pureté supérieure à 95%. Les informations de production et purification utilisées sont détaillées principalement dans le second article présent dans cette thèse [9]. Les protéines purifiées ont été utilisées pour différentes études d'interactions, de détermination de la structure secondaire et de la structure quaternaire.

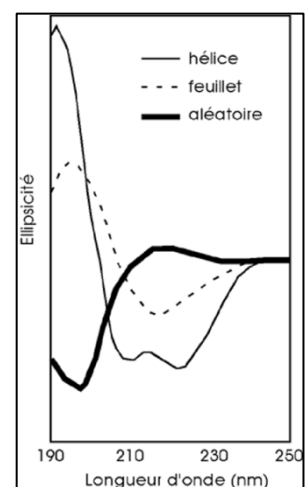
I.7.2.2 – Co-immunoprécipitation

Des études de co-immunoprécipitation ont été utilisées afin de déterminer l'interaction entre les protéines. Des anticorps spécifiques à chacune des protéines ont été utilisés et la combinaison de gels SDS-PAGE, d'expériences d'immunobuvardage et de spectrométrie de masse ont permis de déterminer les protéines associées à chacune des protéines immunoprécipitées.

I.7.2.3 – Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une méthode reconnue pour déterminer la stabilité et la structure secondaire des protéines. Les spectres sont acquis à une longueur d'onde de 180 à 250 nm à l'aide d'un spectropolarimètre et les spectres des dichroïsmes circulaires caractéristiques obtenus sont spécifiques à des structures secondaires (**Fig. I.14**). Par la suite, le serveur dichroweb [124] est utilisé pour déterminer le pourcentage de structure en hélices α / feuillets β / désordonnées de la protéine d'intérêt.

Figure I.14 :
Représentation des spectres typiques suivant la structure secondaire d'une protéine



I.7.3 – Protéomique

I.7.3.1 – Généralités

Des études de protéomique ont été utilisées pour obtenir des informations sur la séquence des protéines. Des essais enzymatiques ou d'incubation avec des bactéries pathogènes au niveau parodontal ont été testés pour déterminer l'influence d'enzymes sur nos protéines d'études. Des études *in silico* ont été utilisées, à l'aide de l'outil « PeptideCutter » de la suite « ExPaSy » [125], afin de déterminer le nombre et les sites de coupures potentiels des enzymes sur les séquences protéiques de chacune des protéines étudiées. Ces données *in silico* ont ensuite été comparé avec les essais enzymatiques *in vitro* afin de valider le potentiel de clivage des enzymes sur les protéines étudiées. Les essais avec les bactéries sont présentés dans le troisième article de cette thèse.

I.7.3.2 – Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et la caractérisation de leur structure chimique. C'est une méthode robuste et reconnue qui a pour principe de séparer en phase gazeuse des molécules chargées après ionisation en fonction de leur rapport masse/charge. Nous avons utilisé la spectrométrie de masse MS/MS afin de confirmer la séquence des protéines étudiées. Nous avons utilisé la méthode de Top Down [126] dans le troisième manuscrit de cette thèse afin de définir comment les protéines sont fragmentées suite à leurs incubations avec des bactéries pathogènes parodontales. Ceci a permis de définir avec précision les fragments obtenus ainsi que les sites de coupure. Des études *in silico* ont permis d'identifier l'ensemble des fragments analysés et de générer un score de fiabilité.

I.7.4 – Biochimie structurale

I.7.4.1 – Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM – « Atomic force microscopy » en anglais) est une technique, dite de sonde locale, utilisant un principe d'attraction/répulsion entre les atomes d'une pointe et les atomes de l'échantillon à mesurer. La pointe est localisée sur un « cantilever » qui va bouger pendant l'acquisition de la topographie de l'échantillon (**Fig. I.15**). Un laser est réfléchi sur le « cantilever » en direction d'un écran photodiode qui permet d'enregistrer les variations de hauteur de la pointe. L'intensité des interactions entre la surface et la pointe donnent quant à elles des informations sur les propriétés mécaniques et physicochimiques de l'échantillon.

Il y a principalement trois modes de mesures – Contact, « Tapping » et Non-contact – permettant d'obtenir des informations tridimensionnelles à l'échelle nanométrique. Pour ce projet, nous avons utilisé le mode « Tapping » afin de caractériser la structure de protéines [9] et l'impact des bactéries sur un réseau supramoléculaire [116]. Ces données sont complémentaires à celles obtenues en microscopie électronique.

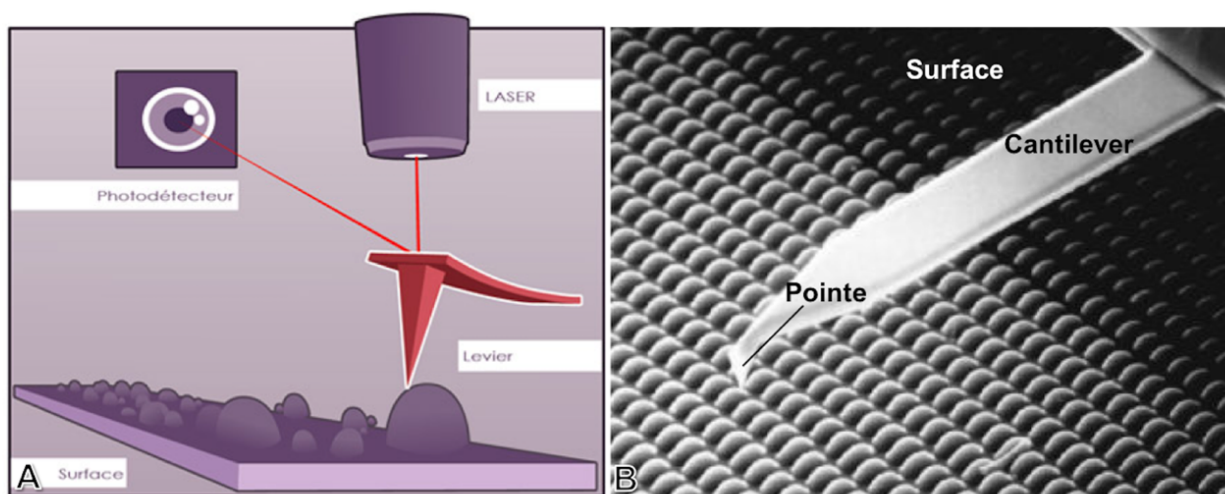


Figure I.15 : Représentation de la microscopie à force atomique

Un laser réfléchit sur le levier afin de détecter les mouvements de ce dernier dans un photodétecteur (**A**). Images de microscopie électronique à balayage d'une pointe d'un « cantilever » en contact avec une surface sinuouse (**B**). (A & B – Adaptée de microscopy-analysis.com)

I.7.4.2 – Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode reconnue pour l'analyse de la topographie de surface à haute résolution. Elle est utilisée pour analyser autant les matériaux solides tels que des métaux et/ou polymères que les matériaux du vivant tels que des cellules, tissus et bactéries (**Fig. I.16**). Dans notre cas, cet appareil nous permet l'analyse de la morphologie de cellules et de bactéries suivant différentes conditions d'étude.

Comme son nom l'indique c'est une microscopie basée sur l'émission d'électrons. Un faisceau d'électrons dit primaires va passer à travers une colonne sous vide et va être concentré par une série de lentilles électromagnétiques. Le faisceau concentré va balayer l'échantillon grâce à des bobines générant des électrons soit secondaires, soit rétrodispersés ou des rayons X (**Fig. I.16**). Les électrons secondaires vont être détectés afin de générer un signal numérique de différentes intensités. Sur l'image obtenue, les zones claires correspondent à une grande quantité d'électrons secondaires alors que les zones sombres sont celles avec moins d'électrons secondaires.

Pour nos travaux nous avons utilisé le MEB à effet de champs JEOL JSM-7400F (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) à 1.5 kV que nous possédons au laboratoire. Pour atteindre une meilleure résolution, nous avons utilisé un MEB à effet de champs de la compagnie Hitachi, le Regulus 8230 (Hitachi, Tokyo, Japan), opérant à un voltage entre 0,8 et 1,5 kV.

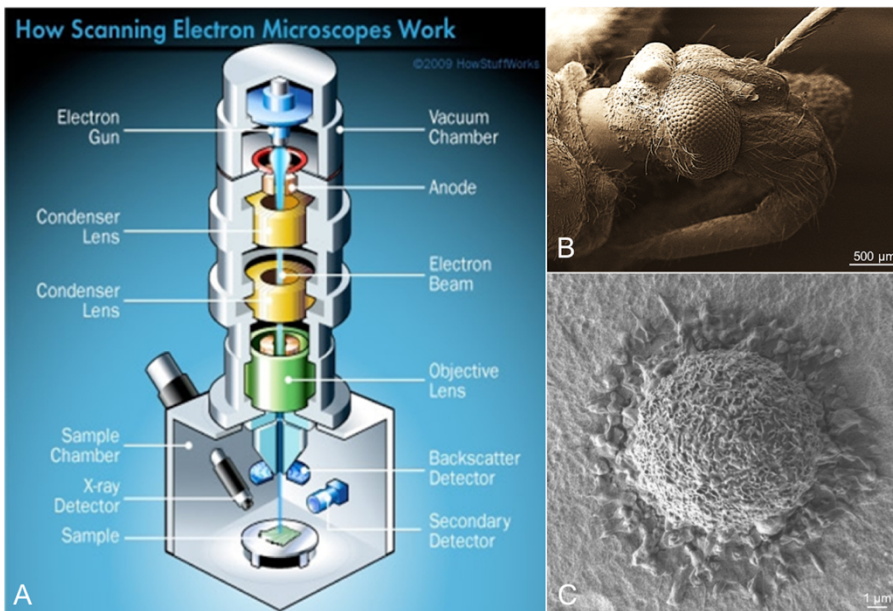


Figure I.16 :
Représentation de la microscopie électronique à balayage
Visualisation du parcours du faisceau d'électrons (A), de la tête d'une mouche (B) et de l'attachement d'une cellule sur du titane (C).
(A- howSEMworks.com)

I.7.4.3 – Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est une méthode de pointe pour l'analyse des protéines ou d'échantillons très minces. Cette technique consiste à générer des électrons en chauffant un filament qui sont ensuite accélérés afin d'accélérer la vitesse du faisceau d'électrons (80 à 300 kV) (**Fig. I.17**). Un jeu de lentille magnétique permet de concentrer le faisceau afin de traverser l'échantillon dans une colonne sous vide. Les électrons vont rentrer en contact avec les atomes de l'échantillon et vont devenir soit élastiques, c'est-à-dire ne perdant pas leur énergie mais déviant, soit inélastiques qui eux diminuent leur énergie et dévient. Les électrons élastiques sont utilisés pour obtenir le contraste de l'image. Ces électrons vont rencontrer soit un scintillateur qui va alors générer des photons pour des caméras CCD, soit directement des caméras récemment développées dites « direct electron ». Les données acquises ont une résolution de l'ordre de l'angström.

Les échantillons sont visualisés soit (a) en coloration négative, ce qui consiste en l'ajout d'atomes de métaux lourds sur l'échantillon pour lui apporter plus de contraste, soit (b) en mode cryogénique qui permet de visualiser l'échantillon en condition native après sa congélation rapide (**Fig. I.17**) (c) soit dans un liquide dit anionique. Ce liquide, récemment développé et encore méconnu [127], permet de diffuser les électrons afin de visualiser les échantillons en solution. Il peut être utilisé sur des grilles perforées comme la cryo-MET mais sans congeler l'échantillon, on observe donc l'échantillon dans son état natif. La technique de cryo-MET a reçu le prix Nobel en 2017 alors que la microscopie électronique à transmission l'a reçu en 1986.

Nous avons utilisé cette technologie afin de déterminer la structure des protéines et l'observation de tissu enrobés en utilisant un MET FEI Tecnai T12 (Eindhoven, Pays-Bas) opérant entre 80 et 120 kV. Nous avons également utilisé un MET Titan Kryos de FEI (Eindhoven, Pays-Bas) opérant à 300 kV à Leiden (Pays-Bas) en mode cryogénique.

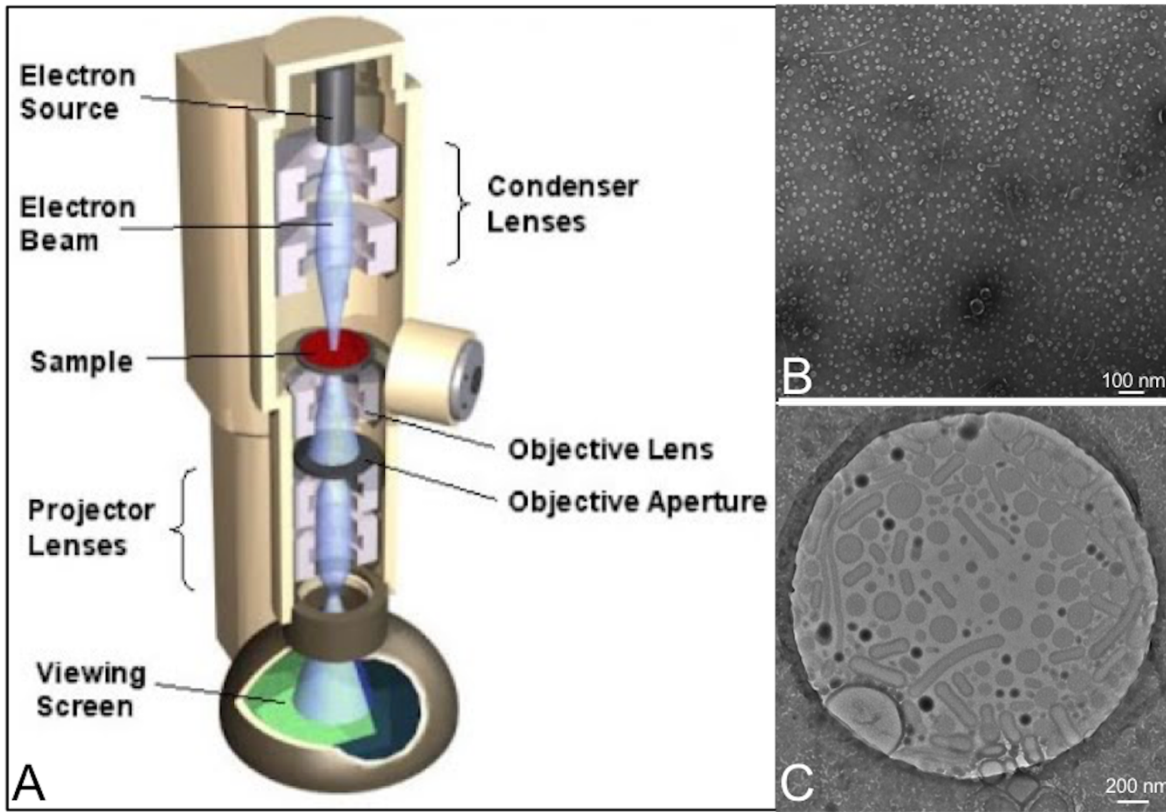


Figure I.17 : Représentation de la microscopie électronique à transmission

Représentation du chemin du faisceau d'électrons à travers la colonne du microscope (A), d'une grille en coloration négative (B) et d'une grille en conditions cryogéniques (C).

(A – Adaptée de microscopy-analysis.com)

I.7.4.4 – Diffusion des rayons X aux petits angles

La technique de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS en anglais) est une méthode biophysique permettant l'étude de macromolécules en solution et plus particulièrement l'étude des protéines dites intrinsèquement désordonnées [128]. Cette technique structurale est à basse résolution mais complémentaire à la RMN et à la cristallographie puisqu'elle permet d'obtenir la forme générale des macromolécules étudiées ainsi que des données sur la flexibilité des protéines. De manière simplifiée, l'expérience SAXS consiste en l'illumination d'une solution protéique par un faisceau de rayons X (Fig. I.18). Un détecteur est placé derrière l'échantillon

et permet d'enregistrer l'intensité des rayons X qui ont été dispersés après la collision avec les molécules. Les données sont soustraites à celle du tampon afin d'obtenir le signal seulement du contenu de la solution étudiée. Une analyse informatique permet ensuite de déterminer la forme et taille des particules.

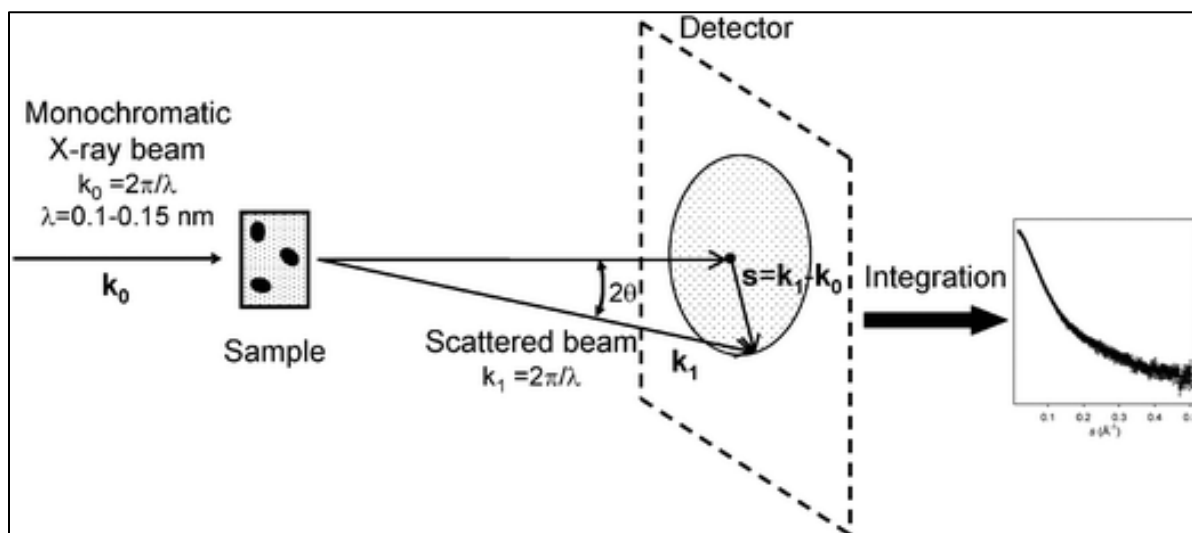


Figure I.18 : Représentation basique d'une expérience de SAXS

<http://pubs.rsc.org>

I.7.5 – Animaux

I.7.5.1 – Modèles transgéniques

L'étude des maladies humaines est limitée par l'absence de modèles animaux robustes capables de reproduire les phénotypes humains. Le modèle murin est très utilisé pour sa capacité à avoir une progéniture abondante, une petite taille et un développement rapide. De plus, la souris peut reproduire de nombreux changements génétiques observés chez l'humain. La connaissance de ces modèles a aussi permis la génération de transgéniques, c'est-à-dire d'animaux étant déficients (Knock-out) d'une molécule ou la substitution (Knock-in) d'une molécule par une autre. Ces modifications peuvent être conditionnelles ou induites par la prise d'un médicament par exemple. L'utilisation de transgènes a permis dans notre cas d'obtenir des informations importantes quant à l'implication des protéines dans nos systèmes d'études.

I.7.5.2 – Préparation des tissus

Les tissus ont été préparés comme détaillé dans les articles afin de les utiliser en MEB, MET ou encore en immunofluorescence.

I.7.5.3 – Étude des tissus

Les tissus ont été traités comme détaillé dans les articles afin de les observer grâce à différentes techniques de microscopie. L'histochimie a été utilisée pour observer la structure générale du tissu. L'immunofluorescence a été utilisée pour localiser précisément les protéines dans divers tissus. La MEB ou MET ont permis l'acquisition de données à plus grande résolution soit pour localiser les protéines au sein de tissus soit pour voir l'action de bactéries sur la LBS.

Chapitre II – Premier article scientifique - *Laminin γ 2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects*

II.1 – Description de l'article et contribution des auteurs

Cette étude, publiée en mars 2016 dans *Matrix Biology*, a exploité un modèle de souris transgénique exprimant la chaîne γ 2 humaine sous le contrôle de la doxycycline à la place de la γ 2 de rat. Ceci a permis d'étudier l'impact de la Lam332 au niveau buccal, plus précisément au cours de l'étape de maturation de l'OE en évitant la létalité qui a été observée lorsque la chaîne est totalement enlevée.

Nous avons pu voir que la modification de cette chaîne affecte la minéralisation de la dent. En effet, des morceaux de calcaires et des éclats sont retrouvés sur la surface de l'émail et le bout de l'incisive est contendant. Au niveau de l'amélogénèse, on observe des défauts à partir des étapes de transition/début de maturation avec la présence de matrice dystrophique. En microscopie électronique, on peut observer la présence de cristaux désorganisés au sein de ces matrices. Une immunolocalisation de l'albumine révèle que la perméabilité de la barrière est corrompue pour les animaux LamC2-Dox. Le fait que l'intégrité de la LBS soit grandement affectée a été confirmé par des études d'immunolocalisation d'AMTN, ODAM et SCPPPQ1 montrant un marquage irrégulier et désorganisé des protéines.

Enfin, l'étude de ce modèle montre l'importance de la Lam332 dans la structuration d'une LBS fonctionnelle et que seule la variation de quelques acides aminés de la chaîne γ 2 affecte grandement l'intégrité de cette structure supramoléculaire et résulte en des défauts de minéralisation.

Pour ce projet, Dre Rima Wazen, Luiz Viegas-Costa et moi-même avons contribué de manière égale. Dre Wazen a initié ce projet et a établi le modèle animal à l'Université de Montréal. Elle

a ensuite formé Luiz sur la partie des animaux et la préparation des tissus. Une fois formé, Luiz s'est occupé de la partie animale (entretien, euthanasie, perfusion...) et a enrobé les échantillons pour les études de microscopie. Il a mené les expériences d'immunohistochimie.

J'ai pour ma part contribué aux expériences d'immunofluorescence et de microscopie électronique en préparant les échantillons et en faisant l'acquisition des données. Avec Luiz, nous avons ensuite analysé les données collectées, préparé les images et écrit les premières versions du manuscrit. Rima et Dr Nanci ont finalement révisé et complété notre travail afin de soumettre le manuscrit. Dr Nanci a été le superviseur de l'ensemble du projet.

Nous avons aussi collaboré avec d'autres chercheurs qui nous ont apporté leur support scientifique.

Laminin γ 2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects

Rima M. Wazen^{a, 1}, Luiz C. Viegas-Costa^{a, 1}, Aurélien Fouillen^{a, b, 1}, Pierre Moffatt^c, Tracy L. Adair-Kirk^d, Robert M. Senior^d and Antonio Nanci^{a, b}

a - Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

b - Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

c - Shriners Hospital for Children, Montréal, Montréal, Québec, Canada

d - Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO

Correspondence to Antonio Nanci at: Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
antonio.nanci@umontreal.ca.

Matrix biology, 52-54:207-218

Published: May-Jul 2016

<http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2016.03.002>

¹These authors contributed equally to the work.

II.2 - Abstract

The epithelial ameloblasts are separated from the maturing enamel by an atypical basement membrane (BM) that is enriched in laminin 332 (LM-332). This heterotrimeric protein ($\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ chains) provides structural integrity to BMs and influences various epithelial cell processes including cell adhesion and differentiation. Mouse models that lack expression of individual LM-332 chains die shortly after birth. The lethal phenotype of laminin $\gamma 2$ knockout mice can be rescued by human laminin $\gamma 2$ (LAMC2) expressed using a doxycycline-inducible (Tet-on) cytokeratin 14 promoter-rtTA. These otherwise normal-looking rescued mice exhibit white spot lesions on incisors. We therefore investigated the effect of rescue with human LAMC2 on enamel maturation and structuring of the atypical BM. The maturation stage enamel organ in transgenic mice was severely altered as compared to wild type controls, a structured BM was no longer discernible, dystrophic matrix appeared in the maturing enamel layer, and there was residual enamel matrix late into the maturation stage. Microtomographic scans revealed excessive wear of occlusal surfaces on molars, chipping of enamel on incisor tips, and hypomineralization of the enamel layer. No structural alterations were observed at other epithelial sites, such as skin, palate and tongue. These results indicate that while this humanized mouse model is capable of rescue in various epithelial tissues, it is unable to sustain structuring of a proper BM at the interface between ameloblasts and maturing enamel. This failure may be related to the atypical composition of the BM in the maturation stage and reaffirms that the atypical BM is essential for enamel maturation.

II.3 - Keywords

Amelogenesis; Basement membrane; Enamel maturation; Humanized mouse model; Laminin $\gamma 2$

II.4 - Introduction

Formation of enamel proceeds as three major functional steps that include the pre-secretory, secretory and maturation stages [1,2]. During the pre-secretory stage, a typical basement membrane (BM) separates the differentiating epithelial ameloblasts from the forming mantle dentin matrix and associated odontoblasts [1]. Just prior to the start of secretion, this BM is removed. Later, at the onset of the maturation stage, ameloblasts reform a BM at the interface between the cells and enamel. However this BM is atypical; it does not contain collagen types IV and VII [3–5] but is enriched in laminin-332 (LM-332) [6,7], which consists of $\alpha 3$, $\beta 3$ and $\gamma 2$ chains [8,9]. The use of knockout mouse models to study the function of laminins is complicated by the fact that targeted deletion of the chains results in severe developmental defects that lead to early lethality [10,11]. To circumvent this premature lethality phenotype for LM-332, a double transgenic doxycycline (Dox)-inducible human *LAMC2* transgene (*LAMC2* -Dox), under the regulation of the cytokeratin 14 promoter-tetracycline transactivator gene (rtTA) transgene was created [12]. In this model, animals receiving Dox are rescued by expressing the human *LAMC2* instead of the mouse one. Progeny of the cross of the human *LAMC2* transgenic with *LAMC2* knockout mice show no defects in soft epithelial tissues and appear generally normal. However, turning off human *LAMC2* conditional expression (knockout condition) leads to severe tissue alterations as of the third week after stopping administration of Dox, and animals die around 3 months of age [12,13]. It has been shown that LM-332 is implicated in the terminal differentiation of ameloblasts during the pre-secretory stage [14] but little is known on its role during maturation. Our ultimate objective was to exploit this conditional *LAMC2* knockout mouse model to elucidate the role of LM-332 in the structuring and functioning of the atypical BM created during the maturation stage. While establishing the colony for these studies it became apparent that incisors of the *LAMC2* -Dox mice exhibited chalky enamel patches, a feature suggestive of a problem with enamel maturation. This study therefore focused on elucidating the origin of this tooth phenotype in the transgenic mice rescued with human *LAMC2*. While structural organization in the pre-secretory stage appeared normal, in the maturation stage the atypical BM and enamel organ was severely altered, and the removal of the organic matrix was delayed resulting in hypomineralized enamel.

Contrary to what occurs at sites where typical BMs are found, these data indicate that LAMC2 -Dox mice expressing the human protein are unable to sustain proper structuring of the atypical BM during the maturation stage, and that this interfacial structure is essential for enamel maturation.

II.5 - Results

II.5.1 - Visual and micro-computed tomographic analyses

As compared to age-matched WT mice (**Fig. II.1 A, B**), the erupted portion of incisors from LAMC2-- Dox animals exhibited chalky patches on the enamel surface, chipping of the enamel layer and blunt tips (**Fig. II.1 E, F**). Comparative sagittal and coronal tomographic views revealed that the enamel is also severely abraded indicating that the enamel was softer (**Fig. II.1 C vs 1G, 1D vs 1H**). There was an increase in periodontal space between the labial aspect of the incisor and alveolar bone (**Fig. II.1 G, H**).

To eliminate the possible effect of Dox on normal enamel formation and maturation, gestating female WT mice and newborn mice were maintained on the same Dox diet as LAMC2 -Dox mice. This did not create any significant alterations to amelogenesis (data not shown).

II.5.2 - Histological and structural changes in amelogenesis in LAMC2-Dox mice

Major defects in amelogenesis were observed in both maxillary and mandibular incisors of LAMC2 - Dox mice (**Fig. II.2 C, D**) as compared to normal WT amelogenesis (**Fig. II.2 A, B**). In LAMC2 -Dox mice, there were no obvious histological changes in amelogenesis during the pre-secretory stage and mantle dentin formation (**Fig. II.2 A vs II.2C**). However, organization of the maturation stage ameloblasts and of the other associated enamel organ cells was severely altered (**Figs. II.2 D, II.3**) as compared to WT mice (**Fig. II.2 A-B**). The disruption in cellular organization and ameloblasts polarity (**Figs. II.2 D, II.3 A-C**), the presence of dystrophic matrix among cells of the enamel organ and in the enamel layer (**Fig. II.3 C**), and the persistence of enamel matrix up to the gingival margin (**Fig. II.3 D**) make it difficult to reliably subdivide the maturation stage into early, mid and late portions or to apply reference

points such as where enamel matrix is EDTA-soluble [15]. Consistent with the hypomineralization observed in micro-computed tomographic scans (**Fig. II.1**), residual enamel matrix extended beyond the alveolar bony crest, and in some cases up to the gingival margin (**Fig. II.3 D**).

At the ultrastructural level (**Fig. II.4**), the typical BM present between differentiating ameloblasts and the forming mantle dentin matrix (pre-secretory stage) (**Fig. II.4 A**), and between the papillary layer and blood vessels during the maturation (**Fig. II.4 B**) appeared normal in LAMC2 -Dox mice. However, the interface between the disrupted enamel organ and maturing enamel was very irregular (**Fig. II.4 C, D**). Frequently, there was dystrophic matrix interposed between the enamel organ and enamel, and no distinct atypical BM could be recognized (**Fig. II.4 C, D**). Occasionally, a BM-like accumulation was observed at the apical cell surface (**Fig. II.4 F**).

II.5.3 - Immunohistochemistry

Incubations intended to map the localization of LAMC2 in the maturation stage of amelogenesis in WT mice showed that ameloblasts express the protein and it accumulated at the interface between ameloblasts and maturing enamel where the atypical BM is found (**Fig. II.5 A**). However, in LAMC2 -Dox mice, even though there were groups of enamel organ cells immunoreactive for LAMC2, there generally was no such accumulation (**Fig. II.5 B**). Some staining, above background, was also seen over enamel matrix (**Fig. II.5 B**). In soft epithelial tissues, the typical BM region separating epithelial cells and the underlying connective tissue was conspicuously labeled (**Fig. II.5 C**).

The atypical BM associated with maturation stage ameloblasts provides a permeability barrier that prevents the inflow of albumin into maturing enamel [16]. To confirm the absence of a functional atypical BM in our mouse model, we have compared the distribution of albumin in WT (**Fig. II.6 A, B**) and LAMC2 -Dox mice (**Fig. II.6 C, D**). Distinctively from WT mice (**Fig. II.6 A, B**), albumin was found in maturing enamel matrix of LAMC2 -Dox mice (**Fig. II.6 C, D**), indicating a change of BM permeability.

Consistent with previous reports [17–20] in WT mice, AMTN, ODAM and SCPPPQ1 accumulated at the interface between the ameloblasts and maturing enamel matrix (data not shown). In the *LAMC2* -Dox mice (**Fig. II.7**), the staining patterns for AMTN (**Fig. II.7 A, B**), ODAM (**Fig. II.7 C, D**) and SCPPPQ1 (**Fig. II.7 E, F**) were complex, correlating with the amount of dystrophic matrix and the degree of disruption of enamel organ. When altered ameloblasts were interposed with dystrophic matrix, the immunolabeling for the three proteins at apical surface of ameloblasts was irregular and more diffuse. All three proteins also accumulated over patches of organic matrix among the enamel organ cells.

II.6 - Discussion

We are exploiting a Dox-inducible human *LAMC2* transgene mouse model regulated by the cytokeratin 14 promoter-rtTA construct, to study the role of LM-332 on structuring of the atypical BM found at the interface between ameloblasts and maturing enamel. Such conditional expression allows bypassing the early lethality associated with targeted inactivation of LM-332 [12]. The atypical BM present during enamel maturation does not contain collagen IV and VII, is enriched in LM-332, and has been shown to comprise AMTN, ODAM, SCPPPQ1, three novel BM components that belong to the SCPP gene cluster [21–23]. This cluster regroups a number of genes coding for proteins that stabilize Ca^{2+} and PO_4^- ions in body fluids and/or guide CaPO_4 deposition into receptive extracellular matrices [21–23]. Our results here demonstrate that expression of the human *LAMC2* chain in mice does not affect events associated with the pre-secretory stage of amelogenesis, consistent with what has been reported in other soft tissues where typical BMs are found [12,13]. However, it cannot compensate for the lack of mouse *LAMC2* during enamel maturation leading to major disruption. The organization of the enamel organ is severely altered and dystrophic organic matrix appears in the enamel layer and among cells of the enamel organ. Some of this dystrophic matrix shows similarities to the amyloid-like material found in calcifying epithelial odontogenic tumors, which calcifies in a concentric pattern [24–27]. Removal of the organic matrix is hampered, resulting in hypomineralized enamel that is soft, and abrades and chips readily. Patients with junctional epidermolysis bullosa due to LM-332 mutations also have similar tooth problems [28]. In the Dox-inducible human *LAMC2* transgene mouse model, structuring and functioning of the atypical BM is also affected,

resulting in loss of its permeability barrier capacity and inflow into enamel of exogenous molecules such as albumin. The distribution AMTN, ODAM and SCPPPQ1 is altered, and while some molecules may accumulate along the apical surface of the altered ameloblasts, others appear to diffuse away from the surface. There is also ectopic accumulation of these proteins between cells of the enamel organ. Altogether these results indicate that this transgenic model in which mouse *LAMC2* is substituted by the human form is capable of sustaining BM formation and rescue in various epithelial tissues but is unable to do so during the maturation stage of amelogenesis. While the generated phenotype is complex, the data suggest that improper structuring of the atypical BM at the interface between ameloblasts and maturing enamel is implicated in alterations that disrupt the maturation process and ultimately result in a significantly hypomineralized enamel layer. It could be argued that these dramatic effects may at least in part be related to the mice receiving Dox for prolonged periods. To eliminate this possibility, we have included a control WT group that was similarly exposed to Dox during gestation until sacrifice. The dentition of these mice showed none of the alterations seen in *LAMC2*-Dox mice. In addition, dental alterations resulting from therapeutic intake of Dox are rare and usually negligible [29–31].

The findings reported here are surprising because expression of the human *LAMC2* fully rescues the early lethality observed in absence of mouse *LAMC2*, and there are in general no epithelial complications. Yet, enamel maturation is perturbed in these transgenic mice. Several possibilities could account for the lack of compensatory function by the human *LAMC2*. Although the human and rodent *LAMC2* have quite high homology (~85%) [32,33], it cannot be excluded that the human form can have different biochemical characteristics than the mouse [34]. Indeed, the relatively small difference in their amino acid composition may be sufficient to affect its capacity to interact with the other BM molecules constituting the atypical BM, molecules that are not found in typical BMs. In fact, LM-332, ODAM, AMTN and SCPPPQ1 have all been immunodetected during maturation in the *LAMC2*-Dox mice but their presence and distributions are patchy, irregular, and not restricted to the cell-enamel interface. Alternatively, the cytokeratin 14 promoter used may not sustain high enough levels of *LAMC2* synthesis during maturation needed to achieve proper stoichiometric LM-332 assembly. Definite proof will require further studies looking at quantitative *LAMC2* expression levels as

compared to WT. As a consequence of these two scenarios, constituents may drift apart and assume altered distribution. Absence of a proper BM along the apical surface of ameloblasts may also affect their polarity, directionality of secretion and produce ectopic accumulations.

Finally, there may be a problem with processing of human *LAMC2* in the rescued transgenic *LAMC2*-Dox mice. Indeed, extracellular processing of the $\alpha 3$ and $\gamma 2$ chains appears to be essential for the correct integration and function of LM-332 in typical BM [35]. However, this appears unlikely since there are no apparent defects in epithelial tissues soft tissues elsewhere in the body [12,13]. In addition, BMs in the pre-secretory stage and those associated with the papillary layer and blood vessels during maturation appear normally structured. Such a problem could only therefore occur if there was a distinct, processing mechanism for the atypical BM.

While albumin is conspicuously found in most tissues, it is generally accepted that it is either absent or found in low abundance in enamel [16,36]. Its abnormal presence within the maturing enamel layer of *LAMC2*-Dox mice indicates that the selective permeability barrier normally assumed by the enamel organ and/or the atypical BM during enamel maturation is no longer functional [37–39]. Continued influx of exogenous organic materials would likely perturb the complex process of enamel maturation and result in the observed hypomineralized enamel. Albumin may also find its way in by incorporation of the intercellular matrix patches into the enamel layer. It has been reported that in some pathological conditions [40–42], there could be abnormal retention of albumin during the maturation stage which may inhibit crystal growth [36]. It therefore cannot be excluded that the excessive albumin detected in the *LAMC2*-Dox mice may in part derive from such a mechanism.

In conclusion, our mouse model expressing human *LAMC2* appears to represent a restricted functional knockout of LM-332 that has provided important information on the role of the atypical BM for proper enamel maturation. While the primary complication is at the level of the BM, the observed maturation phenotype is complex and secondary changes in ameloblast function may also be implicated. In addition, it has been reported that *LAMC2* is also expressed during the secretory stage of amelogenesis [6]. Although no readily apparent changes were noticed in this stage, the possibility that secretion of a human protein in larger quantities than normal in forming enamel may cause some alterations will need further attention. The *LAMC2*-

Dox mouse model may be further exploited by removing Dox to completely inhibit the expression of *LAMC2* while avoiding early lethality of mice. This, however, is likely to result in a more complex phenotype since all stages of amelogenesis would likely be affected. Novel tools using maturation stage-specific gene promoters, such as that for AMTN and/or ODAM, will need to be created to elucidate with more precise control the mechanisms at play for atypical BM assembly. All these models will provide a unique exciting opportunity to investigate the role the proper adhesion of the junctional epithelium on the onset of periodontal disease since an atypical BM is also implicated at this site [43]. Finally, this study brings attention to the fact that outcomes from humanized mouse models must be interpreted with caution [44,45], particularly that there is concern on the extent to which human DNA sequences can be adequately processed by the mouse transcriptional machinery [34].

II.7 – Experimental procedures

All procedures for mice handling were approved by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of Université de Montréal.

II.7.1 - Generation and genotyping of LAMC2-Dox mice

A viable mouse model of LM-332 deficiency has been developed which expresses a Dox-inducible human *LAMC2* transgene (*LAMC2* -Dox) under the cytokeratin 14 promoter on the *LAMC2* knockout background [12] (**Appendix Fig II.1**). *LAMC2* -Dox mice continuously received Dox in water (1 mg/ml with 5% sucrose, Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) or in rodent diet (3.5– 4.4 mg daily dose, Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) to induce the expression of human *LAMC2*. Gestating (day 14) female C57BL/6 mice received the same Dox rodent diet and newborn mice were maintained on the same diet for 8 weeks. Control mice also included C57BL/6 mice on regular diet. All mice were housed in a sterile, specific pathogen-free animal facility in which ventilated cages, water, food and bedding were autoclaved. An **appendix table II.1** clarify the animals diet and origin, and an **appendix figure II.2** explains why the penetrance of the *LamC2* phenotype don't allow to obtain WT animals.

Genotyping was done by PCR analysis of genomic DNA extracted from mouse tail clips, using the following primers: mouse *LAMC2* allele (5'AGCTAATACGGGTTTCAGCC3'

(forward) and 5'TGTAACCAGAAGCACATTCC3' (reverse)); human LAMC2 allele (5'AGGCTGTCCAACGAAATGGG3' (forward) and 5'GGAGCTGTGATCCGTACACCA3' (reverse)); and cytokeratin 14- rtTA gene (5' GTCCGATGGGAAAGTGTAGCCTG3' (forward) and 5'TTTCTTCTTTAGCGACTTGATGC3' (reverse)).

II.7.2 - Tissue preparation for light and electron microscopy and micro-computed tomography

Eight and 16-weeks old mice were anesthetized with 20% chloral hydrate solution (0.4 mg/g body weight; Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) and sacrificed by perfusion through the left ventricle with Ringer's lactate (Abbott Laboratories; Montreal, QC, Canada) for 30 s, followed by a fixative solution consisting of 4% paraformaldehyde (BDH; Toronto, ON, Canada) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences; Washington, PA) in 0.1 M. Laminin γ 2 knockout mice rescued with human protein exhibit defects phosphate buffer (PB, pH 7.2) for 10 min. Mandibles and maxillae from WT and LAMC2 -Dox were dissected and the specimens were immersed in the same fixative solution for 3 h. The samples were rinsed in 0.1 M PB (pH 7.2) overnight at 4 °C.

Samples were decalcified with 4.13% disodium ethylenediamine tetra-acetic acid (Fisher Scientific) for 21– 28 days. The decalcifying solution was changed each two days and then samples were washed for 24 h in 0.1 M PB buffer, pH 7.2. Some decalcified specimens were processed for paraffin embedding. Sections of 5- μ m in thickness were prepared with a Leica RM2155 microtome (Leica Microsystems Canada, Richmond Hill, ON, Canada) and mounted on Superfrost®/Plus slides (Fisher Scientific) and stained with hematoxylin and eosin for morphological analyses or processed for immunoperoxidase staining. Other specimens were processed for embedding in LR White resin (London Resin Company; Berkshire, UK). One micrometer thick semi-thin sections were cut with glass knives on a Reichert Jung Ultracut E ultramicrotome and stained with toluidine blue. Ultrathin 80–100 nm sections were cut with a diamond knife, transferred onto Formvar®-coated (polyvinyl formate) 200-mesh nickel grids, stained with 4% aqueous uranyl acetate for 8 min and with lead citrate for 2 min, and examined

at 80 kV with a FEI Tecnai 12 (FEI, Eindhoven, The Netherlands) transmission electron microscope.

Some hemimandibles were left calcified and were scanned with a desktop Micro-CT scanning system (SkyScan 1272, Bruker SkyScan, Aartselaar, Belgium). The scanner was operated at 70 kV/142 μ A with a resolution of 4.8 μ m/pixel and an aluminum filter of 0.5 mm. The sample rotated at 0.15°/step for 360° with an exposure time of 2 s/step during the scan period. The set of x-ray shadow images obtained from scanning was then reconstructed using the NRecon software (version 1.6.1.3, Bruker SkyScan). The CT-Analyzer software (version 1.10.0.1, Bruker Sky-Scan) was used for the creation of 3D models.

II.7.3 - Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 5- μ m thick sections mounted on Superfrost®/Plus slides. All steps were done at room temperature. Briefly, deparaffinized sections were blocked for 20 min, with a solution consisting of 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2), and 5% skim milk (Carnation; Nestle, Don Mills, ON, Canada). They were incubated for 3 h with either rabbit anti-rat ODAM (1:10,000) (Moffatt et al., 2008), anti-rat AMTN (1:2000) (Moffatt et al., 2006b), anti-rat SCPPPQ1 (1:2000) (Moffatt et al., 2014), anti-rat albumin (1:2000, ICN Pharmaceutical, Aurora, OH) or anti-human LM-332 (1:100, Abcam, Toronto, ON, Canada). Primary antibodies were washed with a solution consisting of 0.01 M PBS, pH 7.2, containing 0.05% Tween 20 (Fisher Scientific) (0.01 M PBS – Tween 20) for 30 min followed by treatment with the Dako EnVision™ + System, peroxidase kit (Dako Corporation, Carpinteria, CA) as recommended by the manufacturer. Visualization was performed with 3,3'-diaminobenzidine and sections were counterstained with methyl green (Dako Corporation). Sections were examined under an AxioImager M2 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Some sections were processed for immunofluorescence. Sections were blocked in PBS containing 5% skim milk for 1 h. They were then incubated with the AMTN, ODAM and SCPPPQ1 primary antibodies followed by a secondary goat-anti-rabbit-AlexaFluor 488 or 594 antibody (1:500, 1 h, Life Technologies™, Mississauga, ON, Canada). Following each step, the slides were washed three times for 10 min each with PBS-Tween (0.05% (v/v)). Sections

were then mounted in ProLong Gold containing DAPI (Life Technologies™) to stain nuclei. Negative controls included omission of primary antibody and incubation with pre-immune serum. Sections were examined under structured illumination microscopy the Elyra PS1 microscope (Carl Zeiss).

II.8 - Acknowledgments

We extend our thanks to Mrs. Katia Julissa Ponce (UdeM) for technical assistance and Dr. Martin Pellicelli (Shriners) for acquisition of the micro-CT scans and imaging. This study was supported in part by the Canadian Institutes of Health Research (grant no. MOP110972), the Network for Oral and Bone Health Research. PM is supported by the Shriners of North America. AF is supported by the Cellular Dynamics of Macromolecular Complexes NSERC-CREATE program. RMS was supported by National Heart, Lung, and Blood Institute/NIH P50 HL-29594 and the Alan A. and Edith L. Wolff Charitable Trust/Barnes-Jewish Hospital.

II.9 - References

- [1] A. Nanci, Enamel: Composition, Formation, and Structure, in: A. Nanci (Ed.), *Ten cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*, Mosby Elsevier, St-Louis 2007, pp. 141–190.
- [2] A. Nanci, S. Zalzal, P. Lavoie, M. Kunikata, W.Y. Chen, P.H. Krebsbach, Y. Yamada, L. Hammarström, J.P. Simmer, A.G. Fincham, M.L. Snead, C.E. Smith, *Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors*, J. Histochem. Cytochem. 46 (1998) 911–934.
- [3] M. Ekblom, M. Falk, K. Salmivirta, M. Durbeej, P. Ekblom, *Laminin isoforms and epithelial development*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 857 (1998) 194–211.
- [4] J.D. McGuire, M.P. Walker, V. Dusevich, Y. Wang, J.P. Gorski, *Enamel organic matrix: potential structural role in enamel and relationship to residual basement membrane constituents at the dentin enamel junction*, Connect. Tissue Res. 55 (Suppl. 1) (2014) 33–37.

- [5] S. Scheele, A. Nystrom, M. Durbeej, J.F. Talts, M. Ekblom, P. Ekblom, *Laminin isoforms in development and disease*, J. Mol. Med. (Berl.) 85 (2007) 825–836.
- [6] C. Sahlberg, M. Hormia, T. Airene, I. Thesleff, *Laminin gamma2 expression is developmentally regulated during murine tooth morphogenesis and is intense in ameloblasts*, J. Dent. Res. 77 (1998) 1589–1596.
- [7] T. Sawada, *Ultrastructural and immunocytochemical characterization of ameloblast-enamel adhesion at maturation stage in amelogenesis in Macaca fuscata tooth germ*, Histochem. Cell Biol. 144 (2015) 587–596.
- [8] M. Hormia, C. Sahlberg, I. Thesleff, T. Airene, *The epithelium-tooth interface—a basal lamina rich in laminin-5 and lacking other known laminin isoforms*, J. Dent. Res. 77 (1998) 1479–1485.
- [9] G. Walko, M.J. Castanon, G. Wiche, *Molecular architecture and function of the hemidesmosome*, Cell Tissue Res. 360 (2015) 529–544.
- [10] M.C. Ryan, K. Lee, Y. Miyashita, W.G. Carter, *Targeted disruption of the lama3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells*, J. Cell Biol. 145 (1999) 1309–1323.
- [11] X. Meng, J.F. Klement, D.A. Leperi, D.E. Birk, T. Sasaki, R. Timpl, J. Uitto, L. Pulkkinen, *Targeted inactivation of murine laminin gamma2-chain gene recapitulates human junctional epidermolysis bullosa*, J. Invest. Dermatol. 121 (2003) 720–731.
- [12] T.L. Adair-Kirk, G.L. Griffin, M.J. Meyer, D.G. Kelley, J.H. Miner, D.R. Keene, M.P. Marinkovich, J.M. Ruppert, J. Uitto, R.M. Senior, *Keratinocyte-targeted expression of human laminin gamma2 rescues skin blistering and early lethality of laminin gamma2 deficient mice*, PLoS One 7 (2012), e45546.
- [13] S.T. Kim, T.L. Adair-Kirk, R.M. Senior, J.H. Miner, *Functional consequences of cell type-restricted expression of laminin alpha5 in mouse placental labyrinth and kidney glomerular capillaries*, PLoS One 7 (2012), e41348.
- [14] M. Bei, S. Stowell, R. Maas, *Msx2 controls ameloblast terminal differentiation*, Dev. Dyn. 231 (2004) 758–765.

- [15] C.E. Smith, A. Nanci, *A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection*, *Anat. Rec.* 225 (1989) 257–266.
- [16] C. Robinson, S.J. Brookes, J. Kirkham, R.C. Shore, W.A. Bonass, *Uptake and metabolism of albumin by rodent incisor enamel in vivo and postmortem: implications for control of mineralization by albumin*, *Calcif. Tissue Int.* 55 (1994) 467–472.
- [17] P. Moffatt, C.E. Smith, R. St-Arnaud, D. Simmons, J.T. Wright, A. Nanci, *Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium*, *Biochem. J.* 399 (2006) 37–46.
- [18] P. Moffatt, C.E. Smith, R. St Arnaud, A. Nanci, *Characterization of apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia*, *J. Cell. Biochem.* 103 (2008) 941–956.
- [19] N.J. Dos Santos, R.M. Wazen, S. Kuroda, Z.S. Francis, P. Moffatt, A. Nanci, *Odontogenic ameloblast-associated and amelotin are novel basal lamina components*, *Histochem. Cell Biol.* 137 (2012) 329–338.
- [20] P. Moffatt, R.M. Wazen, J. Dos Santos Neves, A. Nanci, *Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline- glutamine-rich 1: A novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces*, *Cell Tissue Res.* 358 (2014) 843–855.
- [21] N.L. Huq, K.J. Cross, M. Ung, E.C. Reynolds, *A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4*, *Arch. Oral Biol.* 50 (2005) 599–609.
- [22] K. Kawasaki, K.M. Weiss, *Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 4060–4065.
- [23] K. Kawasaki, K.M. Weiss, *Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family*, *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 306 (2006) 295–316.

- [24] M. Miyake, S. Nagahata, J. Nishihara, Y. Ohbayashi, *Combined adenomatoid odontogenic tumor and calcifying epithelial odontogenic tumor: report of case and ultrastructural study*, J. Oral Maxillofac. Surg. 54 (1996) 788–793.
- [25] A. Yamaguchi, J.M. Kokubu, M. Takagi, G. Ishikawa, *Calcifying epithelial odontogenic tumor: histochemical and electron microscopic observations on a case*, Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 27 (1980) 129–135.
- [26] H.M. Amm, D.L. Rollins, C. Ren, J. Dong, P. DeVilliers, H. Rivera, M. MacDougall, *Establishment and characterization of a primary calcifying epithelial odontogenic tumor cell population*, J. Oral Pathol. Med. 43 (2014) 183–190.
- [27] A. Solomon, C.L. Murphy, K. Weaver, D.T. Weiss, R. Hrnčić, M. Eulitz, R.L. Donnell, K. Sletten, G. Westermark, P. Westermark, *Calcifying epithelial odontogenic (pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein*, J. Lab. Clin. Med. 142 (2003) 348–355.
- [28] W.Y. Yuen, A.M. Pasmooij, C. Stellingsma, M.F. Jonkman, *Enamel defects in carriers of a novel lama3 mutation underlying epidermolysis bullosa*, Acta Derm. Venereol. 92 (2012) 695–696.
- [29] M.E. Lochary, P.B. Lockhart, W.T. Williams Jr., *Doxycycline and staining of permanent teeth*, Pediatr. Infect. Dis. J. 17 (1998) 429–431.
- [30] S.R. Todd, F.S. Dahlgren, M.S. Traeger, E.D. Beltran- Aguilar, D.W. Marianos, C. Hamilton, J.H. McQuiston, J.J. Regan, *No visible dental staining in children treated with doxycycline for suspected rocky mountain spotted fever*, J. Pediatr. 166 (2015) 1246–1251.
- [31] B. Volovitz, R. Shkap, J. Amir, S. Calderon, I. Varsano, M. Nussinovitch, *Absence of tooth staining with doxycycline treatment in young children*, Clin. Pediatr. (Phila) 46 (2007) 121–126.
- [32] M.P. Marinkovich, P. Verrando, D.R. Keene, G. Meneguzzi, G.P. Lunstrum, J.P. Ortonne, R.E. Burgeson, *Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically identical*, Lab. Investig. 69 (1993) 295–299.

- [33] S. Sugiyama, A. Utani, S. Yamada, C.A. Kozak, Y. Yamada, *Cloning and expression of the mouse laminin gamma 2 (b2t) chain, a subunit of epithelial cell laminin*, Eur. J. Biochem. 228 (1995) 120–128.
- [34] A. Devoy, R.K.A. Bunton-Stasyshyn, V.L.J. Tybulewicz, A.J.H. Smith, E.M.C. Fisher, *Genomically humanized mice: technologies and promises*, Nat. Rev. Genet. 13 (2012) 14–20.
- [35] P. Rousselle, K. Beck, *Laminin 332 processing impacts cellular behavior*, Cell Adhes. Migr. 7 (2013) 122–134.
- [36] C. Robinson, J. Kirkham, S.J. Brookes, R.C. Shore, *The role of albumin in developing rodent dental enamel: A possible explanation for white spot hypoplasia*, J. Dent. Res. 71 (1992) 1270–1274.
- [37] A. Nanci, S. Zalzal, C.E. Smith, *Application of backscattered electron imaging and lectin-gold cytochemistry to visualize the distribution of glycoconjugates in a basal lamina*, Scanning Microsc. 1 (1987) 1963–1970.
- [38] A. Nanci, S. Zalzal, Y. Kogaya, *Cytochemical characterization of basement membranes in the enamel organ of the rat incisor*, Histochemistry 99 (1993) 321–331.
- [39] M.D. McKee, H. Warshawsky, *In vivo experimentation on rat incisor enamel organs through a surgical window*, Anat. Rec. 210 (1984) 693–705.
- [40] J. Kirkham, C. Robinson, S.M. Strafford, R.C. Shore, W.A. Bonass, S.J. Brookes, J.T. Wright, *The chemical composition of tooth enamel in junctional epidermolysis bullosa*, Arch. Oral Biol. 45 (2000) 377–386.
- [41] C. Robinson, *Enamel maturation: A brief background with implications for some enamel dysplasias*, Front. Physiol. 5 (2014) 388.
- [42] K. Jedeon, M. De la Dure-Molla, S.J. Brookes, S. Loiodice, C. Marciano, J. Kirkham, M.C. Canivenc-Lavier, S. Boudalia, R. Berges, H. Harada, A. Berdal, S. Babajko, *Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol a*, Am. J. Pathol. 183 (2013) 108–118.

- [43] D.D. Bosshardt, N.P. Lang, *The junctional epithelium: from health to disease*, J. Dent. Res. 84 (2005) 9–20.
- [44] J. Seok, H.S. Warren, A.G. Cuenca, M.N. Mindrinos, H.V. Baker, W. Xu, D.R. Richards, G.P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C.C. Finnerty, C.M. Lopez, S. Honari, E.E. Moore, J.P. Minei, J. Cuschieri, P.E. Bankey, J.L. Johnson, J. Sperry, A.B. Nathens, T.R. Billiar, M.A. West, M.G. Jeschke, M.B. Klein, R.L. Gamelli, N.S. Gibran, B.H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S.E. Calvano, P.H. Mason, J.P. Cobb, L.G. Rahme, S.F. Lowry, R.V. Maier, L.L. Moldawer, D.N. Herndon, R.W. Davis, W. Xiao, R.G. Tompkins, *Inflammation, Host Response to Injury*, L. S. C. R. P., *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110 (2013) 3507–3512.
- [45] H.S. Warren, R.G. Tompkins, L.L. Moldawer, J. Seok, W. Xu, M.N. Mindrinos, R.V. Maier, W. Xiao, R.W. Davis, *Mice are not men*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112 (2015), E345

II.10 – Figures legends

Fig. II.1: Comparative micro-CT views of hemimandibles from wild type (WT, **A-C**) and human *Lamc2*-rescued transgenic mice (*Lamc2*-Dox) (**D-F**) mice. **A, D** tomographic reconstructions; **B, E**, sagittal sections; **C, F**, cross-sectional views taken at matching physical locations. Visual inspection (**insets in A and D**) in live mice reveals the presence of chalky enamel patches on the erupted portion of incisors in *Lamc2*-Dox mice (**D, inset**). Molars from these mice are excessively abraded and cuspal surfaces (arrowheads) are flattened (**D, F**). Enamel in *Lamc2*-Dox mice is hypomineralized (**E, F**) and frequently flakes off (*) at incisor tips (**D, E**). Note the augmented periodontal space (arrows) on the labial aspect of the incisor. ABC, Alveolar bone crest.

Fig. II.2: During amelogenesis, there is a typical basement membrane along the apical surface of differentiating ameloblasts while during the maturation stage an atypical one is recreated at the interface between of ameloblasts and enamel. There is no difference in the pre-secretory histology between wild type (WT) and human *Lamc2*-rescued transgenic mice (*Lamc2*-Dox) (compare **A** with **C**). However, in the maturation stage, the *Lamc2*-dox mouse exhibits dramatic differences (compare **B** with **D**); the organization of the enamel organ is disrupted and there is residual enamel matrix through maturation. Toluidine blue stained sections.

Fig. II.3: Photomicrographs from hematoxylin and eosin stained histological sections of *Lamc2*-Dox mice incisors. Entering the maturation stage, ameloblasts gradually lose their columnar appearance, the enamel organ becomes disorganized and its individual cell layers are eventually

no longer discernable (**A**). Cystic spaces containing loose organic material (*, **B**) and/or patches dystrophic matrix (arrowheads, **C**) with variable appearance can be found between the disrupted enamel organ and the enamel surface. Some organic matrix also accumulates among cells of the enamel organ (arrows, **C**). Organic matrix persists well beyond the gingival margin (**D**).

Fig. II.4: Transmission electron micrographs of *Lamc2*-Dox mice incisors. In these human LAMC2 rescued mice, the typical basal membrane (BM) separating differentiating ameloblasts from the forming mantle dentin during the pre-secretory stage (**A, inset**), and that associated with blood vessels and the papillary layer (**B**) during the maturation stage appears normal. On the other hand, the interface between ameloblasts and maturing enamel is generally disrupted. Dystrophic organic matrix frequently accumulates along the apical surface of ameloblasts and sometimes extends between the cells (*, **C-E**). In these decalcified preparations, disorganized 'crystal ghost' profiles can be found (**E, inset**). Occasionally, when there is no intervening, dystrophic matrix, a thin 'fuzzy' layer or material (**F**) is present along the cell surface. In general, no well-defined atypical BM structure can be identified during the maturation stage in these *Lamc2*-Dox mice.

Fig. II.5: Immunolocalization of laminin-332. In wild type mice (WT), a discrete immunolabeling is present along the apical surface of ameloblasts where an atypical basement membrane (aBM) is found (**A**). In human *Lamc2*-rescued transgenic (*Lamc2*-Dox) mice, the organization of the enamel organ is severely disrupted; while groups of cells are immunoreactive (arrowheads) confirming expression of the transgene, in general, there is little or no staining at the interface between the cells and enamel (**B**). However, in soft epithelial tissues, the BM region

between epithelial cells and the underlying connective tissue conspicuously labeled (**C**, arrows). Altogether, these data suggest that there is a problem with aBM assembly during the maturation stage in *Lamc2*-Dox mice. Counterstain is methyl green.

Fig. II.6: Immunolocalization of albumin in wild type (WT, **A-B**) and human *Lamc2*-rescued transgenic (*Lamc2*-Dox) mice (**C-D**). In both cases, albumin was found among the cells of the enamel organ and in cells of the papillary layer. No significant staining for albumin is normally seen in maturing enamel of wild type mice (**A, B**) but it is detected in the enamel matrix of *Lamc2*-Dox mice (**C, D**). Counterstain is methyl green.

Fig. II.7: Immunohistochemical preparations for amelotin (AMTN, **A-B**), odontogenic ameloblast-associated (ODAM, **C-D**) and secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1 (SCPPPQ1, **E-F**) during maturation in *Lamc2*-Dox mice incisors. All three proteins are present at the interface between the enamel organ and maturing enamel but the labeling is irregular and somewhat diffuse. They are also conspicuously found as patches among the cells of the enamel organ (arrowheads). **A, C, E**, immunoperoxidase; **B, D, F**, immunofluorescence preparations observed by structured illumination microscopy (SIM). Counterstain in **A, C, E** is methyl green. Nuclei are stained in blue in **B, D, F**.

II.11 - Figures

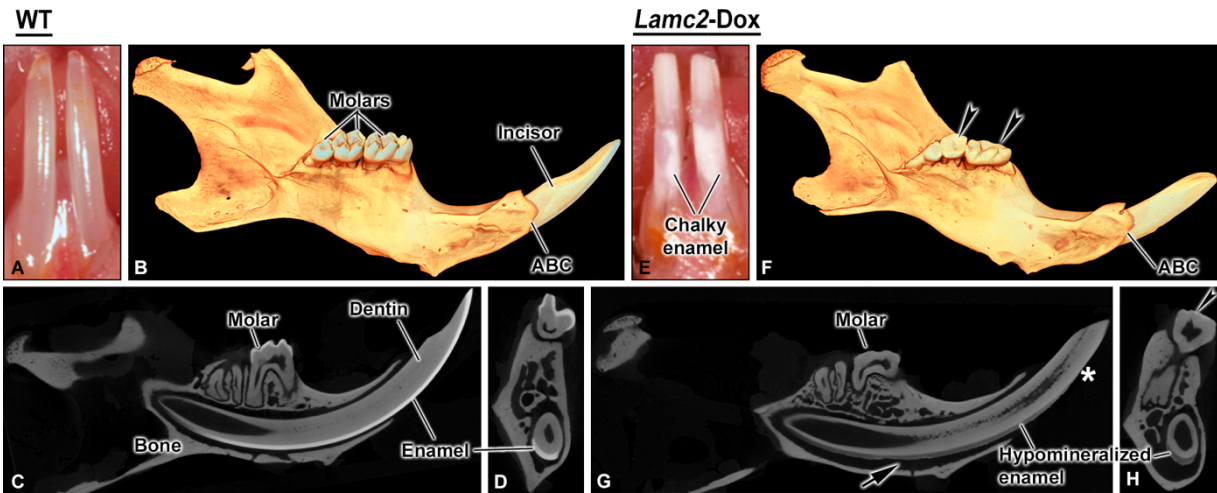


Figure II.1 : Comparative micro-CT views of hemimandibles from wild type (WT) and human *Lamc2*-rescued transgenic mice (*Lamc2-Dox*) mice

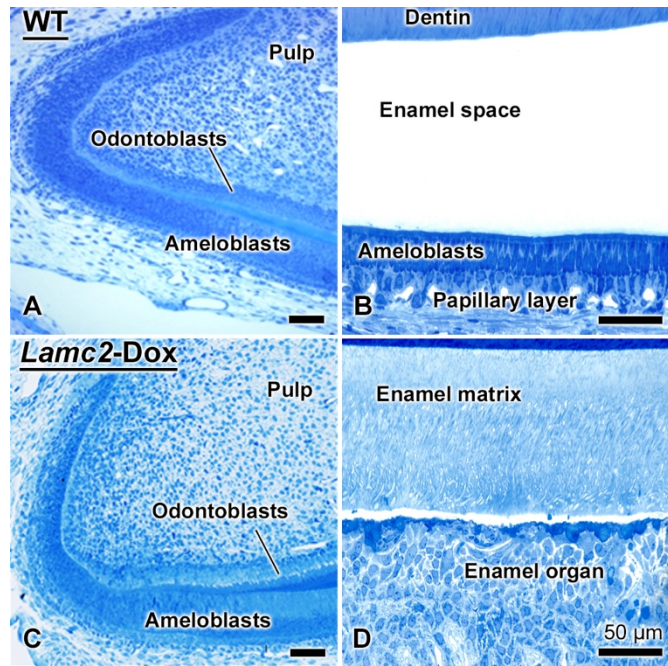


Figure II.2 : Comparative amelogenesis wild-type (WT) and human *Lamc2*-rescued transgenic mice (*Lamc2*-Dox) mice

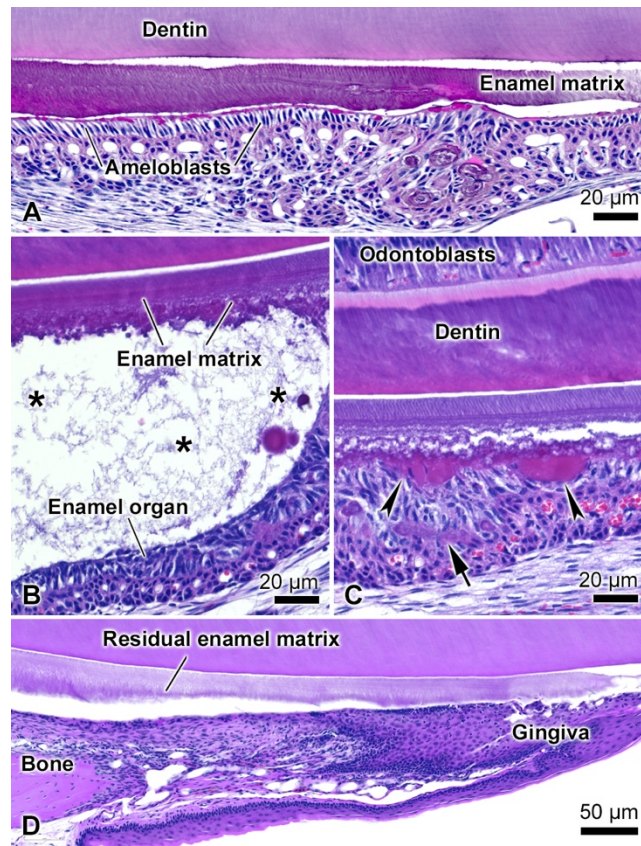


Figure II.3 : Photomicrographs from hematoxylin and eosin stained histological sections of *Lamc2*-Dox mice incisors

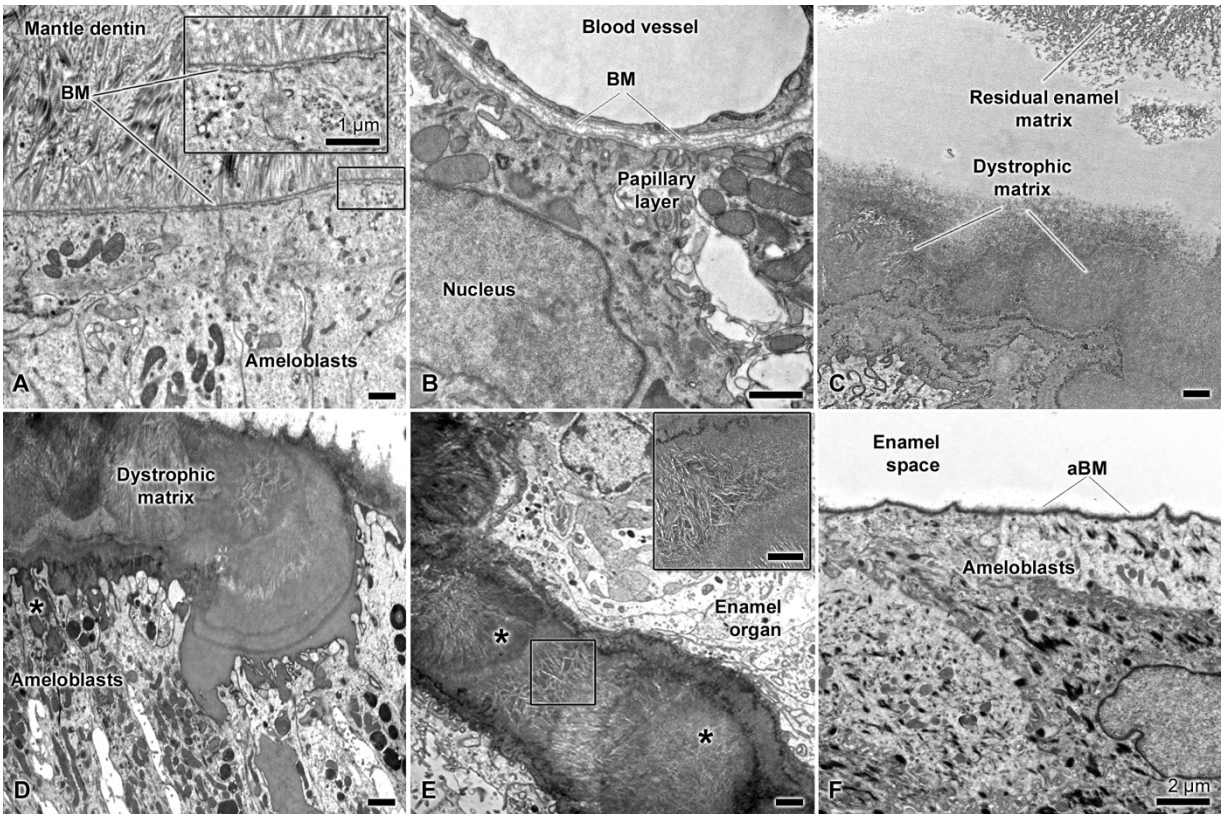


Figure II.4 : Transmission electron micrographs of *Lamc2*-Dox mice incisors

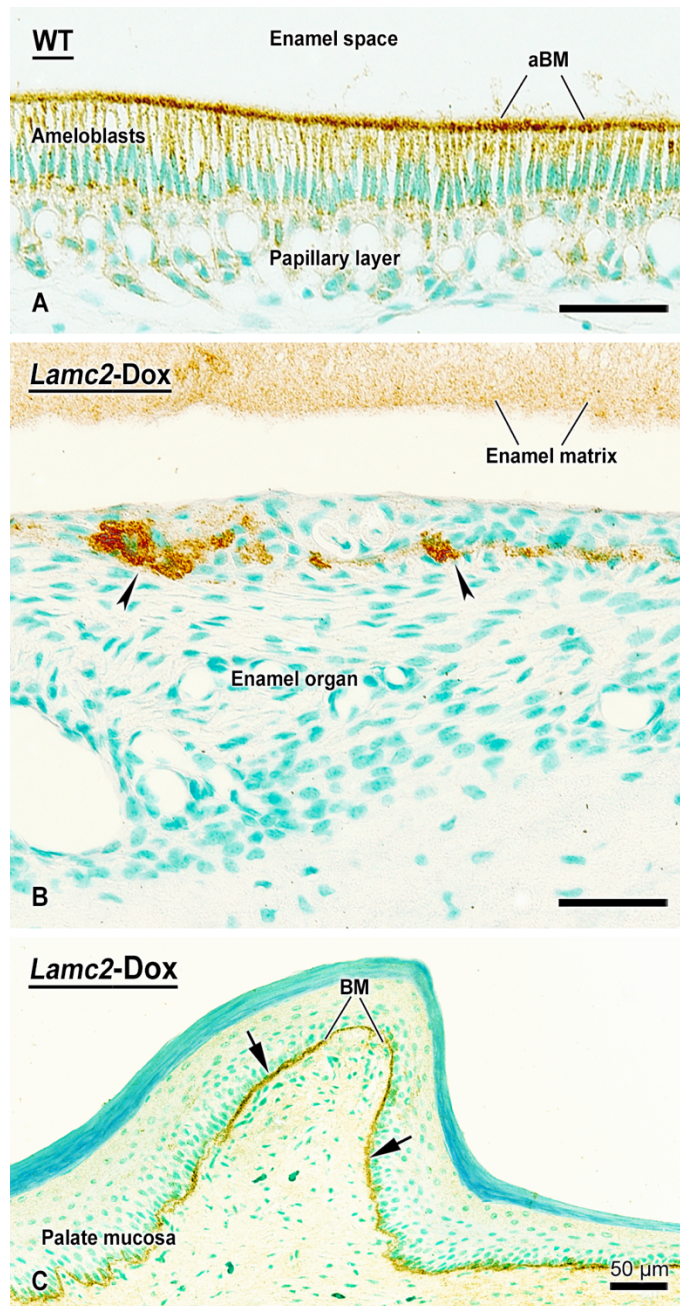


Figure II.5 : Immunolocalization of laminin-332

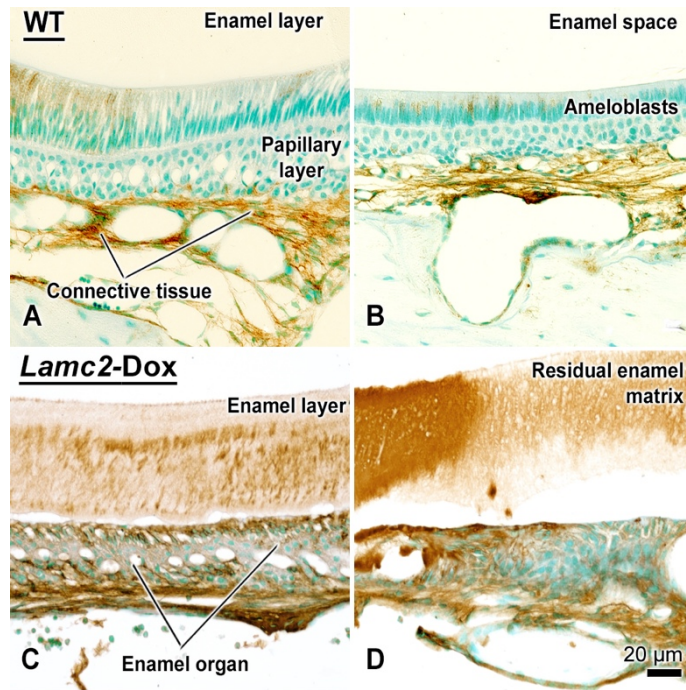


Figure II.6 : Immunolocalization of albumin in wild type (WT) and human *Lamc2*-rescued transgenic (*Lamc2*-Dox) mice

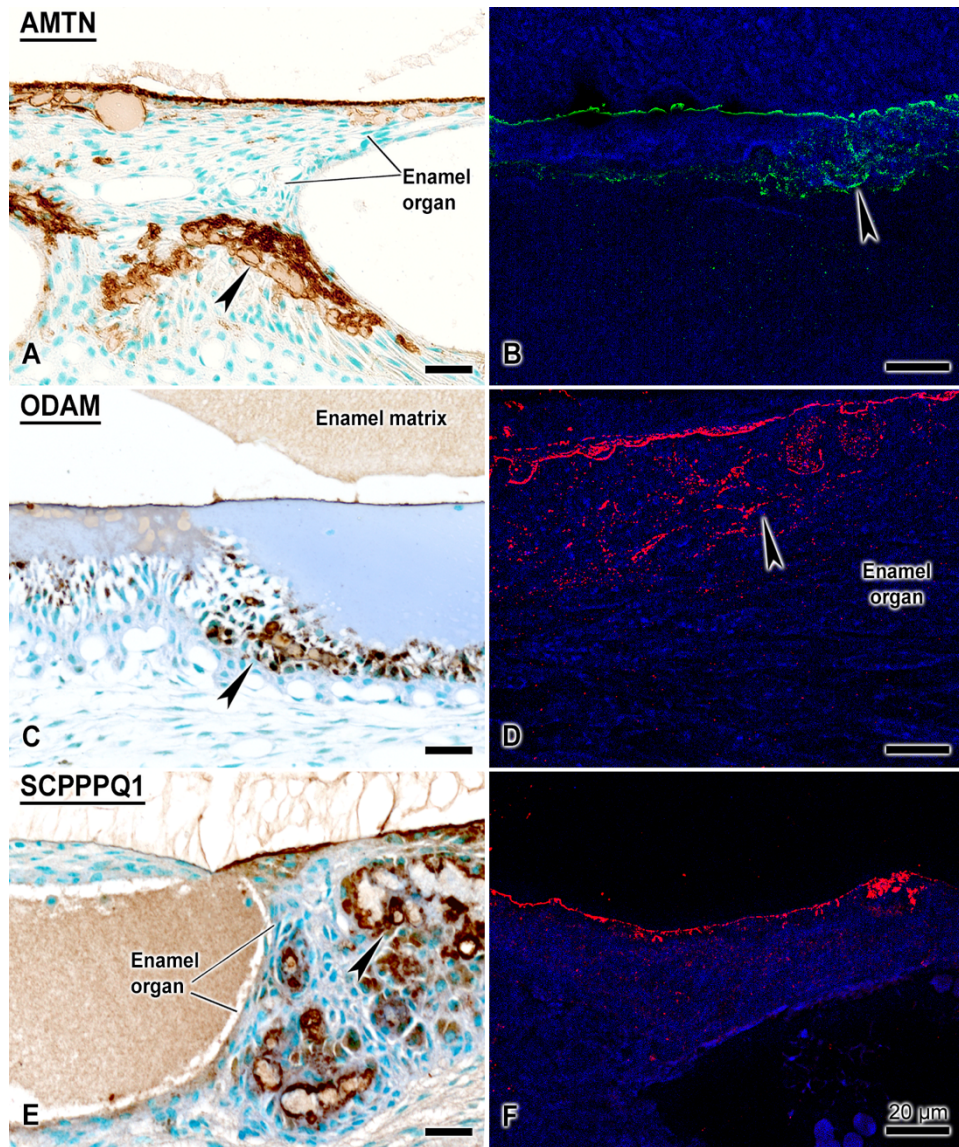
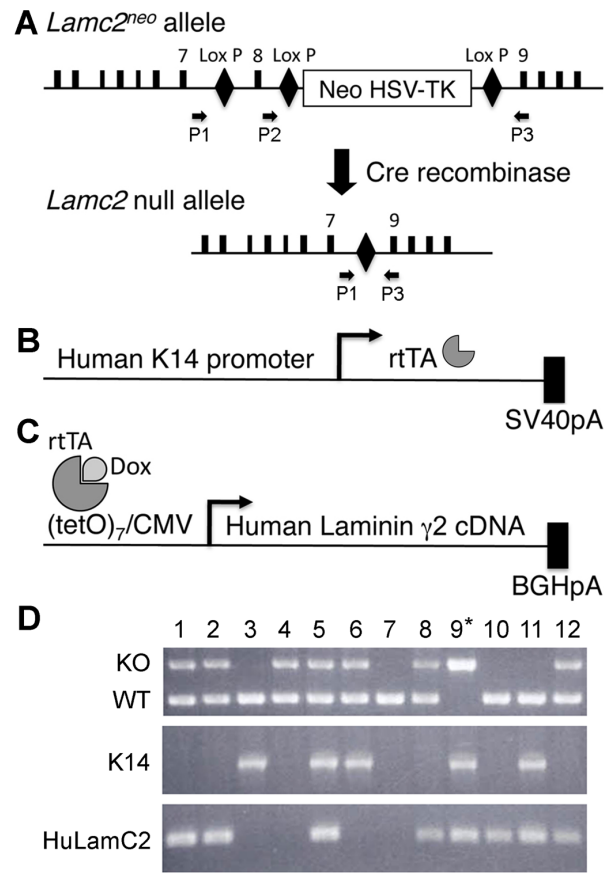


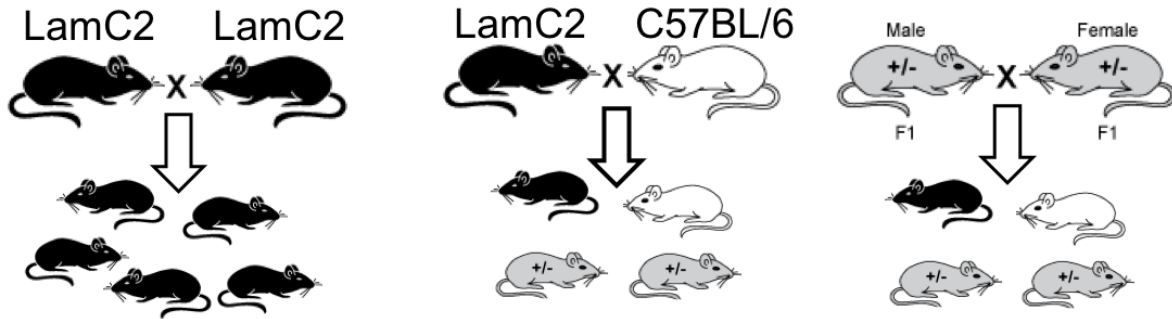
Figure II.7 : Immunohistochemical preparations for amelotin (AMTN), odontogenic ameloblast-associated (ODAM) and secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1 (SCPPPQ1) during maturation in *Lamc2*-Dox mice incisors

II.12 – Appendix



Appendix figure II.1 : Représentation schématique de l'allèle *LamC2* et des transgènes utilisés dans l'article original

Adair-Kirk TL, Griffin GL, Meyer MJ, Kelley DG, Miner JH, et al. (2012) Keratinocyte-Targeted Expression of Human Laminin c2 Rescues Skin Blistering and Early Lethality of Laminin c2 Deficient Mice. PLoS ONE 7(9): e45546. doi:10.1371/journal.pone.0045546



Appendix figure II.2 : Différentes façon de générer des modèles *LamC2*

La pénétrance du phénotype *LamC2* ne permet pas l'obtention d'animaux sauvage lorsque l'on croise les animaux transgéniques

Animals	Age	Diet	Sacrificed at	References
LAMC2-Dox (generated)	newborn	continuously Dox	8 and 16 weeks old	Adair-Kirk TL, Griffin GL, Meyer MJ, Kelley DG, Miner JH, et al. (2012) Keratinocyte-Targeted Expression of Human Laminin c2 Rescues Skin Blistering and Early Lethality of Laminin c2 Deficient Mice. PLoS ONE 7(9): e45546. doi:10.1371/journal.pone.0045546
C57BL/6 (commercial)	newborn or 14 days	8 weeks Dox		
C57BL/6 (commercial)	newborn	regular		

Appendix table II.1 : Clarification of the animal models used and of their diet

Chapitre III – Second article scientifique - *Interactions of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins of a specialized basal lamina that attaches epithelial cells to tooth mineral*

III.1 – Description de l'article et contribution des auteurs

Le but de cet article, publié en avril 2017 dans *Scientific Reports*, est d'apporter des informations biochimiques et structurales sur les protéines composant la LBS : AMTN, ODAM et SCPPPQ1. Dans un premier temps, nous avons localisé avec précision les protéines tridimensionnellement au sein de la LBS en utilisant la microscopie super-résolution de fluorescence en mode SIM. Vu que les protéines localisent au même endroit, nous avons par la suite utilisé la même technologie en faisant du double marquage pour observer la présence des protéines au même moment au sein d'un même tissu. Ces observations ont été confirmées en microscopie électronique à transmission en utilisant un double marquage avec des billes d'or sur des coupes de tissu. Cette visualisation à haute résolution a permis d'établir un profil de distribution des protéines au sein de la LBS. Ceci met en avant une présence plus importante d'ODAM du côté des cellules alors qu'AMTN et SCPPPQ1 se retrouvent plus du côté de la dent.

Enfin, vu que les protéines co-localisent, nous avons démontré par double hybride bactérien ou co-immunoprécipitation qu'elles ont la capacité d'interagir entre elles mais aussi avec elles-mêmes. Enfin, vu que nous avons la capacité de produire et purifier les protéines, nous avons dans un premier temps observé que leurs structures secondaires possédaient une portion importante désorganisée par dichroïsme circulaire, puis nous avons caractérisé leur structure tertiaire/quaternaire par AFM et MET. Nous avons observé que les protéines ont la capacité d'interagir avec elles-mêmes en formant des complexes globulaires excepté pour SCPPPQ1 qui forme des filaments. Enfin de manière intéressante, cette étude a mis en avant la possibilité de former un réseau supramoléculaire en mixant les 3 protéines ensemble. Ce réseau est très semblable à des réseaux de LB typique reportés dans la littérature [129].

Enfin l'ensemble de ces études a mené à un modèle afin de positionner les protéines en fonction de leurs distributions observées lors de ces études.

Pour cet article, avec la supervision principale de Dr Nanci, j'ai participé à la mise en place des expériences, de l'interprétation des résultats et dans l'écriture du manuscrit. J'ai effectué la majorité des expériences. Dr Juliana Dos Santos Neves a effectué les données sur le « Nearest Neighbour Analysis ». Charline Mary a effectué les constructions des plasmides nécessaires pour les expériences de double hybride bactérien et de production des protéines. Jean-Daniel Castonguay a participé aux études de double hybride bactérien en tant qu'étudiant d'été. Dr Baron et Dr Moffatt ont été d'un grand support technique et scientifique. Tous les auteurs ont validé le manuscrit avant sa soumission.

Interactions of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins of a specialized basal lamina that attaches epithelial cells to tooth mineral

Aurélien Fouillen^{1,2}, Juliana Dos Santos Neves¹, Charline Mary², Jean-Daniel Castonguay¹, Pierre Moffatt³, Christian Baron², Antonio Nanci^{1,2*}

¹ Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, and ² Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, and ³ Shriners Hospital for Children, Montréal, Québec, Canada.

*Corresponding author: Antonio Nanci

Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials,
Department of Stomatology, Faculty of Dentistry,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada
e-mail: antonio.nanci@umontreal.ca

Scientific Reports; 7:46683

Published: Apr 24, 2017

doi: 10.1038/srep46683.

<https://www.nature.com/articles/srep46683>

III.2 - Abstract

A specialized basal lamina (sBL) mediates adhesion of certain epithelial cells to the tooth. It is distinct because it does not contain type IV and VII collagens, is enriched in laminin-332, and includes three novel constituents called amelotin (AMTN), odontogenic ameloblast-associated (ODAM), and secretory calcium-binding phosphoprotein proline-glutamine rich 1 (SCPPPQ1). The objective of this study was to clarify the structural organization of the sBL. Fluorescence and immunogold labeling showed that they co-localize. Quantitative analysis of the relative position of gold particles on the sBL demonstrates that the distribution of ODA M is skewed towards the cell while that of AMTN and SCPPPQ1 tends towards the tooth surface. Bacterial two-hybrid analysis and co-immunoprecipitation, gel filtration of purified proteins and transmission electron and atomic force microscopies highlight the propensity of AMTN, ODA M, and SCPPPQ1 to interact with and among themselves and form supramolecular aggregates. These data suggest that AMTN, ODA M and SCPPPQ1 participate in structuring an extracellular matrix with the distinctive capacity of attaching epithelial cells to mineralized surfaces. This unique feature is particularly relevant for the adhesion of gingival epithelial cells to the tooth surface, which forms a protective seal that is the first line of defense against bacterial invasion.

III.3 - Keywords

Junctional epithelium, Ameloblast, Basal lamina, Protein-protein interactions, Structural analysis

III.4 - Introduction

Basal laminae (BLs) act as an interface between epithelial cells and the underlying connective tissue, and comprise collagen types IV and VII, proteoglycans, and glycoproteins such as laminins¹⁻³. They provide tissue boundaries and structural support, influence cellular organisation, serve as physical barriers and mediate intracellular signaling cascades⁴. In the tooth, a specialized BL (sBL) binds epithelial cells to mineralized surfaces rather than connective tissue, thereby creating secluded environments that are critical for mineralization and for protection of the tooth supporting tissues from the aggressive oral environment^{5,6}.

The epithelial enamel organ (EO) is associated with the formation of the hardest mineralized matrix in the human body, tooth enamel. The EO is comprised of cells called ameloblasts that have a complex life cycle with distinct stages. During the pre-secretory stage, a typical BL separates differentiating ameloblasts and differentiating odontoblasts from the forming mantle dentin matrix⁷. This BL is removed just before progressing into the subsequent secretory stage during which the active deposition of enamel proteins guides the formation, organization and partial mineralization of the entire enamel layer. Next, at the onset of the maturation stage, ameloblasts deposit a sBL along their apical surface. The sBL attaches the apical surface of ameloblasts to maturing enamel surface forming a confined space for enzymatic degradation of proteins that will permit enamel crystal expansion in thickness and width⁸. This sBL has an atypical composition; it does not contain γ 1 chain-containing laminins and collagen types IV and VII^{2,3}, but is enriched in laminin-332 (LM-332)⁹⁻¹¹. Once enamel has fully completed its mineralization, the tooth erupts and part of the EO covering the tooth crown fuses with the oral epithelium. This fusion results in the formation of a structure called junctional epithelium (JE), which adheres to the tooth surface through a sBL similar in composition to that found in the maturation stage EO. The JE is a specialized portion of the gingiva that seals off the tooth supporting tissues from the aggressive oral environment. As such, it forms an epithelial barrier against bacterial invasion and thus represents the first line of defense against periodontal disease (PD)^{6,12}. The mechanisms by which the JE adheres to the tooth surface, via the sBL, are still poorly understood.

Transcriptomic screens of rat and mice EOs have led to the discovery of three genes encoding novel proteins named amelotin (AMTN), odontogenic ameloblast-associated (ODAM), and secretory calcium-binding phosphoprotein proline-glutamine rich 1 (SCPPPQ1)¹³⁻¹⁶. These genes are members of the secretory calcium-binding phosphoprotein (SCPP) gene cluster and the encoded proteins are evolutionarily related to SPARC, a well-known matricellular protein that participates in the assembly of typical BLS¹⁷⁻¹⁹. Proteins from this cluster stabilize calcium and phosphate ions in tissue fluids and regulate their deposition in extracellular matrix, although this has not been formally determined for AMTN, ODA M and SCPPPQ1. They are produced by maturation stage ameloblasts and JE cells, and high-resolution immunogold analysis revealed that the three proteins localize to the sBL^{16,20,21}. As such, they likely participate in structuring the supramolecular architecture of the sBL. Since AMTN, ODA M and SCPPPQ1 are unique to the sBL, they appear crucial to structuring this special extracellular matrix and to mediating the adhesion of epithelial cells to tooth surfaces. In support of this notion, recent reports have shown JE detachment in ODA M-KO mice and loss of integrity of the maturation stage sBL in a transgenic mouse model expressing human laminin- γ 2²²⁻²⁴.

A yeast two-hybrid (YTH) analysis has demonstrated that bovine ODA M and AMTN proteins interact but nothing is known about the behaviour of SCPPPQ1²⁵. There is also no quantitative evaluation of their interacting capacity nor any structural information on the resulting aggregates. Such information is a prelude for understanding the mechanisms that are implicated in structuring the sBL and its adhesion to mineralized surfaces.

The objective of our study was to analyse the relative distribution of AMTN, ODA M and SCPPPQ1 in the sBL, the interactions of their human forms, and the structure of the resulting assemblies. Bacterial two-hybrid analysis (BTH) and both transmission electron (TEM) and atomic force (AFM) microscopy demonstrate the propensity of all 3 molecules to interact as homo- as well as heteromultimers. Immunofluorescence, immunogold labeling and Nearest Neighbour Analysis suggest that the distribution of ODA M within the sBL is skewed towards the cell, while AMTN and SCPPPQ1 tend to localize towards the tooth surface. Altogether, these data suggest that AMTN, ODA M, and SCPPPQ1 interact to structure a specialized

macromolecular complex capable of binding to on one side to epithelial cells and on the other to tooth mineral.

III.5 - Results

III.5.1 - Spatial distribution of AMTN, ODAM, and SCPPPQ1 in the sBL

The JE (**Fig III.1A**) and EO consist of a multiple cell layer bordering enamel, seen as a space following decalcification. As for all basal laminae, the sBL is not readily visible in conventional histological preparations and must be revealed by histochemical methods such as immunostaining. Here we have applied structured illumination microscopy (SIM) to visualize the three-dimensional localization of AMTN, ODAM, and SCPPPQ1 at the cell-tooth interface (**Fig III.1B-D**). Dual fluorescence and colloidal gold immunolabelings were then used to better define their relationship within the sBL. The use of fixation and blocking steps between antibody incubations make it possible to achieve dual labelings on the same face of the tissue section using antibodies from the same species²⁶. This approach shows that the three proteins undisputedly co-localize in the sBL of JE (**Fig III.2**) and of maturation stage ameloblasts (**Fig III.3A-B**). Nearest-Neighbour Analysis (NNA) was carried on single immunogold labeling preparations to obtain quantitative information on the relative distribution of each protein within the sBL. This powerful analytical method is used to determine the spatial distribution of objects relative to a reference point, in our case the position of colloidal gold particles with respect to the cell surface (**Fig III.3C**). NNA revealed that the distribution of ODAM within the sBL is skewed toward the cell, while AMTN and particularly the smaller molecular weight SCPPPQ1 tend to localize more towards the tooth surface (**Fig III.3D**).

III.5.2 - Analysis of the secondary structure of AMTN and ODAM

To evaluate the secondary structures of recombinant human ODAM (hODAM) and human AMTN (hAMTN) overproduced and purified from *E. coli*, we have used circular dichroism (CD) spectroscopy²⁷. CD spectra were determined across a range of concentrations, with representative spectra of 5 μ M hAMTN and 10 μ M hODAM solutions shown here (**Fig III.S1**). Analysis of these spectra using the CDSSTR method²⁸ from Dichroweb²⁹ indicated that hAMTN

is comprised of 40% β -sheet, 12% turns, and 44% largely disordered regions. hODAM is also largely disordered (47%) and is comprised of 35% β -sheets and 13% turns. Interestingly, combining hODAM and hAMTN reduced the degree of disorder while significantly increasing the amount of α -helices (54%), suggesting conformational changes upon mixing and interactions between these proteins (**Fig III.S1**).

III.5.3 - Protein-protein interaction studies

Given their close proximity within the sBL and the general behaviour of flexible proteins, we have examined the propensity of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 to interact. A number of complementary approaches were used here to achieve biochemical, visual, and quantitative corroborative data. The BTH assay was applied to assess interaction in a quantitative in vivo model. Different combinations of fusions of the three proteins to domains of adenylate cyclase were co-expressed in adenylate cyclase-negative *E.coli* BTH101 cells. Interactions leading to restoration of adenylate cyclase enzyme activity were measured using cAMP-inducible β -galactosidase activity. All combinations tested yielded enzymatic activity albeit at variable levels. Irrespectively, as illustrated by the histogram in **Fig III.4A**, hODAM-hSCPPPQ1 and hODAM-hAMTN exhibit a stronger potential for interaction while hAMTN-hSCPPPQ1 show a lesser one. Noteworthy, hSCPPPQ1 shows the highest propensity for self-interaction among the three proteins. To evaluate the potential that interactions differ between species, we have also carried out BTH analysis with the rat homologs that have ~20% difference in amino acid composition^{16,30,31}. Essentially, no qualitative difference of the capacity to interact was observed when homologous or heterologous interactions between rat and human proteins were tested, as exemplified by AMTN (**Fig III.S2**). Interactions revealed by two-hybrid assays must be confirmed and validated using an alternative approach. To this effect, we also performed co-immunoprecipitation on *E. coli* BL21(DE3)-star lysates used for the co-expression of the proteins. The three proteins were pulled down with each of the three specific antisera, hence validating our BTH results (**Fig III.4B**).

III.5.4 - Gel filtration characterization of AMTN and ODAM

To further characterize the supramolecular assemblies formed by AMTN and ODAM proteins, we have over-expressed the full-length recombinant human proteins lacking their N-terminal signal sequence in *E. coli* BL21(DE3)-star and purified them by Ni²⁺ affinity chromatography. The elution profile of size exclusion chromatography revealed that recombinant hODAM (~32 kDa) was found in the high molecular weight fraction of ~ 400kDa (**Fig III.S3A**), equivalent to an aggregate of 12-13 subunits. hAMTN (~21 kDa) formed aggregates having a molecular mass of around 110 kDa (**Fig III.S3B**), equivalent to a pentamer. SDS-PAGE confirmed that proteins in the gel filtration fractions of hODAM and hAMTN correspond to expected molecular masses and demonstrate the purity of the samples (**Fig III.S3C and D**). Study of recombinant rat homologs revealed similar gel filtration profiles, demonstrating that protein behaviour is not species-dependent (data not shown).

III.5.5 - Structural characterization of supramolecular complexes formed by AMTN, ODAM and SCPPPQ1

Negative staining TEM and AFM were applied to visualize the shape of recombinant hODAM and hAMTN proteins collected in the gel filtration fractions. In each case using TEM, globular structures were observed (**Fig III.5A-B**), with diameters ranging from 18.6 to 27.4 nm with a mean of 22.31 ± 3.5 nm ($n = 50$) for hAMTN, and from 24.3 to 36.9 nm with a mean of 30.26 ± 3.8 nm ($n = 50$) for hODAM. Interestingly, when both proteins were combined, larger globular structures formed, the diameters of which now ranged from 19.8 to 74.1 nm with a mean of 44.08 ± 12.13 nm ($n = 50$) (**Fig III.5C**). Cryo-TEM imaging of the proteins in their native state (**Fig III.5A-B Insets**) and AFM that relies on protein interaction with the Highly Ordered Pyrolytic Graphitic (HOPG) substrate (**Fig III.5D-F**) validate the globular nature of aggregates. Because SCPPPQ1 requires urea to be solubilized and AFM tolerates the presence of some denaturing buffer, SCPPPQ1 alone and the mix of the three proteins were observed by AFM. By itself SCPPPQ1 formed linear profiles while, in the presence of both AMTN and ODAM, it generated a porous network (**Fig III.6**).

III.6 - Discussion

Three proteins -AMTN, ODAM, and SCPPPQ1- have been identified as novel constituents of the sBL that mediates attachment of epithelial cells to tooth surfaces^{15,16,31}. As knowledge of physical behaviour of proteins is fundamental in defining their role and function, we have applied a complement of biochemical and imaging approaches to better define their distribution within the sBL, their propensity to interact and form supramolecular aggregates, and the structure of resulting molecular assemblies.

III.6.1 - ODAM, AMTN and SCPPPQ1 are differential distributed across the sBL

Our results show that AMTN, ODAM, and SCPPPQ1 assume a differential distribution within the sBL. The preferential presence of ODAM near the cell surface suggests that it participates in defining the face of the sBL that mediates its anchoring to the epithelial cells (ameloblasts, gingival cells). On the other hand, the tendency of AMTN and SCPPPQ1 to predominate on the opposite side of the sBL places them in a position to potentially play a role in binding of the sBL to the tooth surface. However, the fact that (a) the ODAM-KO does not show a phenotype during the maturation stage and only shows a partial delamination of the JE²², and that (b) the AMTN-KO mice show no detachment of both maturation stage ameloblasts and JE cells³² indicate that the situation is more complex and that there may be other bridging molecules implicated in the process. In the case of AMTN there may be compensation by SCPPPQ1. In fact, NNA suggests that it is closest to the enamel surface positioning SCPPPQ1 as a potential direct or indirect mediator for adhesion of the sBL to mineral.

III.6.2 - AMTN, ODAM and SCPPPQ1 exhibit propensity to interact

BTH has been intensively used to analyze protein interactions in multimolecular assemblies³³. As compared to a previous YTH study that solely relied on a qualitative colorimetric evaluation of yeast cultures²⁵, we have applied a quantifiable assay to characterize the interactions³⁴. All three epithelial proteins interact, with ODAM showing a strong affinity for its two sister proteins, AMTN and SCPPPQ1. In comparison with AMTN and ODAM, the high affinity of

SCPPPQ1 for self-interaction observed by BTH is consistent with its tendency to aggregate during purification in non-denaturing conditions¹⁶. ODAM and AMTN are intrinsically disordered proteins. The presence of large disordered regions that impart structural flexibility is a trait shared by members of the SCPP family³⁵. It is well established that intrinsically-disordered portions of proteins are considered as flexible linkers that freely rotate through space and recruit surrounding partners to form multidomain complexes³⁶. This may explain why mixing hODAM and hAMTN decreases the degree of disorder and result in the formation of α -helices, suggesting that the two proteins interact. In addition, no qualitative difference of the capacity to interact was observed when homologous or heterologous interactions between rat and human proteins were tested, as exemplified by AMTN (**Fig III.S2**), suggesting that interaction sites reside in the conserved amino acid portions of these proteins. Both BTH and coIP studies unequivocally demonstrate the propensity of AMTN, ODAM, and SCPPPQ1, whether of rat or human origin, to form homo- as well as hetero-multimers. In addition to demonstrating that all three proteins interact, these quantitative enzymatic evaluations are essential for follow-up BTH studies using constructs modified by site-directed mutagenesis of potential interaction sites that will be identified by phage display analyses³⁷. Such studies will allow us to identify motifs or specific amino acids responsible for the interactions.

III.6.3 - Structural evidence that the proteins form supramolecular complexes

Consistent with the BTH results, TEM and AFM data provide structural evidence that AMTN and ODAM individually have the potential to form globular self-aggregates. The discrepancy in size observed between TEM and size exclusion chromatography may relate to the fact that gel filtration is sensitive to conformation. Independently from the conditions used for sample preparation, AMTN and ODAM homo-oligomers also interact in vitro to form larger hetero-oligomers. However, preparation of samples for negative stain TEM or AFM requires drying of the samples, during which proteins may artefactually aggregate as liquid is removed. While more extensive analyses will be required for quantitative evaluation of size distribution, cryo-TEM results validate the tendency of hAMTN and hODAM to self-assemble into globular forms in their native state, and rule out the possibility that this results from drying. Also, the larger

aggregates observed *in vitro* in the hAMTN-hODAM mixtures are unlikely to occur in the sBL because of space limitations and therefore there must be mechanisms to limit the aggregative capacity *in vivo*. Interestingly, SCPPPQ1 alone forms linear profiles but mixing with its two sister proteins results in a porous supramolecular network. Such networks have been described for conventional BLs³⁸. Therefore, while SCPPPQ1 might have an affinity for the tooth surface, it may also play a bridging and stabilizing role in the sBL.

The abundance of Laminin-332 in the sBL^{9,10} may actually provide a background for ordered supramolecular interactions with AMTN, ODAM and/or SCPPPQ1 that determines its integrity. The HOPG substrate used for AFM may play a similar role *in vitro*. In a recent report, we have shown that the sBL is disrupted in a mouse model expressing human Lam- γ 2²³. Substitution of mouse LAMC2 by its human form seems to interfere with these interactions, resulting in the dispersion of AMTN, ODAM and SCPPPQ1. On the basis of what is known today, we provide here a ‘schematic’ representation for the integration of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 within the supramolecular organisation of the sBL that reflects their localisation and their propensity to aggregate, and that takes into account the Laminin-332 background (**Fig III.7**).

III.7 - Conclusion

The spatial arrangement of molecules, their structural organization, as well as their interactive behaviour provide critical information on their functions. In this context, our objective was to characterize the structural distribution and organization of AMTN, ODAM and SCPPPQ1, as well as their propensity for homologous and heterologous interactions. They differentially accumulate throughout the sBL to participate in the supramolecular assembly of an extracellular matrix with the unique capacity to bind epithelial cells to mineralized surfaces. A better understanding of the supramolecular architecture of the sBL and of the molecules that determine the interfacial biology between the JE and the tooth surface is expected to pave the way for innovative treatments for PD. In addition, knowledge of the molecular behaviour of ODAM is particularly relevant because it has also been associated with epithelial cancers in tissues of origin that do not normally express the molecule³⁹.

III.8 - Methods

All animal procedures were approved by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of Université de Montréal and all methods were performed in accordance with their guidelines and regulations.

III.8.1 - Tissue processing for light and electron microscopy

Six-month old wild type mice were anesthetized with 20% chloral hydrate solution (0.4mg/g body weight; Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) and sacrificed by perfusion through the left ventricle with Ringer's lactate (Abbott Laboratories; Montreal, QC, Canada) for 30s, followed by a fixative solution consisting of 4% paraformaldehyde (BDH; Toronto, ON, Canada) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences; Washington, PA) in 0.1M phosphate buffer (PB, pH 7.2) for 10min. Mandibles and maxillae were dissected, and specimens were immersed in the same fixative solution for 3h at 4°C. The samples were rinsed in 0.1M PB (pH 7.2) overnight at 4°C. Specimens were decalcified with 4.13% disodium ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA, Fisher Scientific) for 21 days and were then washed for 24h in 0.1M PB (pH 7.2).

Some decalcified specimens were processed for paraffin embedding. Five µm thick sections were prepared with a Leica RM2155 microtome (Leica Microsystems Canada, Richmond Hill, ON, Canada) and mounted on Superfrost®/Plus slides (Fisher Scientific) and stained with hematoxylin and eosin for morphological analyses or processed for immunofluorescence labeling. Other decalcified specimens were post-fixed with potassium ferrocyanide-reduced osmium tetroxide and then processed for embedding in LR White resin (London Resin Company; Berkshire, UK) as previously reported⁴⁰. Ultrathin 80-100nm sections were cut with a diamond knife and transferred onto Formvar®-coated (polyvinyl formate) 200-mesh nickel grids for immunogold labeling.

III.8.2 - Immunofluorescence

Briefly, deparaffinized sections were blocked in 0.01M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) containing 5% skim milk (Carnation; Nestle, Don Mills, ON, Canada) for 1h. They were then incubated for 3h with primary antibodies for rat ODAM (1:10000)⁴¹, rat AMTN (1:2000)¹⁵, or

rat SCPPPQ1 (1:2000)¹⁶, followed by a secondary goat anti-rabbit AlexaFluor 488 or 562 antibodies (1:500, 1h, Life Technologies™, Mississauga, ON, Canada). Following each step, the slides were washed 3 times for 10min each with PBS-Tween (0.05% (v/v)). For dual immunolabeling, following a first round of immunofluorescence, the samples were fixed using 0.01% glutaraldehyde before performing a second round of immunofluorescence. Sections were then mounted in ProLong Gold containing DAPI (Life Technologies™) in order to stain nuclei. Negative controls included omission of primary antibody and incubation with pre-immune serum. Also, controls for the antibodies used have been previously reported^{16,30,31}. Sections were examined under structured illumination microscopy using an Elyra PS1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Z-stack volumes were acquired using the Structural Illumination Method (SIM) and reconstructed using the Zen Black edition software.

III.8.3 - Post-embedding colloidal gold immunocytochemistry

Ultrathin sections of osmicated samples were first treated with an aqueous solution of 5% sodium metaperiodate⁴² for 45 min and washed with distilled water. Grids were then floated on a drop of 1% ovalbumin in 0.01M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) for 15min for blocking of unspecific binding and then transferred onto a drop of primary antibody for 1h (anti-SCPPPQ1 1:500; anti-ODAM 1:800, anti-AMTN 1:800). Following incubation with primary antibody, the grids were rinsed with PBS and placed again in blocking solution for 15 min. The sites of antibody-antigen binding were then revealed by floating the grids on a drop of the protein A-20nm colloidal gold complex for 30 min. For dual immunolabeling, following a first round of labeling using anti-AMTN or anti-ODAM revealed with 10 nm colloidal gold, the samples were floated on 0.01% glutaraldehyde before performing a second round of labeling using anti-SCPPPQ1 revealed with 20 nm colloidal gold. Finally, the grids were washed with PBS followed by distilled water. All steps were carried out at room temperature. Controls consisted of incubations with protein A-gold alone. Sections were then stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in an FEI Tecnai 12 (Eindhoven, The Netherlands) transmission electron microscope operating at 80 kV.

For nearest neighbour analysis, a minimum of 10 pictures were taken of each maturation region (early-mid, late) of an incisor (n=6) for each protein studied. The distance between gold particle over the BL and the cell membrane was measured using AnalySIS software (Soft Imaging System GmbH, Lakewood, CO). The percentage correspond to the distance measured for each picture, where values 0–10% closer to the cells and 90–100% near the enamel surface. The data particle counts within each distance interval were found to follow a normal distribution and were analyzed using a t test (QI macros, Excel SPC Software); the level of significance was set at $p < 0,05$.

III.8.4 - Cloning procedures

Truncated versions of *odam*, *amtn*, and *scpppq1* genes lacking regions encoding the predicted N-terminal signal sequence were PCR-amplified from human cDNA sequences using primers listed in **Table III.S4**. PCR products were cloned into pUT18C or pKNT25 vectors used for BTH analysis or into the vector pHT for co-immunoprecipitation or purification studies⁴³. The recombinant pHT plasmids allow to produce recombinant proteins with an in-frame N-terminal hexahistidyl-tag (His-tag) and TEV protease cleavage site. *Escherichia coli* strains XL-1 Blue were used as hosts for cloning.

III.8.5 - BTH

Interactions between the 3 proteins were assessed in vivo using the Bacterial Two-Hybrid system (BTH). Genes of interest were fused to DNA sequences encoding the T18 and T25 fragments of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (AC) and were co-expressed in *E.coli* BTH101 AC (*cya*) deficient cells. Interactions were detected by functional complementation between the two catalytic AC fragments, which leads to cAMP/ β -galactosidase production. These were detected using firstly a white/blue colonies assay using X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) substrate and then by quantification using ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) substrate.

III.8.6 - CoIP

One ml of *E. coli* BL21(DE3)-star strain co-expressing two or three recombinant protein pHT vectors was collected by centrifugation at 7,000g for 15 min. The pellet was re-suspended in 100 µl lysis buffer (50mM HEPES, 5mM MgCl₂, 25% sucrose, 1% Triton X-100, 1mg/ml Lysozyme pH 8) and incubated on ice for 1h. The suspension was then centrifuged at 12,000 g for 30 min. Antibody (anti-AMTN 1:1000 or anti-ODAM 1:1000) was added to the supernatant and incubated for 2h at 4°C. Protein A-Sepharose slurry (Pierce Co-Immunoprecipitation kit, ThermoFisher scientific) was subsequently added, followed by incubation for 2h at 4°C. Nonspecific binding proteins were removed by five successive rinses with phosphate buffered saline (PBS). The Protein A-Sepharose was finally eluted with glycine solution (0.1M; pH 1.8). The eluate was collected and analyzed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by Western blot using anti-His-tag antibodies (1:200).

III.8.7 - Protein overexpression and purification

BL21 (DE3)-star cells containing either pHT_{Th}Amtn or pHT_{Th}Odam were grown at 37°C and 250 rpm to an O.D 600 around 0.6, and protein expression was induced with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) for 5h at 30°C and 250 rpm. Bacterial cells were harvested, suspended in Equilibration buffer (50mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 10mM Imidazole, pH 7) at 4°C, and sonicated six times 15 s between 15 s ice incubations. Lysates were centrifuged at 13,400 g and the 6 His-tagged protein in the supernatant was bound on nickel-nitriloacetic acid (Ni-NTA)-agarose affinity resin (QIAGEN) at room temperature. After washing the resin with 10 volumes of Binding buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 7), proteins were eluted with Elution buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazole, pH 7). Collected fractions were assessed for protein content using the Bradford assay and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Chosen fractions were then dialyzed into TEV buffer (25 mM Na₂HPO₄, 125 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.4) and had their N-terminal His-tag cleaved using His-tagged TEV protease (Sigma-Aldrich) in a 1:70 ratio (TEV:Protein) overnight at room temperature. Following cleavage, the solution was applied to a Ni-NTA-agarose affinity resin and the flow through containing cleaved protein was collected. Proteins were dialyzed into 50 mM PB (pH 7.2) and stored at 4°C. Finally, proteins were purified by size exclusion

chromatography using a Superose 6 GL 10/300 gel filtration column for ODAM or a S200 gel filtration column for AMTN (GE Healthcare). Columns were pre-equilibrated with 50 mM PB (pH 7.4). Fractions were evaluated for purity by SDS-PAGE. SCPPPQ1 was expressed in pHT_hScpppq1 and grown and purified in the same conditions than ODAM and AMTN but in denaturing conditions where buffers contained 8 M of Urea.

III.8.8 - Circular Dichroism

Solutions of purified complex were prepared at 10, 5, 2.5, and 1.25 μ M in 50 mM PB (pH 7.2). CD measurements were performed using cuvettes with a path length of 0.1 cm (far-UV CD, 180–250 nm). The far-UV CD spectra were collected using a Jasco J-810 spectropolarimeter between 180–250 nm wavelengths with a data pitch of 0.5 nm, a bandwidth of 1 nm, a scan speed of 50 nm/min, and a response time of 1 min. All spectra were corrected for buffer contribution. Each spectrum is an average of 3 scans. MRW was calculated by assuming an average mean residue weight of 110 Daltons for protein mixtures. Analysis of the CD spectra was carried out using the CDSSTR method from the dichroweb server (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>) for analyzing protein CD spectra for secondary structure estimation. The CD spectrum of the protein analyzed was removed from the reference set and the secondary structure fractions were determined using a reference set of 12 members.

III.8.9 - Atomic Force Microscopy

Atomic Force Microscopy (AFM) imaging was performed using a JEOL JSPM-5200 Scanning Probe Microscope. A 10 μ l drop of sample solution (from 1 μ g/ml to 100 ng/ml) was incubated for 5 min on a Highly Ordered Pyrolytic Graphitic (HOPG) substrate. Then, the HOPG surface was rinsed 3 times with 50 ml of distilled water (dH₂O) and air-dried. All imaging was observed under dry conditions and was carried out using the tapping mode at room temperature. The cantilevers used (HQ-NSC14, MicroMasch, USA) had a spring constant of 5.7 N/m. The scan speed was 0.5 Hz and scan size was 1.5x1.5 mm. The samples were visualized as topographic images and 3D images at a resolution of 512 x 512 pixels. Because recombinant SCPPPQ1 readily precipitates during purification in the neutral buffer used for AMTN and SCPPPQ1 or under other non-denaturing buffers, it was purified under denaturing conditions with 8 M of

urea. For imaging SCPPPQ1 by AFM, the proteins were solubilized in buffer containing urea concentrations in very low concentration of urea (100mM) before to be incubated on HOPG.

III.8.10 - Transmission Electron Microscopy

Specimens were prepared for EM using a conventional negative staining procedure. A 5 μ l drop of purified proteins was adsorbed for 2 min to a glow-discharged carbon-coated copper grid and stained twice for 1min with freshly prepared 2% uranyl acetate in dH₂O. Samples were imaged using a FEI Tecnai T12 (Eindhoven, The Netherlands) Transmission Electron Microscope (TEM) equipped with a LaB₆ filament and operated at an acceleration voltage of 80 kV. Some specimens were also prepared for cryo-EM. 3 μ l of solution were deposited on glow-discharged quantifoil R2/2 grids (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Germany), blotted 2s, and flash frozen in liquid ethane. Cryo-samples were examined with a Titan Kryos (Eindhoven, The Netherlands) operating at 300 kV.

III.9 - Acknowledgments

We extend our thanks to Katia Julissa Ponce and Benoit Bessette (Université de Montréal) for their technical assistance and FEI for access to their cryo-TEM platform. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research A.N. (CIHR MOP-110972) and C.B. (CIHR MOP-84239), and the Network for Oral and Bone Health Research (FRQ-S). A.N. is recipient of a Canada Research Chair in Calcified tissues, Biomaterials and Structural Imaging. A.F. received a scholarship from the Cellular Dynamics of Macromolecular Complexes NSERC-CREATE program.

III.10 - References

1. Ekblom, M., Falk, M., Salmivirta, K., Durbeej, M. & Ekblom, P. *Laminin isoforms and epithelial development*. Annals of the New York Academy of Sciences 857, 194–211 (1998).
2. McGuire, J. D., Walker, M. P., Dusevich, V., Wang, Y. & Gorski, J. P. *Enamel organic matrix: potential structural role in enamel and relationship to residual basement membrane constituents at the dentin enamel junction*. Connect. Tissue Res. 55 Suppl 1, 33–37, doi: 10.3109/03008207.2014.923883 (2014).
3. Scheele, S. et al. *Laminin isoforms in development and disease*. J. Mol. Med. (Berl.) 85, 825–836, doi: 10.1007/s00109-007-0182-5 (2007). 7:46683|DOI: 10.1038/srep46683 10
4. Kruegel, J. & Miosge, N. *Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices*. Cellular and molecular life sciences: CMLS 67, 2879–2895, doi: 10.1007/s00018-010-0367-x (2010).
5. Takata, T., Nikai, H., Ijuhin, N. & Okamoto, H. *Ultrastructure of regenerated junctional epithelium after surgery of the rat molar gingiva*. J Periodontol. 57, 776–783 (1986).
6. Schroeder, H. E. & Listgarten, M. A. *The gingival tissues: The architecture of peridontal protection*. Periodontol. 2000 13, 91–120 (1997).
7. Nanci, A. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Vol. 7 (Mosby Elsevier, 2007).
8. Smith, C. E. & Nanci, A. *Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis*. Int. J. Dev. Biol. 39, 153–161 (1995).
9. Sawada, T. *Ultrastructural and immunocytochemical characterization of ameloblast-enamel adhesion at maturation stage in amelogenesis in Macaca fuscata tooth germ*. Histochem. Cell Biol. 144, 587–596, doi: 10.1007/s00418-015-1362-y (2015).
10. Sahlberg, C., Hormia, M., Airene, T. & Thesleff, I. *Laminin γ 2 expression is developmentally regulated during murine tooth morphogenesis and is intense in ameloblasts*. J. Dent. Res. 77, 1589–1596 (1998).

11. Hormia, M., Sahlberg, C., Thesleff, I. & Airene, T. *The epithelium-Tooth Interface—A basal lamina rich in Laminin-5 and Lacking Other Known Laminins Isoforms*. J. Dent. Res. 77, 1479–1485 (1998).
12. Bosshardt, D. D. & Lang, N. P. *The junctional epithelium: from health to disease*. J. Dent. Res. 84, 9–20 (2005).
13. Iwasaki, K. et al. *Amelotin—a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein*. J Dent. Res. 84, 1127–1132 (2005).
14. Moffatt, P., Smith, C. E., Sooknanan, R., St-Arnaud, R. & Nanci, A. *Identification of secreted and membrane proteins in the rat incisor enamel organ using a signal-trap screening approach*. Eur. J. Oral Sci. 114, 139–146 (2006).
15. Moffatt, P., Smith, C. E., St-Arnaud, R. & Nanci, A. *Amelotin, a novel secreted protein that localizes to basal lamina of epithelia attached enamel*. J. Bone Miner. Res. 21, S340 (2006).
16. Moffatt, P., Wazen, R. M., Dos Santos Neves, J. & Nanci, A. *Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-prolineglutamine-rich 1: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces*. Cell Tissue Res. 358, 843–855, doi: 10.1007/s00441-014-1989-3 (2014).
17. Kawasaki, K. & Weiss, K. M. *Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster*. Proc Natl Acad Sci. USA 100, 4060–4065 (2003).
18. Kawasaki, K. & Weiss, K. M. *Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family*. J Exp Zool B Mol Dev Evol 306, 295–316 (2006).
19. Huq, N. L., Cross, K. J., Ung, M. & Reynolds, E. C. *A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4*. Arch. Oral Biol. 50, 599–609 (2005).
20. Somogyi-Ganss, E. et al. *Comparative Temporospacial Expression Profiling of Murine Amelotin Protein during Amelogenesis*. Cells Tissues.Organs (2011).

21. Dos Santos Neves, J. et al. *Odontogenic ameloblast-associated and amelotin are novel basal lamina components*. *Histochem. Cell Biol.* 137, 329–338 (2011).
22. Wazen, R. M. et al. *Inactivation of the Odontogenic ameloblast-associated gene affects the integrity of the junctional epithelium and gingival healing*. *Eur Cells Mater* 30, 187–199 (2015).
23. Wazen, R. M. et al. *Laminin gamma2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects*. *Matrix Biol.*, doi: 10.1016/j.matbio.2016.03.002 (2016).
24. Lee, H. K. et al. *Odontogenic Ameloblast-associated Protein (ODAM) Mediates Junctional Epithelium Attachment to Teeth via Integrin-ODAM-Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 5 (ARHGEF5)-RhoA Signaling*. *J. Biol. Chem.* 290, 14740–14753, doi: 10.1074/jbc.M115.648022 (2015).
25. Holcroft, J. & Ganss, B. *Identification of amelotin- and ODAM-interacting enamel matrix proteins using the yeast two-hybrid system*. *Eur. J. Oral Sci.* 119 Suppl 1, 301–306 (2011).
26. Zalzal, S. F., Smith, C. E. & Nanci, A. *Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation*. *Matrix Biol.* 27, 352–359 (2008).
27. Sreerama, N. & Woody, R. W. *Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set*. *Anal. Biochem.* 287, 252–260, doi: 10.1006/abio.2000.4880 (2000).
28. Johnson, W. C. *Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures*. *Proteins* 35, 307–312 (1999).
29. Whitmore, L. & Wallace, B. A. *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*. *Nucleic Acids Res.* 32, W668–673, doi: 10.1093/nar/gkh371 (2004).

30. Moffatt, P. et al. *Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium*. *Biochem. J.* 399, 37–46 (2006).
31. Moffatt, P., Smith, C. E., St-Arnaud, R. & Nanci, A. *Characterization of Apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia*. *J. Cell. Biochem.* 103, 941–956, doi: 10.1002/jcb.21465 (2008).
32. Nakayama, Y., Holcroft, J. & Ganss, B. *Enamel Hypomineralization and Structural Defects in Amelotin-deficient Mice*. *J. Dent. Res.* 94, 697–705, doi: 10.1177/0022034514566214 (2015).
33. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. *Microbiology* 95, 5752–5756 (1998).
34. Fields, S. *High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril*. *The FEBS journal* 272, 5391–5399, doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04973.x (2005).
35. Bellahcène, A., Castronovo, V., Ogbureke, K. U., Fisher, L. & Fedarko, N. S. *Small Intergrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs): Multifunctional proteins in cancer*. *Nat. Rev. Cancer* 8, 212–226 (2008).
36. Shimizu, K. & Toh, H. *Interaction between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network*. *J. Mol. Biol.* 392, 1253–1265, doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.088 (2009).
37. Carter, D. M. et al. *Phage display reveals multiple contact sites between FhuA, an outer membrane receptor of Escherichia coli, and TonB*. *J. Mol. Biol.* 357, 236–251, doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.039 (2006).
38. Brody, S. et al. *Characterizing nanoscale topography of the aortic heart valve basement membrane for tissue engineering heart valve scaffold design*. *Tissue Eng.* 12, 413–421, doi: 10.1089/ten.2006.12.413 (2006).
39. Kestler, D. P. et al. *Expression of odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) in dental and other epithelial neoplasms*. *Mol. Med.* 14, 318–326 (2008).

40. Neiss, W. F. *Electron staining of the cell surface coat by osmium-low ferrocyanide*. Histochemistry 80, 231–242 (1984).
41. Moffatt, P., Smith, C. E., St Arnaud, R. & Nanci, A. *Characterization of Apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia*. J. Cell. Biochem. 103, 941–956 (2008).
42. Bendayan, M. & Zollinger, M. *Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique*. J. Histochem. Cytochem. 31, 101–109 (1983).
43. Smith, M. A. et al. *Identification of the Binding Site of Brucella VirB8 Interaction Inhibitors*. Chem Biol 19, 1041–1048, doi: S1074-5521(12)00230-X [pii]10.1016/j.chembiol.2012.07.007 (2012).

III.11 – Figures legends

Fig III.1: AMTN, ODAM and SCPPPQ1 localize at the cell-tooth interface. (A) Micrograph from a histological section stained with hematoxylin and eosin showing apposition of the junctional epithelium (JE) to the enamel, seen here as a space (ES) following decalcification. The inset is a higher magnification of the JE cells (*). The arrows point to the position of the associated specialized basal lamina (sBL). (B-D) Immunofluorescence preparations for AMTN, ODAM and SCPPPQ1 imaged by Structured Illumination Microscopy (SIM) indicate that the three proteins highlight the sBL. ODAM also exhibits a cell-associated labeling (arrowheads). Proteins stained in green, nuclei in blue using DAPI. Scale bars = 10µm.

Fig III.2: Dual immunofluorescence labeling for AMTN, ODAM and SCPPPQ1 visualized by Structured Illumination Microscopy. A and B illustrate dual-labelled junctional epithelium (JE) preparations. C to F are the corresponding single channel images at higher magnification. These dual preparations demonstrate that the proteins co-localize at the cell-tooth interface where the specialized basal lamina (sBL) is found. AMTN/ODAM in green; SCPPPQ1 in red; nuclei in blue using DAPI.

Fig III.3: High resolution immunogold labeling demonstrates that AMTN, ODAM and SCPPPQ1 distribute differentially across the specialized basal lamina (sBL). (A-B) As exemplified here with the maturation stage enamel organ (EO), dual labeling evidences with high resolution the co-localisation of the three proteins in the specialized basal lamina (sBL). (C-D) Single immunogold preparations; Quantification of the distribution of particles relative to the cell surface reveals that the three proteins distribute differentially across the sBL. AMTN/ODAM 10nm gold particles; SCPPPQ1 20 nm gold particles.

Fig III.4: Interaction analysis between AMTN, ODAM and SCPPPQ1. (A) Bacterial two-hybrid analysis between human proteins after fusions to the PKNT25 and PUT18C domains of adenylate cyclase. All 3 proteins have the propensity to interact, with AMTN-ODAM and SCPPPQ1-ODAM interactions showing the highest level of interaction. Positive control=

PUT18Czip + PKNT25zip; negative control = hSCPPPQ1-PKNT25 + empty PUT18C vector. **(B)** These interactions are confirmed by co-immunoprecipitation followed by Western blotting.

Fig III.5: Visual characterization of aggregation behaviour of AMTN and ODAM. **(A-C)** Transmission electron microscopy (TEM) of negative stain and **(D-F)** atomic force microscopy preparations of purified AMTN and ODAM demonstrate the propensity of the proteins to self-interact to form globular complexes. Mixing the two proteins together generates larger complexes suggesting heterologous interactions. **(Insets in A and B)** Observation of the complexes under native conditions by cryo-TEM confirms that they do not result from preparation artefacts.

Fig III.6: Atomic force microscope characterization of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins. **(A-C)** The discrete profiles formed individually by each protein differ dramatically from **(D)** the intricate network formed created when they are mixed together.

Fig III.7: Schematic model of the distribution of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 within the supramolecular organisation of the specialized basal lamina (sBL). The two boxed in images are representative immunogold labelings for ODAM (skewed toward the cells) and SCPPPQ1 (skewed toward the tooth surface) over the sBL from the maturation stage enamel organ and the junctional epithelium. The model attempts to integrate the observed differential distribution of the three proteins within a laminin-332 backbone whose arrangement within the unique extracellular matrix constituted by the sBL remains to be clarified.

III.12 – Figures

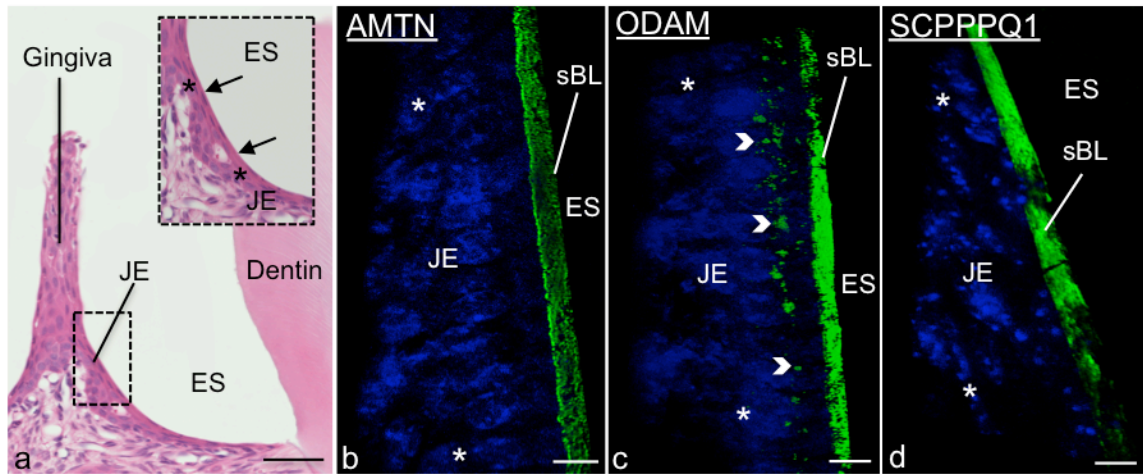


Figure III.1 : AMTN, ODAM and SCPPPQ1 localize at the cell-tooth interface

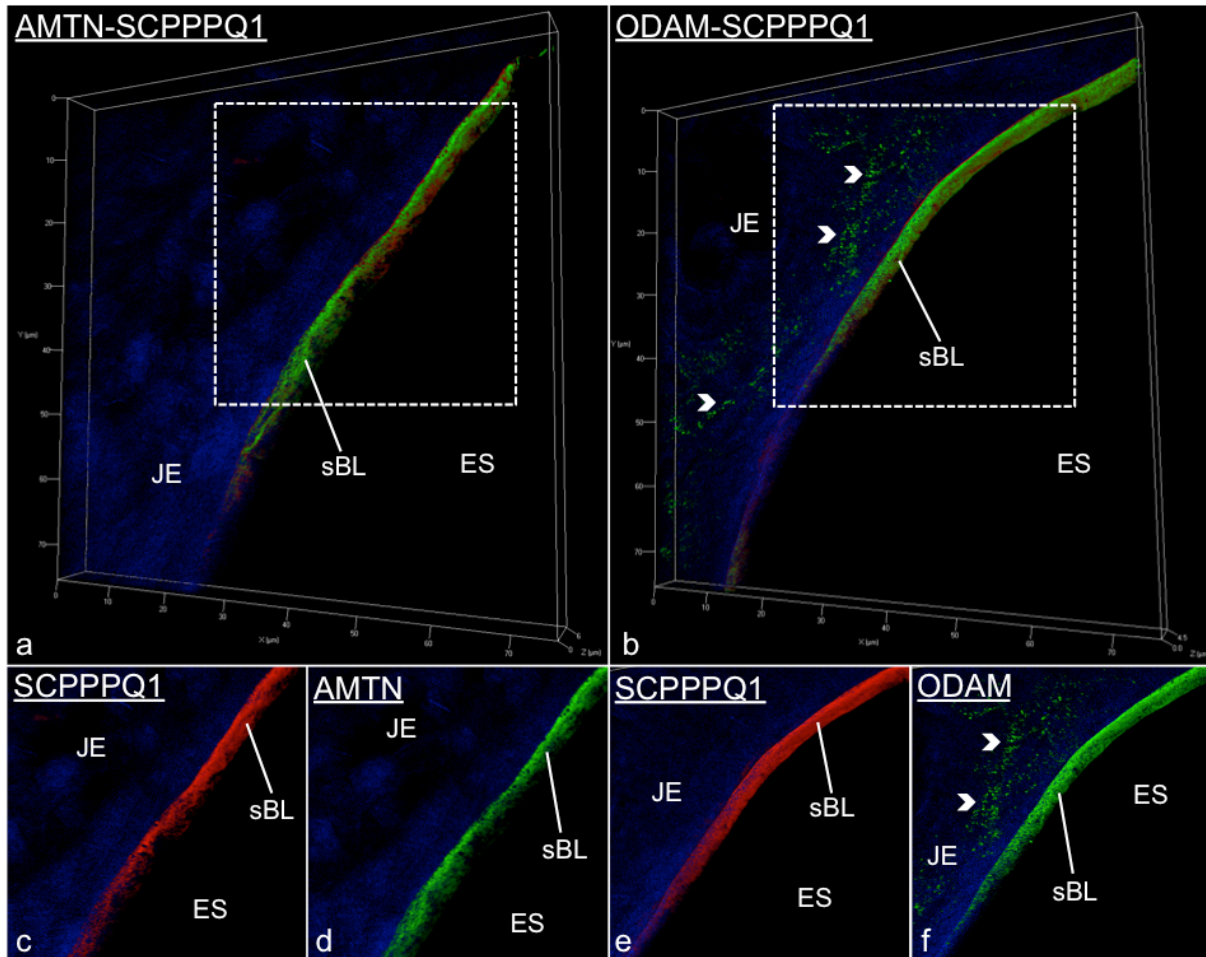


Figure III.2 : Dual immunofluorescence labeling for AMTN, ODAM and SCPPPQ1 visualized by Structured Illumination Microscopy

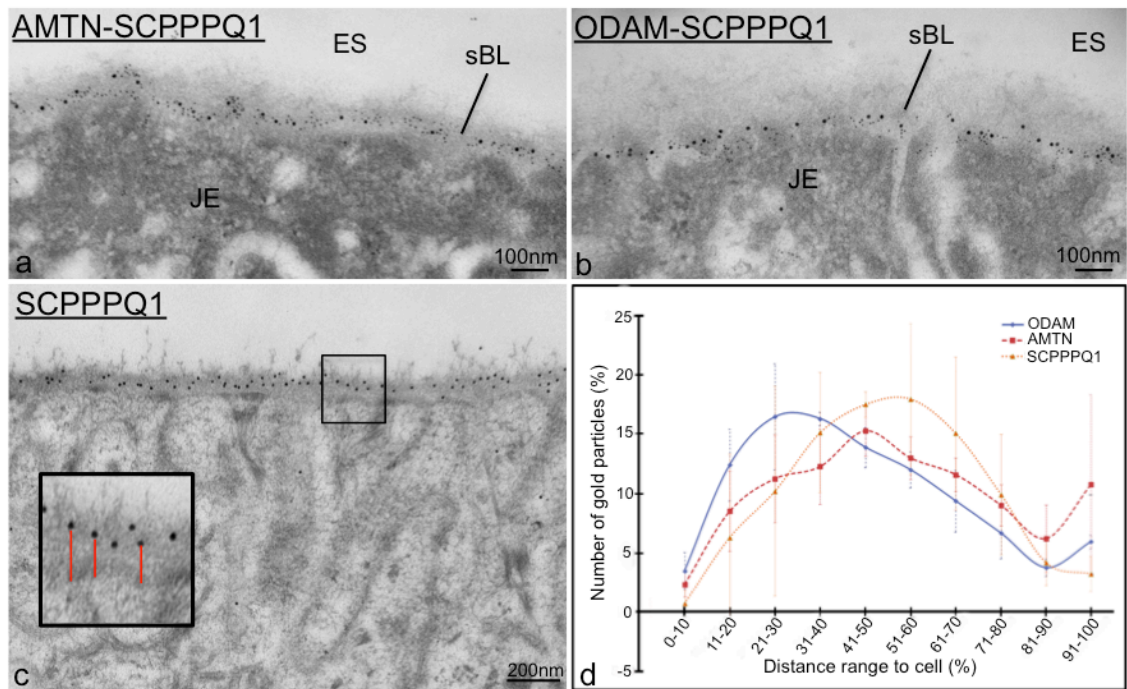


Figure III.3 : High resolution immunogold labeling demonstrates that AMTN, ODAM and SCPPPQ1 distribute differentially across the specialized basal lamina (sBL)

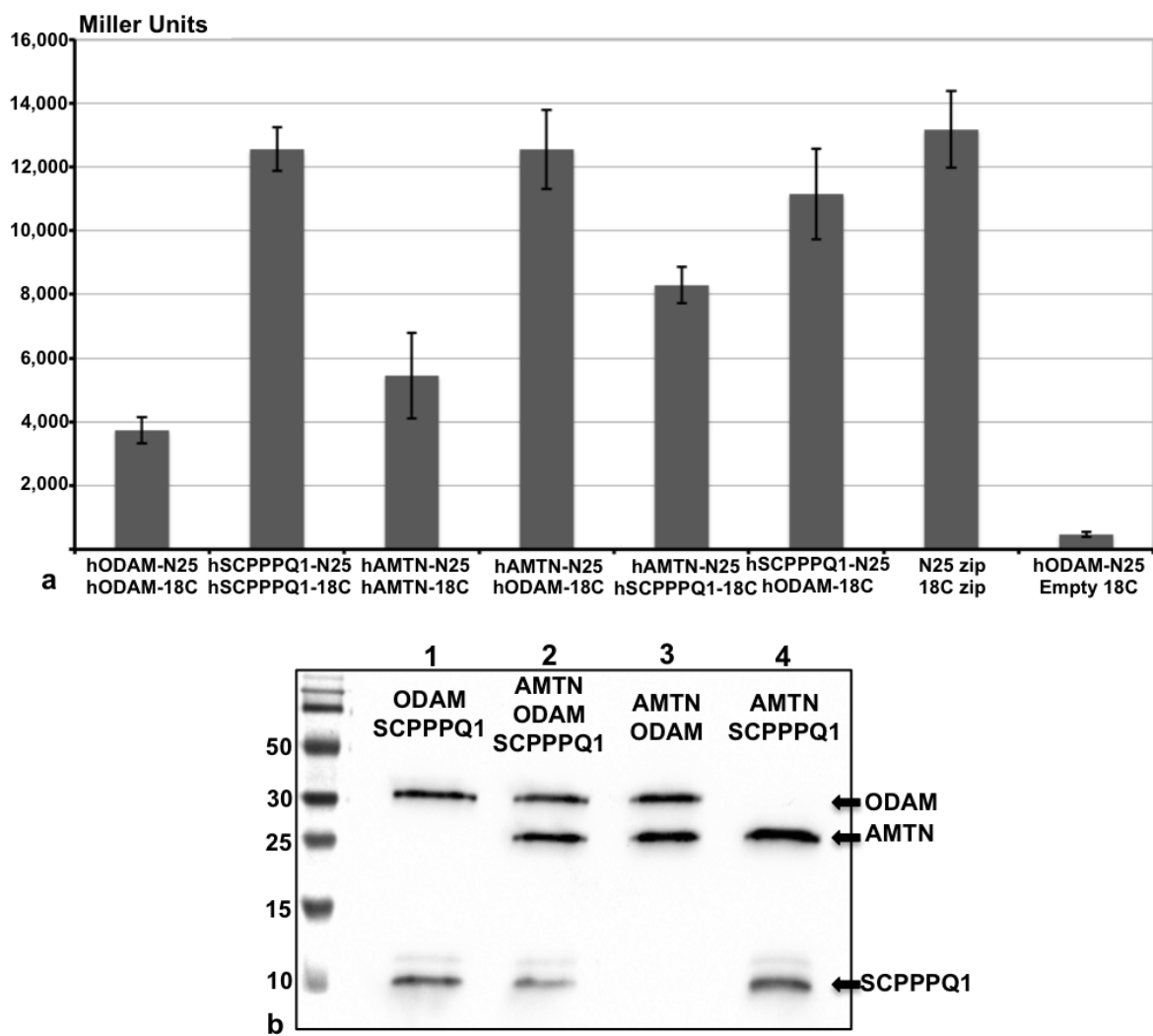


Figure III.4 : Interaction analysis between AMTN, ODAM and SCPPPQ1

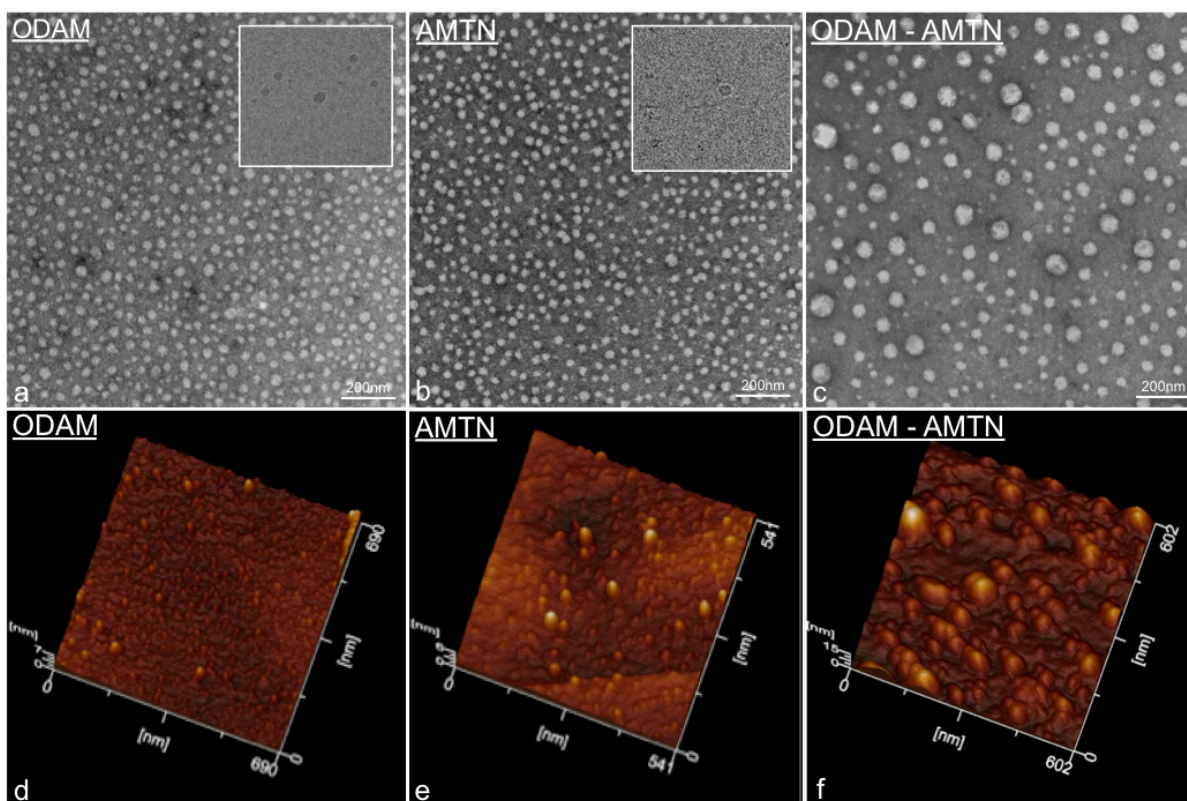


Figure III.5 : Visual characterization of aggregation behaviour of AMTN and ODAM

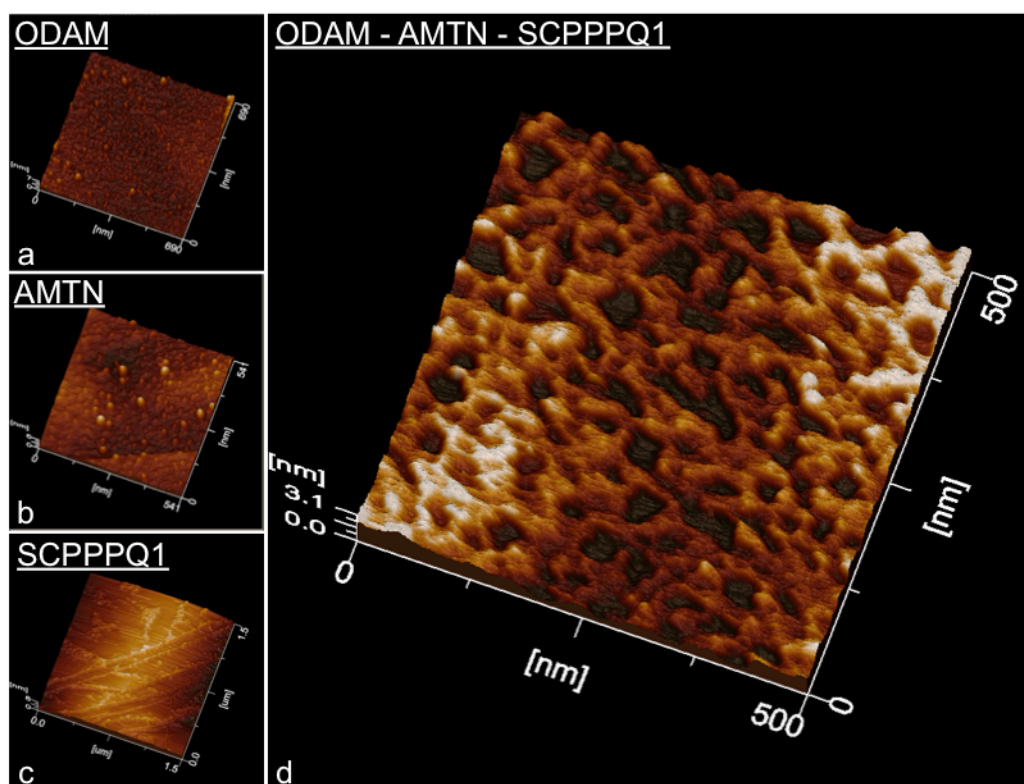


Figure III.6 : Atomic force microscope characterization of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins

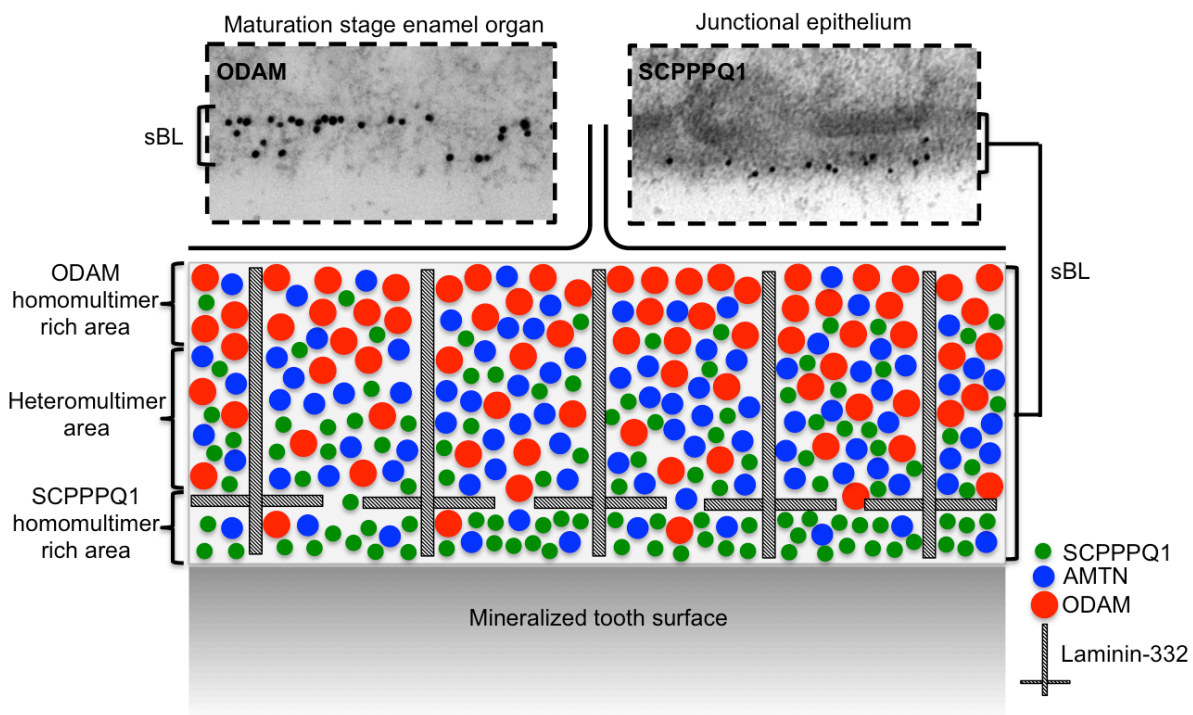
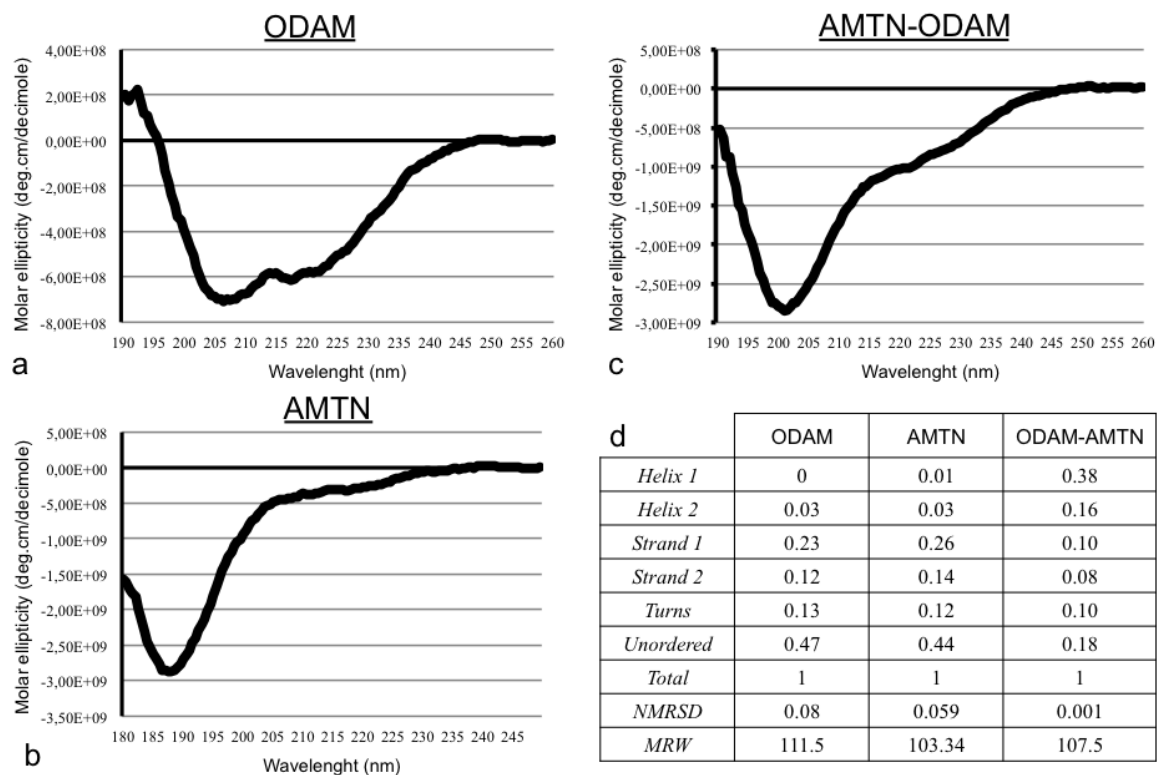


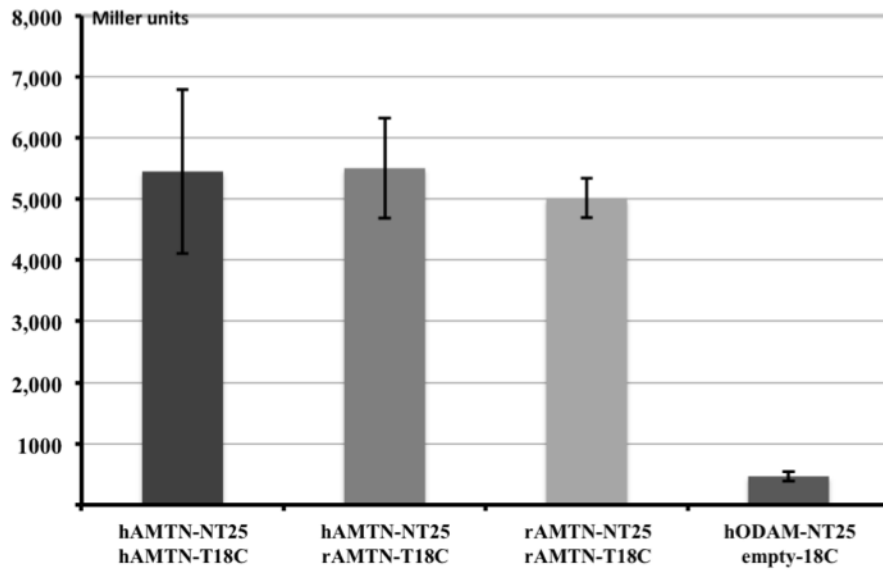
Figure III. 7 : Schematic model of the distribution of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 within the supramolecular organisation of the specialized basal lamina (sBL)

III.13 – Supplemental figures



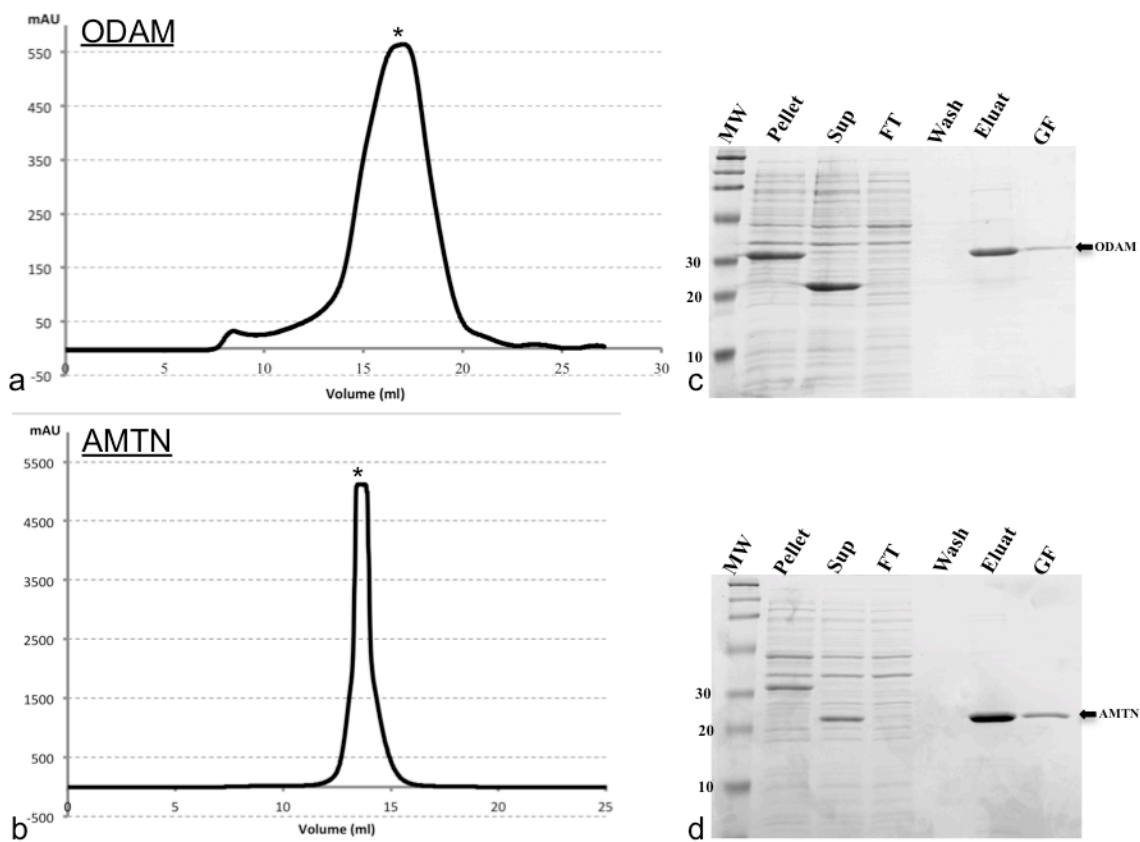
Supplementary figure III.1 : Structural analysis by circular dichroism spectroscopy

Spectra obtained for **(A)** ODAM, **(B)** AMTN, and **(C)** the mix of ODAM and AMTN. **(D)** Table of calculated secondary structure.



Supplementary figure III. 2 : Interspecies bacterial two-hybrid interaction analysis

Here illustrated for AMTN, no significant difference in interaction capacity between the rat and human forms was noted.



Supplementary figure III.3 : Analysis of expression of hODAM and hAMTN by *E. coli*

Size exclusion chromatography of **(A)** hODAM and **(B)** hAMTN results in single distinct peaks. The hatched lines denote the fractions used for **(C-D)** SDS-PAGE gels analysis to evaluate purity of the eluted proteins. MW= Molecular weight

III.14 – Supplemental tables

Protein	Strain	Direction	Primer	Restriction site
human ODAM	pHT	Forward	5' CGG GGTACC ATGGCCCCACTTATCCCAC 3'	KpnI
	pHT	Reverse	5' CGC GGATCC TTACGGTTCCTTAGGCTGTC 3'	BamHI
	PUT18 - PKNT25	Forward	5' CGC GGATCC CATGAAAATTATAATTCTT 3'	BamHI
	PUT18 - PKNT25	Reverse	5' CGG GGTACC GGTTCCTTAGGCTGTCAG 3'	KpnI
	PUT18C - PKT25	Forward	5' CGC GGATCC CATGAAAATTATAATTCTT 3'	BamHI
	PUT18C - PKT25	Reverse	5' CGG GGTACC TATGGTTCCTTAGGCTGT 3'	KpnI
rat ODAM	pHT	Forward	5' CGG GGTACC ATGAGCAACAGCCATGAGT 3'	KpnI
	pHT	Reverse	5' CGC GGATCC TTATGGTTCTCTTAGGCTATC 3'	BamHI
	PUT18 - PKNT25	Forward	5' CGC GGATCC CATGAAAATTATAATTCTT 3'	BamHI
	PUT18 - PKNT25	Reverse	5' CGG GGTACC CCTGGTTCTCTTAGGCTAT 3'	KpnI
	PUT18C - PKT25	Forward	5' CGC GGATCC CATGAAAATTATAATTCTT 3'	BamHI
	PUT18C - PKT25	Reverse	5' CGG GGTACC TTATGGTTCTCTTAGGCTA 3'	KpnI
human AMTN	pHT	Forward	5' CGC GGATCC ATGTTACCACAGCTCAAA 3'	BamHI
	pHT	Reverse	5' CCC AAGCTT TTACTGAATTCCATTTGCTG 3'	HindIII
	PUT18 - PKNT25	Forward	5' GCT TCTAGAC ATGAGGAGTACGATTCTA 3'	XbaI
	PUT18 - PKNT25	Reverse	5' CGC GGATCC CGCTGAATTCCATTTGCTG 3'	BamHI
	PUT18C - PKT25	Forward	5' GCT TCTAGAC ATGAGGAGTACGATTCTA 3'	XbaI
	PUT18C - PKT25	Reverse	5' CGC GGATCC TTACTGAATTCCATTTGCT 3'	BamHI
rat AMTN	pHT	Forward	5' CGG GGTACC ATGTTGCCAAGGCAGCT 3'	KpnI
	pHT	Reverse	5' GC GGATCC TTACTTAGTTCTATTTGGTGGGT 3'	BamHI
	PUT18 - PKNT25	Forward	5' GCT TCTAGAG ATGAAGACCGTGGTTCTC 3'	XbaI
	PUT18 - PKNT25	Reverse	5' CGC GGATCC TTAGTTCTATTTGGTGGGT 3'	BamHI
	PUT18C - PKT25	Forward	5' GCT TCTAGAG ATGAAGACCGTGGTTCTC 3'	XbaI
	PUT18C - PKT25	Reverse	5' CGC GGATCC CTATTTAGTTCTATTTGGT 3'	BamHI
human SCPPPQ1	pHT	Forward	5' CGG GGTACC ATGCTTGGACAATCTGGAGG 3'	KpnI
	pHT	Reverse	5' CGC GGATCC TTATCTCCCAAGGAAGCCC 3'	BamHI

	PUT18 - PKNT25	Forward	5' CCC <u>AAGCTT</u> CATGCTTGGACAATCTGGAGG 3'	HindIII
	PUT18 - PKNT25	Reverse	5' CG <u>GGATCC</u> CGTCTCCCAAGGAAGCCCT 3'	BamHI
	PUT18C - PKT25	Forward	5' GCT <u>TAGAC</u> CATGGCTCTGCCCATCCCC 3'	XbaI
	PUT18C - PKT25	Reverse	5' CG <u>GGATCC</u> TTATGTCCCAGAGAAGTTCCC 3'	BamHI
rat SCPPPQ1	PUT18 - PKNT25	Forward	5' GCT <u>TAGAC</u> CATGCTTGGACAATCTGGAGGG 3'	XbaI
	PUT18 - PKNT25	Reverse	5' CG <u>GGATCC</u> TTATCTCCCAAGGAAGCCC 3'	BamHI
	PUT18C - PKT25	Forward	5' GCT <u>TAGAC</u> CATGCTTGGACAATCTGGA 3'	XbaI
	PUT18C - PKT25	Reverse	5' CG <u>GGATCC</u> TTATCTCCCAAGGAAGCCC 3'	BamHI

Supplementary Table III.1 : Primers and restriction site for cloning procedures

Chapitre IV – Troisième article scientifique - *Bacteria selectively degrade the extracellular matrix attaching the gingiva to the tooth*

IV.1 – Description de l'article et contribution des auteurs

Comme nous en avons discuté dans le chapitre I (I.5), la maladie parodontale touche mondialement 80% de la population adulte. Cette maladie principalement orale a également un lien important dans les maladies systémiques et même le cancer. La cause principale de cette maladie est la présence de bactéries, sous forme de plaque dentaire, qui sont accolées à la dent. Cette localisation fait que ces bactéries sous-gingivales siègent sur la marge supérieure de l'EJ. Bien qu'il y ait de nombreuses études sur le sujet, on ne possède pas beaucoup d'informations sur la susceptibilité de la LBS aux bactéries et leurs produits, une question importante concernant le maintien du scellement gingival. Le domaine étant complexe, nous avons limité ici nos analyses à la simple question de savoir si les bactéries peuvent dégrader AMTN, ODAM, SCPPPQ1 et Lam332, étendant ainsi leur virulence initiale au-delà de l'épithélium sulculaire.

Cette étude, actuellement en révision dans *Scientific Reports*, a ainsi montré que des bactéries pathogènes associées à la maladie parodontale avaient la capacité de cliver les protéines de la LBS, excepté SCPPPQ1. Cette dégradation s'effectue très rapidement et dégrade entièrement les protéines. Vu que nous sommes capables de créer un réseau supramoléculaire composé des protéines de la LBS, nous avons déterminé l'impact des bactéries sur celui-ci par MEB et AFM. On observe des plages de dégradation tout autour des bactéries. Nous avons par la suite évalué si l'incubation de ces mêmes bactéries sur une lame basale native avait la même capacité de dégradation. Nous avons ainsi pu observer que les bactéries créent une aire de dégradation tout autour d'elles sur les LBS de l'OE et de l'EJ.

Cette étude montre alors que les bactéries associées à la maladie parodontale ont la capacité de s'attaquer à la « colle » qui permet le scellement gingival. Ainsi, nos travaux offrent une

nouvelle vision sur cette maladie et pourraient ouvrir de nouvelles portes quant aux traitements pour lutter ou prévenir le détachement de l'EJ.

Pour ce papier, j'ai défini les expériences avec l'aide de Dr Nanci. J'ai mené l'ensemble de celles-ci ainsi que leurs analyses. Dr Grenier et Dr Barbeau ont produit et fourni les bactéries utilisées pour cette étude. Dr Moffatt et Dr Baron ont fourni un support scientifique. Dr Nanci et moi-même avons écrit le manuscrit qui a été ensuite révisé par l'ensemble des auteurs avant sa soumission. L'ensemble du travail s'est déroulé sous la supervision de Dr Nanci.

Pour les analyses de spectrométrie de masse, nous avons travaillé avec Dr Faubert et son équipe. Pour des analyses plus poussées en MEB, nous avons eu accès à la plateforme Hitachi à Washington.

Bacteria selectively degrade the extracellular matrix attaching the gingiva to the tooth

Fouillen A^{1,3}, Grenier D⁴, Barbeau J², Baron C³, Moffatt P⁵ and Nanci A^{1,3}.*

¹ Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, ² Department of Stomatology, Faculty of Dental Medicine, and ³ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁴ Oral Ecology Research Group, Faculty of Dentistry, Université Laval, Quebec City, Québec, Canada.

⁵ Shriners Hospital for Children, Montréal, Québec, Canada

*Corresponding author: Antonio Nanci

Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials,
Department of Stomatology, Faculty of Dental Medicine,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

e-mail: antonio.nanci@umontreal.ca

Submitted to Scientific Reports – Apr 2018

IV.2 - Abstract

The junctional epithelium (JE) is a specialized portion of the gingiva that seals off the tooth-supporting tissues from the oral environment. This relationship is achieved via a unique adhesive extracellular matrix that is in fact the specialized basal lamina (sBL). Three proteins - AMTN, ODAM, and SCPPPQ1- together with Laminin-332 structure the supramolecular organization of this sBL and determine its adhesive capacity. Despite the constant challenge of the JE by the oral microbiome, little is known on the susceptibility of the sBL to bacterial degradation. Degradation assays with trypsin-like proteases as well as incubation with *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* revealed that all constituents, except SCPPPQ1, were rapidly degraded. *Porphyromonas gingivalis* was also shown to alter the supramolecular network of reconstituted and native sBL. These results provide evidence that proteolytic enzymes and selected Gram-negative periodontopathogenic bacteria can attack this adhesive extracellular matrix, suggesting that its degradation by the oral microbiome contributes to periodontal diseases.

IV.3 - Keywords

Junctional epithelium, extracellular matrix, specialized basal lamina, *Porphyromonas gingivalis*, enzymatic degradation, periodontal diseases

IV.4 - Introduction

The tooth is the only structure of the body that breaches the epithelial barrier. Its interface with the gingiva surrounding the tooth is therefore of critical importance in periodontal pathogenesis [1, 2], as well as for preventing systemic dissemination of bacteria [3]. The so-called dentogingival junction is composed of a sulcular epithelium (SE) and a junctional epithelium (JE). The SE extends above the JE and is separated from the tooth by a natural space that creates an ecological niche for microbial colonization. The JE below adheres to the mineralized tooth surface to prevent the spread of oral bacteria from the sulcus into the subjacent tooth-supporting tissues and their destruction when periodontal diseases (PD) set in.

The JE cells form a specialized basal lamina (sBL) to achieve a strategic adhesive relationship with the tooth surface. This extracellular matrix is enriched in laminin-332 (Lm332) and contains no type IV and VII collagens, setting it apart from typical BLs binding to connective tissues [4]. The JE additionally secretes three unique proteins called Amelotin (AMTN), Odontogenic ameloblast-associated (ODAM) and Secretory calcium-binding phosphoprotein proline-glutamine rich 1 (SCPPPQ1). As it stands today, the supramolecular network of the sBL comprises only these four components. Our group has established by immunogold labeling that AMTN, ODAAM and SCPPPQ1 localize to the sBL. We proposed that they contribute to structuring the supramolecular organisation of the sBL that determines its adhesive capacity [5, 6].

PD are a multifactorial disorder, which leads to the destruction of tooth-supporting tissue, ultimately resulting in irreversible damages and tooth loss [7]. It is well recognized that microorganisms constitute the primary etiologic agents of PD [8-10]. The human subgingival plaque harbors more than 700 bacterial species. Among these, only a minority is virulent and leads to PD when the equilibrium of the oral microbiome is compromised [7]. Among others, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and *Treponema denticola* (*T. denticola*) are considered as late colonizers and are strongly associated with active lesions of PD. They are usually found in the presence of bridging colonizer species such as *Prevotella intermedia* (*P.*

intermedia), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) and *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) whose roles are to stimulate and facilitate the aggregation of the late colonizers [11]. Some oral bacteria secrete a variety of virulence factors [12]. For instance, *P. gingivalis* - one of the most studied oral bacterial species - produces a group of enzymes named gingipains that are involved in tissue destruction and colonization as well as in host defense perturbation [13]. It has also recently been proposed that multispecies bacterial biofilms release a factor that affects the cellular integrity and protective role of the JE against PD [14].

Because of its permeability, the surface of the JE at the sulcus bottom is susceptible to bacterial attack that could perturb its functional and structural integrity [1, 15]. Such perturbation creates a space referred to as a periodontal pocket that is of particular relevance since bacteria can now directly deliver their toxins along a larger surface. This expanded activity prevents reattachment and aggravates cellular dysfunction of the JE, and extends damage beyond the JE to supporting tissues [10]. As such, the transformation of the JE into a pocket epithelium is considered as a determinant trait in the development of periodontitis [2].

Despite the importance of periodontal pockets, the mechanisms leading to their initiation are still obscure [16]. Disruption of the adhesive interface would inexorably favor JE detachment and periodontal pocket formation. Yet, there is not much known on the susceptibility of the adhesive sBL to bacterial degradation to which it is continuously exposed [16]. Our objective was, therefore, to determine whether bacteria from the oral microbiome can degrade the individual components of the sBL, thereby affecting its supramolecular organization and functionality. Individual proteins constituting the sBL were purified and exposed to selected periodontopathogenic bacteria and to proteases. We have also evaluated bacterial activity *ex vivo* on a reconstituted sBL and the native sBL itself. All components of the sBL, except SCPPPQ1, were found to be susceptible to bacteria and their enzymes, and both reconstituted and native sBLs were degraded upon exposure to bacteria known to play a major role in PD. These results demonstrate for the first time that the sBL can be the target of degradation by bacteria that are involved in PD.

IV.5 - Results

IV.5.1 - In vitro susceptibility of sBL proteins to oral bacteria

Recombinant sBL proteins were incubated during two hours with various oral bacteria and Western immunoblotting analysis revealed no degradation in the presence of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* (**Fig. IV.1A**). In contrast, incubation with *P. gingivalis*, *T. denticola*, and *P. intermedia* resulted in complete degradation of AMTN, ODAM but not of SCPPPPQ1 (**Fig. IV.1B**). SDS-PAGE and Western blot analysis of shorter incubation periods of AMTN and ODAM with *P. gingivalis* revealed an almost instantaneous and complete degradation of both proteins (**Fig. IV.S1**). The presence of a cocktail of protease inhibitors decreased the extent degradation of AMTN, resulting in a persistent band at around 20 kDa. Under this same condition, degradation of ODAM was still complete (**Fig. IV.S2**). Lm332 was also entirely degraded as early as 15 min following incubation with *P. gingivalis* (**Fig. IV.S3**).

To confirm the degradation of the proteins and to determine their cleavage sites, we performed mass spectrometry using the top down assay after incubation of the sBL proteins with *P. gingivalis* (**Fig. IV.2**). The bacteria extensively cleaved AMTN into multiple fragments of 1 to 14 kDa and ODAM of 1 to 9 kDa. The predominant fragments were from 2 to 5 kDa for both proteins (**Table IV.S1-S2**). SCPPPPQ1 was not degraded after incubation with *P. gingivalis*, confirming the above SDS-PAGE and Western blot analysis observations. Under the control condition, at time 0 and when no bacteria were added to the samples during two hours, no degradation was observed (**Fig. IV.1, IV.2, IV.S1-3**).

Bacteria at time 0 and 2 hours were observed by scanning electron microscopy (SEM) to evaluate whether degradation of the proteins resulted in any change in structural appearance. Bacteria first exposed to proteins prior to placing on a support for SEM analysis showed outer membrane vesicles (OMVs) that are bulging out from the surface of *P. gingivalis* compared to bacteria incubated the same period but in buffer only (**Fig. IV.3**).

IV.5.2 - Enzymatic degradation of the sBL proteins

To evaluate the classes of proteases that may be involved in degradation of the sBL constituents, an *in silico* analysis was first performed using “Peptide cutter” [17]. The chosen proteases and their potential number of cleavage sites in each protein are listed in **Table IV-S3**. AMTN, ODAM, and SCPPPQ1 appear to be sensitive, at different levels, to all the enzymes. Next, the proteins were incubated *in vitro* with each protease to determine whether they are susceptible to cleavage (**Fig. IV.4**). The results showed that the proteins are degraded more extensively by enzymes from the Serine-protease family than to Cysteine or Aspartic proteases. Subtilisin and the Proteinase K appeared to digest the sBL proteins most efficiently. Trypsin-like proteases, which are produced by a number of periodontopathogenic bacteria [13], degraded AMTN and ODAM, but not SCPPPQ1. As predicted from *in silico* analysis (**Table IV.S3**), the endoproteinase Glu-C poorly cleaved the sBL proteins. Finally, the Elastase proteases that target several potential cleavage sites in the three proteins only completely cleaved ODAM.

IV.5.3 - Degradation of the supramolecular network of the sBL

As previously shown, mixing of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 results in the formation of a supramolecular network similar to what has been described for typical BL [6]. Sequential application of the four known components of sBL to Highly Ordered Pyrolytic Graphitic (HOPG) substrate for atomic force microscopy (AFM) resulted in formation of a nanoporous molecular network. The nanopores had an average diameter of 66,72 nm² when mixing AMTN, ODAM and SCPPPQ1, and of 36,05 nm² when Lm332 was also added (data not shown). To observe the impact of oral bacteria on a this ‘reconstituted’ sBL network, we exposed it to *P. gingivalis* and observed the results by AFM (**Fig. IV.5A-C**) and SEM (**Fig. IV.5D-E**). There was destruction of the supramolecular network creating a peripheral space around the bacteria (\approx 10 nm deep, **Fig. IV.5 arrows and IV.S4**), indicating that bacterial products degraded, at least in part, the ‘reconstituted’ sBL network. In fact, SEM imaging further showed the presence of fine filamentous residual matrix on the exposed HOPG surface, suggesting the incomplete degradation of some components and a layered destruction of the network (**Fig. IV.5E**). Exposition of the reconstituted sBL to *A. actinomycetemcomitans* does not show any area of destruction around the bacteria (**Fig. IV.S5B-D**), which is consistent with the *in vitro* assay.

IV.5.4 - Degradation of the native sBL

Finally, to determine the effect of *P. gingivalis* on the native sBL itself, in the absence of any inflammatory contribution, we exposed microdissected enamel organ caps (**Fig. IV.6A-D**) and JE samples (**Fig. IV.7**) [18, 19] to *P. gingivalis*. After two hours of exposure, SEM analysis revealed the presence of a shallow depression around the bacteria (**Fig. IV.6C**) and after 6 h, the affected peri-bacterial area became deeper (**Fig. IV.6D**), suggesting active degradation of the sBL. Peri-bacterial degradation of the sBL was also confirmed on the native sBL of the JE (**Fig. IV.7**). Incubation of enamel organ caps with *A. actinomycetemcomitans* did not exhibit any destruction even after 6 hours (**Fig. IV.S5A**).

IV.6 - Discussion

Distinctively from epithelial-connective tissue interfaces where typical BL are implicated, the JE must adhere to mineralized surfaces. To achieve this, it produces an adhesive extracellular matrix composed of three unique proteins and of Lm332 that form the supramolecular network of a sBL [20]. Our work aims at determining the direct impact of selected periodontopathogenic bacteria from the oral microbiome on the integrity of proteins constituting the sBL. Bacterial biofilms in the gingival sulcus trigger inflammatory processes [7]. Once inflammation occurs, it is impossible to dissociate the tissue destructive effects of bacteria from those caused by inflammatory cells. Previous studies on bacterial-released enzymes and products have largely focused on the destruction of connective tissue components that lie below the JE [16]. Our work innovates by its focus on the sBL in a context where inflammation does not intervene. In addition to *in vitro* assays, we have reconstituted a sBL-like structure [6] and used tissue samples [18] for *ex-vivo* studies on the native sBL itself. The *in vitro* and *ex vivo* results presented here demonstrate that some bacteria such as *P. gingivalis* can degrade sBL proteins and affect the structural integrity of both reconstituted and native sBLs.

When the equilibrium of the oral microbiome is compromised, virulent late colonizers such as *P. gingivalis* and *T. denticola*, will increase their presence in the oral biofilm. This is usually preceded by bridging colonizers that prime the environment to facilitate the propagation of

bacteria [11]. *P. intermedia*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* are part of this latter cluster. We have found that *P. intermedia* exhibits a similar potential to cleave the sBL proteins via its proteolytic enzymes as *P. gingivalis* and *T. denticola*, but *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* do not. Therefore, *P. intermedia* could act to weaken the gingival seal to facilitate infiltration by the more aggressive late colonizing species such as *P. gingivalis* and *T. denticola*. Continuous adulteration of the sBL by bacterial enzymes would slow down any effort of the JE to reattach to the tooth mineral. This may lead to a self-perpetuating cycle whereby as the pocket increases in size there will be more space for bacteria and a greater surface for attack of the sBL by proteases and for affecting JE cell cohesion [14].

Oral bacteria such as *P. gingivalis* release a cocktail of enzymes through outer membrane vesicles (OMVs) or as soluble proteins, consisting of trypsin-like proteases called gingipains [21]. Our findings demonstrate that trypsin-like proteases efficiently degrade AMTN and ODAM, which *in vivo* could cause JE detachment. Numerous studies have shown the high sensitivity of Lm332 to trypsin-like proteases [22]. Trypsin digestion of AMTN results in a major fragment that has a size of 14kDa and digestion of ODAM produces several low molecular-weight fragments. These fragments were also detected by mass spectrometry following exposure to *P. gingivalis*. Surprisingly, SCPPPQ1 was not affected by trypsin, which is consistent with its relative resistance to the oral bacteria. Also, as visualized by SEM some fragments of the reconstituted sBL remain on the HOPG surface following exposure to bacteria. The residual material appears as linear profiles suggesting that it could be SCPPPQ1 that assumes a similar appearance on HOPG [6].

Gingipains are translocated to the cell surface and/or directly into the surrounding environment and they are likely responsible for the degradation observed here [23]. They cross the bacterial cell envelope via a recently discovered type IX secretion system (T9SS) [24]. During translocation, proteinases are linked to an anionic-LPS in order to attach to the cell wall. Also, the bacterial outer membrane bulges out to produce OMVs [25] and vesicles similar to OMVs [26] were observed both on the reconstituted and native sBL following exposure to *P. gingivalis*. Targeting the secretion pathway [27] of gingipains may allow to thwart the destructive effects

of oral bacteria such as *P. gingivalis* on the sBL and prevent JE detachment very early on to prevent initiation and propagation of periodontal pockets [16].

ODAM expression is reduced in animal models of PD induced using *P. gingivalis*/dextran sulfate sodium treatment or by damage [28]. Also, its presence increases in the fluid found in the space between the gingiva and the tooth above the JE (crevicular fluid) of patients with periodontitis. As for ODA, numerous fragments of Lm332 are found in the crevicular fluid of patients suffering from PD [29]. JE immunolabelling for AMTN has been reported to decrease over time in *P. gingivalis* infected mice [30]. These outcomes are consistent with the high degradative susceptibility to enzymes and bacteria we have observed.

IV.7 – Conclusion

Our work focuses on the bacterial sensitivity of the adhesive extracellular matrix produced by the JE. Demonstrating that the sBL is a direct target of periodontopathogenic bacteria is thus *a sine qua non* step towards the formation of periodontal pockets. We show here, for the first time, that enzymes and periodontal pathogens can directly attack the individual components of the sBL as well as alter the supramolecular organization of this critical adhesive extracellular matrix. Alteration and detachment of the sBL open the door for bacterial spreading along the JE and through the tooth-supporting tissue, adding a new dimension to the progression of PD. Thus, understanding the first step that allows bacterial invasion through the JE is crucial and will not only help to prevent PD but also to forfend systemic propagation of bacteria that can exploit weakening of the gingival seal to access the inner body. A better understanding of the action of bacteria on the sBL during disease progression may therefore provide novel strategies and identify therapeutic targets to treat PD.

IV.8 – Experimental procedures

IV.8.1 - Cloning procedures

Truncated versions of *odam*, *amtn*, and *scpppq1* genes lacking regions encoding the predicted N-terminal signal sequence were PCR-amplified from human cDNA sequences using primers as previously described [6]. PCR products were cloned into the vector pHT for purification studies [6]. The recombinant pHT plasmids allow to produce recombinant proteins with an in-frame N-terminal hexahistidyl-tag (His-tag) and TEV protease cleavage site. *Escherichia coli* strain XL-1 Blue were used as hosts for cloning.

IV.8.2 - Protein overexpression and purification

BL21(DE3)-star cells containing either pHT-*hAmtn* or pHT-*hOdam* [9] were grown at 37 °C and 250 rpm to an optical density at 660 nm (OD600) around 0.6, and protein expression was induced with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) for 5 h at 30 °C and 250 rpm. Bacterial cells were harvested, suspended in equilibration buffer (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 7) at 4 °C, and sonicated six times 15 s between 15 s ice incubations. Lysates were centrifuged at 13,400 g and the 6His-tagged protein in the supernatant was bound on nickel-nitriloacetic acid (Ni-NTA)-agarose affinity resin (QIAGEN) at room temperature. After washing the resin with 10 volumes of binding buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7), proteins were eluted with elution buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, pH 7). Collected fractions were assessed for protein content using the Bradford assay and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Chosen fractions were then dialyzed into TEV buffer (25 mM Na₂HPO₄, 125 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.4) and had their N-terminal His-tag cleaved using His-tagged TEV protease (Sigma-Aldrich) in a 1:70 ratio (TEV: Protein) overnight at room temperature. Following cleavage, the solution was applied to a Ni-NTA-agarose affinity resin and the flow-through containing cleaved protein was collected. Proteins were dialyzed into 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) and stored at 4 °C. Finally, proteins were purified by size exclusion chromatography using a Superose 6 GL 10/300 gel filtration column for ODAM or a S200 gel filtration column for AMTN (GE Healthcare). Columns were pre-equilibrated with 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4). Fractions were

evaluated for purity by SDS-PAGE. SCPPPQ1 was expressed in pHT-*hScpppq1* [9] and grown and purified in the same conditions as ODAM and AMTN but in denaturing conditions where buffers contained 8 M of Urea. Purified Lm332 was commercially obtained (EUV101, KeraFast, Boston, MA, USA)

IV.8.3 - Prediction of cleavage sites

The tool “Peptide cutter” (Expasy -SIB Swiss Institute of Bioinformatics) [17] was used to predict potential substrate cleavage sites cleaved by chosen proteases in a given protein sequence. We have evaluated how 8 proteases from the Proti-Ace and Proti-Ace 2 kits (Hampton Research) were able to cleave the proteins from the sBL. The proteases used for the assay are listed in **Table IV.S3**.

IV.8.4 - Enzymology assays

20 µg of purified proteins in their final buffer were added to 2.2 µg of 8 proteases in 10 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl, from the Proti-Ace and Proti-Ace 2 kits (Hampton Research), and incubated at 37 °C for 1 h. The resulting products were then analyzed by SDS-PAGE. 20 µg of purified proteins in 20 µl of enzyme buffer (10 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl), served as a control.

IV.8.5 - Bacterial cultures

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 were grown anaerobically (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) at 37 °C in Todd-Hewitt broth (THB; Becton Dickinson, Canada) supplemented with 0.001% hemin and 0.0001% vitamin K. *Treponema denticola* was grown anaerobically in liquid medium containing 12.5 mg of brain heart infusion, 10 mg of trypticase, 2.5 mg of yeast extract, 0.5 mg of sodium thioglycolate, 1 mg of L-cysteine, 0.25 mg of L-asparagine, 2 mg of glucose, 6 µg of thiamine pyrophosphate, and 2 mg of sodium bicarbonate per ml; 2% rabbit serum; and 0.2% volatile fatty acids [130]. The volatile fatty acids solution consisted of 0.5 ml each of isobutyric, DL-2-methylbutyric, isovaleric, and valeric acids dissolved in 100 ml of 0.1 N KOH.

IV.8.6 - Tissue preparation

All animal procedures were approved by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of Université de Montréal. Six wild-type rats of approximately 150 g were anesthetized with 20% chloral hydrate solution (0.4 mg/g body weight; Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) and sacrificed by perfusion through the left ventricle with Ringer's lactate (Abbott Laboratories; Montreal, QC, Canada) for 30 s, followed by a fixative solution consisting of periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) in 0.0375 M PB (pH 7.2) for 15 min at room temperature. PLP is well recognized as a fixative solution minimizing the fixation to maximize the efficiency of the enzymes. Mandibles and maxillae were dissected, and specimens were immersed in the same fixative solution for at room temperature. The samples were rinsed in 0.0375 M PB (pH 7.2) overnight at 4 °C. They were then decalcified with 4.13% disodium ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA, Fisher Scientific) and 0,01% glutaraldehyde for 15 days and were then washed for 24h in 0.0375 M PB (pH 7.2). The decalcified hemimandibles were used to prepare enamel organ caps and the maxillae JE caps.

IV.8.7 - Preparation of enamel organ and JE caps

To examine the effect of bacteria on the native sBL and in the absence of any inflammatory components, we have prepared maturation stage enamel organ caps, as previously described [18]. It should be pointed out here that the JE derives in part from the enamel organ and that the sBL that attaches the enamel organ to maturing enamel is similar in composition to the one attaching the JE to the tooth surface [5, 6, 19, 31-33]. These caps were chosen because their geometry facilitates incubation with bacterial suspensions and are therefore more suited for large scale analysis than JE caps. Some JE caps were also prepared, as previously described [19], to validate the results.

IV.8.8 - Bacterial incubation with purified proteins

Approximately 250 µg of purified proteins was exposed in a test tube, one by one, to 400 µl of a suspension of bacteria at a OD660 of 1 for 2 h at 37 °C. 40 µl was sampled every 15 min for Western blot analysis. Protein alone in the bacterial media was used as a control. The same procedure was applied in presence of a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich). The

number of bacteria in the suspension at the start and end of the assay was evaluated by scanning electron microscopy (SEM).

IV.8.9 - Bacterial incubation with enamel organ and JE caps

Enamel organ and some JE caps were exposed to 1 ml of a bacterial suspension for 2 and 6 h at 37 °C followed by fixation and processing for SEM as described below.

IV.8.10 - Top-down LC-MS/MS analysis

Samples before and after incubation with *P. gingivalis* were diluted in 25% ACN 0.3%TFA and loaded onto a 50x4.6 mm PLRP-S 300A column (Agilent Technologies) connected to an Accela pump (Thermo Scientific) and a RTC autosampler (Pal systems). The buffers used for chromatography were 0.1% formic acid (buffer A) and 100% acetonitrile/0.1% formic acid (buffer B). Proteins and peptides were eluted with a two-slope gradient at a flow rate of 120 mL/min. Solvent B first increased from 20 to 40% in 70 min and then from 40 to 70% in 5 min. The HPLC system was coupled to Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Scientific) through an Electrospray Ion Source. The spray and S-lens voltages were set to 3.6 kV and 50 V, respectively. Capillary temperature was set to 225 °C. Full scan MS survey spectra (m/z 500-1700) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 120,000 with a target value at 5e5. The 3 most intense protein/peptide ions were fragmented in the HCD collision cell and analyzed in the Orbitrap with a target value at 5e5 and a normalized collision energy at 36 V. Target ions selected for fragmentation were dynamically excluded for 25 sec.

For data processing, protein database searching was performed with ProSightPC 4.0.2.1 (Thermo Scientific) against the protein sequences of interest. The mass tolerances for precursor and fragment ions were set to 1000 Da and 20 ppm, respectively. The minimum number of matching fragments was set to 4 and the only modification used was acetylation of protein N-terminal. The number of matching fragments were quantified and classified according to molecular weight to evaluate the effect of *P. gingivalis* incubation on each protein.

IV.8.11 - Atomic force microscopy

Atomic Force Microscopy (AFM) imaging was performed using a JEOL JSPM-5200 Scanning Probe Microscope. A 10 µl drop of a sample solution containing a mix of AMTN, ODAM, SCPPPQ1 and Lam332 (from 5 µg/ml to 1 µg/ml) was incubated for 5 min on a Highly Ordered Pyrolytic Graphite (HOPG) substrate. Then, the HOPG surface was rinsed 3 times with 50 ml of distilled water (dH₂O) and air-dried. Some samples were incubated with bacteria for 1 min or 2 h before rinsing and air-drying steps. All imaging was observed under dry conditions and was carried out using the tapping mode at room temperature. The cantilevers used (HQ-NSC14, MicroMasch, USA) had a spring constant of 5.7 N/m. The scan speed was 0.5 Hz and scan size was 1.5 Å~ 1.5 mm. The samples were visualized as topographic images and 3D images at a resolution of 512 Å~ 512 pixels using Gwyddion.

IV.8.12 - Scanning electron microscopy

Following bacterial incubations, tissues and bacterial samples were fixed for 1 h at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde and subsequently rinsed three times with 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.3, and incubated for 30 min in 1% osmium tetroxide at RT. The tissues were dehydrated through an ethanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 95% and two times 100%) followed by drying using a Critical Point Drier CPD300 (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada). Characterization of the samples was carried out by a JEOL JSM-7400F (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) operated at 1.5 kV. A FE-SEM Regulus 8230 (Hitachi, Tokyo, Japan), operated between 0,8 and 1,5 kV, was used for higher resolution images to observe the bacterial effects on the sBL.

IV.9 - Acknowledgement

We extend our thanks to Katia Julissa Ponce and Annie Leduc (Université de Montréal) for their technical assistance, Dr. Denis Faubert for access to the Proteomics discovery platforms and HITACHI for time allocation to their SEM platform. This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research [A.N. (CIHR MOP-110972)] and the Network for Oral and Bone Health Research (FRQ-S). A.N. is recipient of a Canada Research Chair in Calcified tissues,

Biomaterials and Structural Imaging. A.F. received a scholarship from the Cellular Dynamics of Macromolecular Complexes NSERC-CREATE program.

IV.10 - References

- [1] H.E. Schroeder, M.A. Listgarten, *The gingival tissues: The architecture of peridontal protection*, Periodontol. 2000 13 (1997) 91-120.
- [2] D.D. Bosshardt, N.P. Lang, *The junctional epithelium: from health to disease*, J. Dent. Res. 84(1) (2005) 9-20.
- [3] X. Li, K.M. Kolltveit, L. Tronstad, I. Olsen, *Systemic diseases caused by oral infection*, Clinical Microbiology Reviews 13(4) (2000) 547-558.
- [4] M. Hormia, K. Owaribe, I. Virtanen, *The dento-epithelial junction: cell adhesion by type I hemidesmosomes in the absence of a true basal lamina*, J Periodontol. 72(6) (2001) 788-797.
- [5] J. Dos Santos Neves, R. Wazen, S. Kuroda, S. Zalzal, P. Moffatt, A. Nanci, *Odontogenic ameloblast-associated and amelotin are novel basal lamina components*, Histochem. Cell Biol. 137(3) (2011) 329-338.
- [6] A. Fouillen, J. Dos Santos Neves, C. Mary, J.D. Castonguay, P. Moffatt, C. Baron, A. Nanci, *Interactions of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins of a specialized basal lamina that attaches epithelial cells to tooth mineral*, Sci. Rep. 7 (2017) 46683.
- [7] M. Costalonga, M.C. Herzberg, *The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries*, Immunol. Lett. 162 (2 Pt A) (2014) 22-38.
- [8] I.J. Schytte Bix, R. Hars, H.R. Preus, K. Helgeland, *Entrance of Actinobacillus actinomycetemcomitans into HEp-2 Cells In Vitro*, J. Periodontol. 63 (1992) 723-728.
- [9] J. Sandros, P.N. Papananou, G. Dahlén, *Porphyromonas gingivalis invades oral epithelial cells in vitro*, J. Periodont. Res. 28 (1993) 219-226.
- [10] Y. Suzumura, Y. Kameyama, M. Mizutani, M. Kato, K. Kondo, R. Mabuchi, *Long junctional epithelium produced by application of bacterial proteases in rats*, J Periodont Res 24 (1989) 217-221.

- [11] S. Socransky, A. Haffajee, M. Cugini, C. Smith, R. Kent Jr, *Microbial complexes in subgingival plaque*, J. Clin. Periodontol. 25 (1998) 134-144.
- [12] R. Lamont J, A. Chan, C. Belton M, K. Izutsu, D. Vasel, A. Weinberg, *Porphyromonas gingivalis Invasion of Gingival Epithelial Cells*, Infect. Immun. 63(10) (1995) 3878-3885.
- [13] M.A. Curtis, M. Ramakrishnan, J.M. Slaney, *Characterization of the trypsin-like enzymes of Porphyromonas gingivalis W83 using a radiolabelled active-site-directed inhibitor*, J. Gen. Microbiol. 139 (1993) 949-955.
- [14] J. Bi, L. Koivisto, A. Pang, M. Li, G. Jiang, S. Aurora, Z. Wang, G.R. Owen, J. Dai, Y. Shen, D. Grenier, M. Haapasalo, L. Hakkinen, H. Larjava, *Suppression of alphavbeta6 Integrin Expression by Polymicrobial Oral Biofilms in Gingival Epithelial Cells*, Sci. Rep. 7(1) (2017) 4411.
- [15] H.E. Schroeder, R. Attstrom, *Effect of mechanical plaque control on development of subgingival plaque and initial gingivitis in neutropenic dogs*, J. Dent. Res. 87 (1979) 279-287.
- [16] D.D. Bosshardt, *The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences*, Periodontol. 2000 76 (2018) 43-50.
- [17] P. Artimo, M. Jonnalagedda, K. Arnold, D. Baratin, G. Csardi, E. de Castro, S. Duvaud, V. Flegel, A. Fortier, E. Gasteiger, A. Grosdidier, C. Hernandez, V. Ioannidis, D. Kuznetsov, R. Liechti, S. Moretti, K. Mostaguir, N. Redaschi, G. Rossier, I. Xenarios, H. Stockinger, *ExPASy: SIB bioinformatics resource portal*, Nucleic Acids Res. 40(Web Server issue) (2012) W597-603.
- [18] A. Nanci, S. Zalzal, C.E. Smith, *Application of backscattered electron imaging and lectin-gold cytochemistry to visualize the distribution of glycoconjugates in a basal lamina*, Scanning Microsc. 1 (1987) 1963-1970.
- [19] P. Moffatt, C.E. Smith, R. St-Arnaud, D. Simmons, J.T. Wright, A. Nanci, *Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium*, Biochem. J. 399 (2006) 37-46.

- [20] R.M. Wazen, L.C. Viegas-Costa, A. Fouillen, P. Moffatt, T.L. Adair-Kirk, R.M. Senior, A. Nanci, *Laminin gamma2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects*, Matrix Biol. (2016).
- [21] A.A. DeCarlo, G.J. Harber, *Hemagglutinin activity and heterogeneity of related Porphyromonas gingivalis proteinases*, Oral Microbiol. Immunol. 12 (1997) 47-56.
- [22] K. Sawada, M. Nishibori, N. Nakaya, Z. Wang, K. Saeki, *Purification and Characterization of a Trypsin-Like Serine Proteinase from Rat Brain Slices that Degrades Laminin and Type IV Collagen and Stimulates Protease-Activated Receptor-2*, J. Neurochem. 74 (1999) 1731-1738.
- [23] K. Sato, H. Yukitake, Y. Narita, M. Shoji, M. Naito, K. Nakayama, *Identification of Porphyromonas gingivalis proteins secreted by the Por secretion system*, FEMS Microbiol. Lett. 338(1) (2013) 68-76.
- [24] A.M. Lasica, M. Ksiazek, M. Madej, J. Potempa, *The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function*, Front Cell Infect Microbiol 7 (2017) 215.
- [25] P.D. Veith, Y.Y. Chen, D.G. Gorasia, D. Chen, M.D. Glew, N.M. O'Brien-Simpson, J.D. Cecil, J.A. Holden, E.C. Reynolds, *Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors*, J. Proteome Res. 13(5) (2014) 2420-32.
- [26] Y. Zhu, S.G. Dashper, Y.Y. Chen, S. Crawford, N. Slakeski, E.C. Reynolds, *Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola synergistic polymicrobial biofilm development*, PLoS One 8(8) (2013) e71727.
- [27] B. Casu, T. Arya, B. Bessette, C. Baron, *Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101*, Sci. Rep. 7(1) (2017) 14907.
- [28] H.K. Lee, S. Ji, S.J. Park, H.W. Choung, Y. Choi, H.J. Lee, S.Y. Park, J.C. Park, *Odontogenic Ameloblast-associated Protein (ODAM) Mediates Junctional Epithelium Attachment to Teeth via Integrin-ODAM-Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 5 (ARHGEF5)-RhoA Signaling*, J. Biol. Chem. 290(23) (2015) 14740-53.

- [29] G. Emingil, H. Kuula, E. Pirila, G. Atilla, T. Sorsa, *Gingival crevicular fluid laminin-5 gamma2-chain levels in periodontal disease*, J. Clin. Periodontol. 33(7) (2006) 462-8.
- [30] Y. Nakayama, R. Kobayashi, S. Matsui, H. Matsumura, Y. Iwai, K. Noda, M. Yamazaki, T. Kurita-Ochiai, A. Yoshimura, T. Shinomura, B. Ganss, Y. Ogata, *Localization and expression pattern of amelotin, odontogenic ameloblast-associated protein and follicular dendritic cell-secreted protein in the junctional epithelium of inflamed gingiva*, Odontology 105(3) (2017) 329-337.
- [31] A. Nanci, *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*, Mosby Elsevier, St-Louis, 2017.
- [32] P. Moffatt, C.E. Smith, R. St-Arnaud, A. Nanci, *Characterization of Apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia*, J. Cell. Biochem. 103(3) (2008) 941-56.
- [33] P. Moffatt, R.M. Wazen, J. Dos Santos Neves, A. Nanci, *Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces*, Cell Tissue Res. 358(3) (2014) 843-855.

IV.11 – Figures legends

Fig IV.1: Western blot analysis following *in vitro* exposure of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 to bacteria. (A) There is no degradation with *F. nucleatum* or *A. actinomycetemcomitans* (B) while *P. gingivalis* degrade AMTN and ODAM in less than 15 min, but SCPPPQ1 is not affected.

Fig IV.2: Top-down Mass spectrometry of (A) AMTN, (B) ODAM and (C) SCPPPQ1 before (Blue) and after (orange) incubation with *P. gingivalis* confirms the degradation of AMTN and ODAM and the non-degradation of SCPPPQ1 observed by Western blot analysis (Fig. 1 and S1). The right panels highlight the cleavage sites (red arrows) for the proteins.

Fig IV.3: Scanning electron microscopy of bacteria after a two hours exposure to (A) buffer alone and (B) buffer containing SCPPPQ1. Following exposure to the protein, numerous outer membrane vesicles (arrows) appear on the bacterial surface.

Fig IV.4: SDS-PAGE analysis of the *in vitro* digestion of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 with various enzymes reveals that the proteins are differentially susceptible to the various protease families tested.

Fig IV.5: Atomic Force microscopy (AFM) of (A) the supramolecular network formed by AMTN, ODAM, SCPPPQ1 and Lm332, and (B-C) its local alteration (arrow) by *P. gingivalis* (*Pg*) to create a peribacterial region of destruction. Scanning electron microscopy of the AFM preparations (D-E) confirms the peripheral destruction and additionally shows the presence of residual filamentous material (*) in the affected region.

Fig IV.6: Scanning electron microscopy preparations. (A) Overview (dashed area) and (B) higher magnification view of the exposed sBL on an enamel organ cap. Following exposure of the sBL to *P. gingivalis* (*Pg*) for (C) 2 h zones of alteration can be seen around the bacteria (red dashed lines) and (D) after 6 h the peribacterial zones appear cavitated (arrow).

Fig IV.7: Scanning electron microscopy of junctional epithelium caps exposed to *P. gingivalis* (*Pg*) for six hours. Similarly to the exposure of enamel organ caps, there is a peribacterial alteration of the native sBL (arrows).

IV.12 – Figures

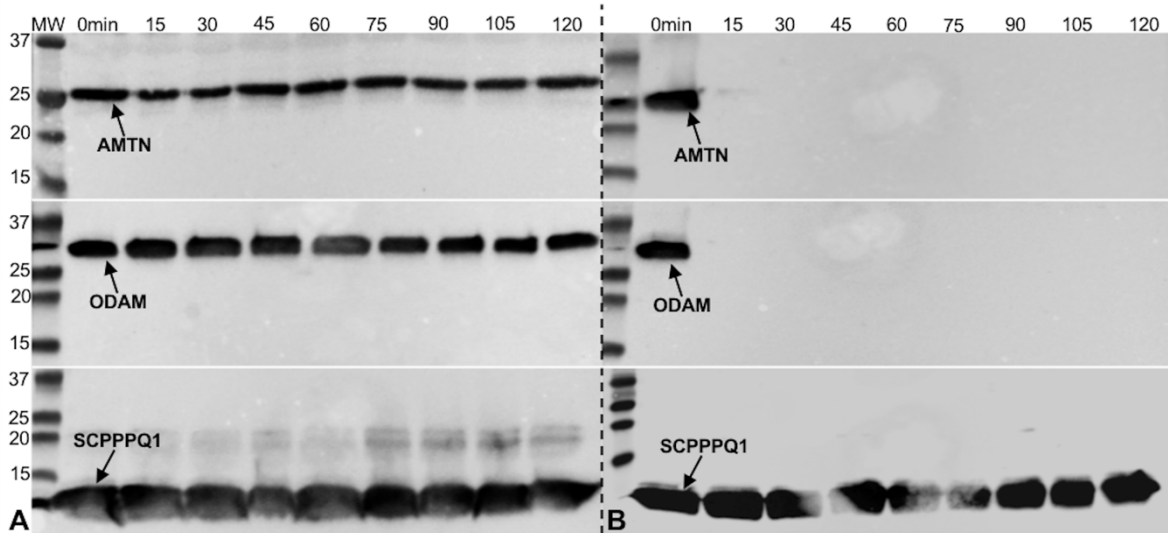


Figure IV.1 : Western blot analysis following *in vitro* exposure of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 to bacteria

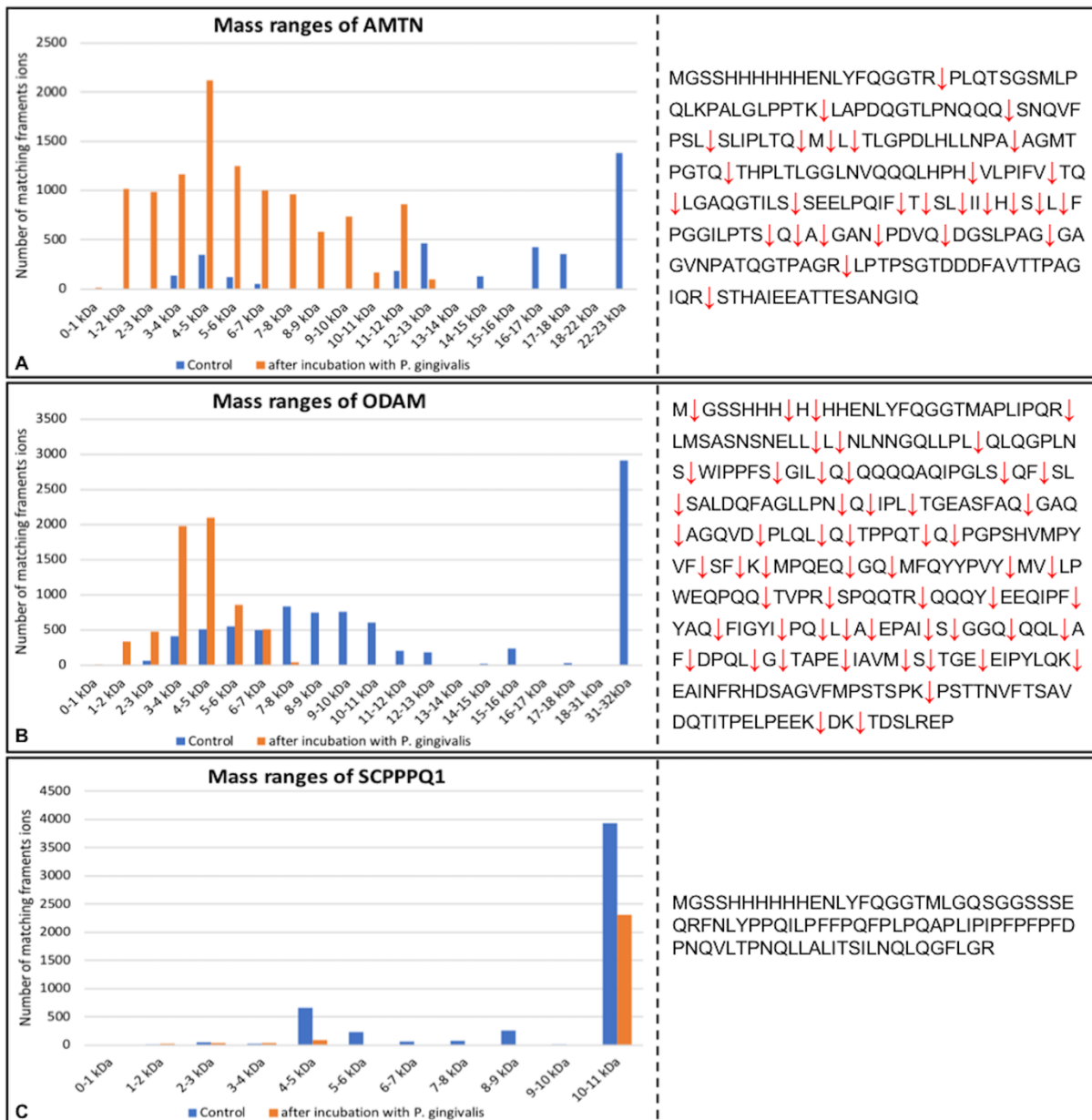


Figure IV.2 : Top-down Mass spectrometry of (A) AMTN, (B) ODAM and (C) SCPPPQ1 before (Blue) and after (orange) incubation with *P. gingivalis*

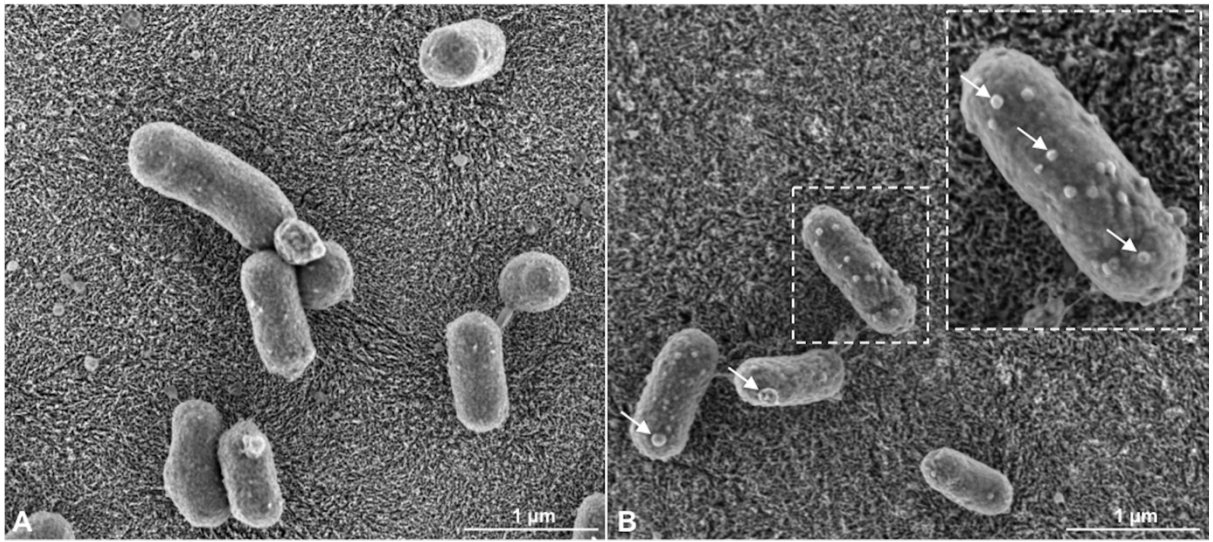


Figure IV.3 : Scanning electron microscopy of bacteria after a two hour exposure to (A) buffer alone and (B) buffer containing SCPPPQ1

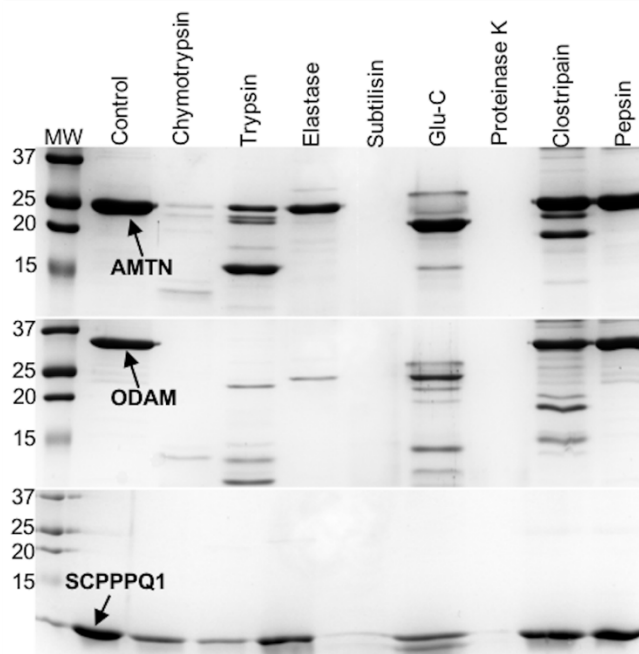


Figure IV.4 : SDS-PAGE analysis of the *in vitro* digestion of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 with various enzymes

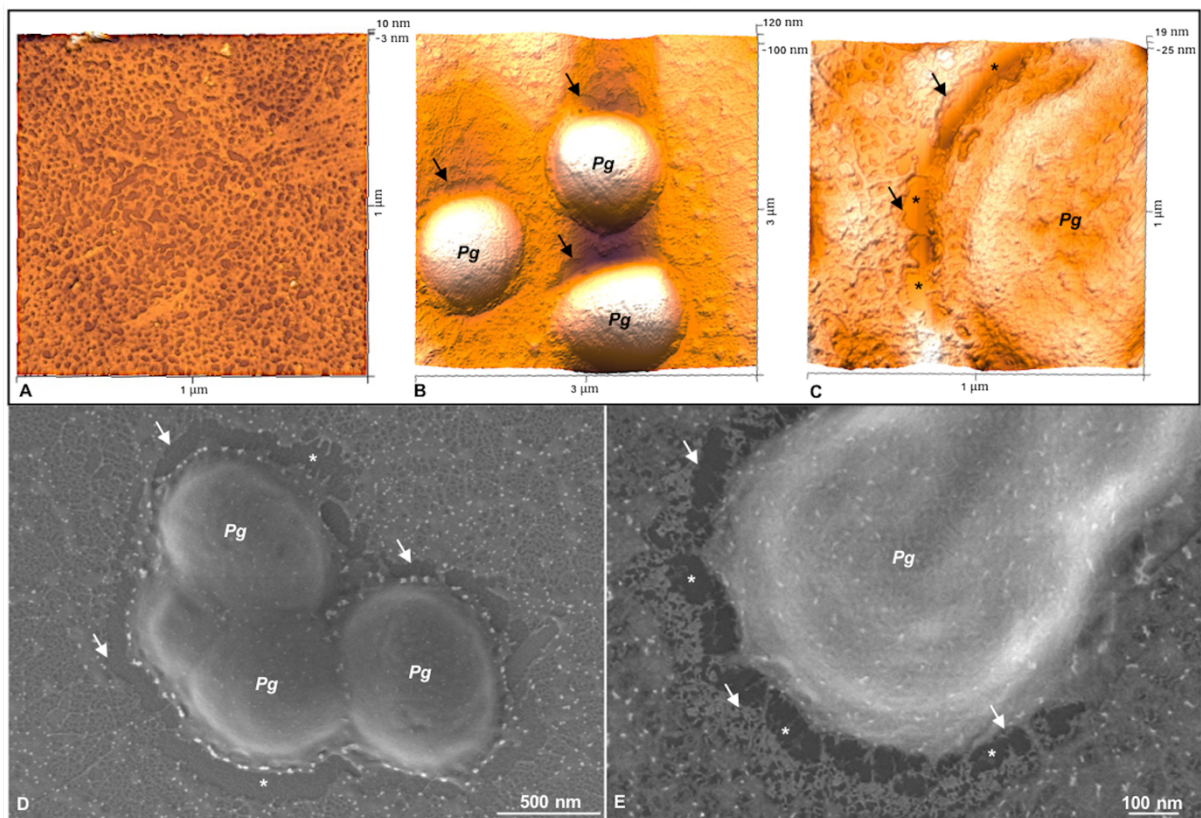


Figure IV.5 : Atomic Force and Scanning electron microscopies of the supramolecular network

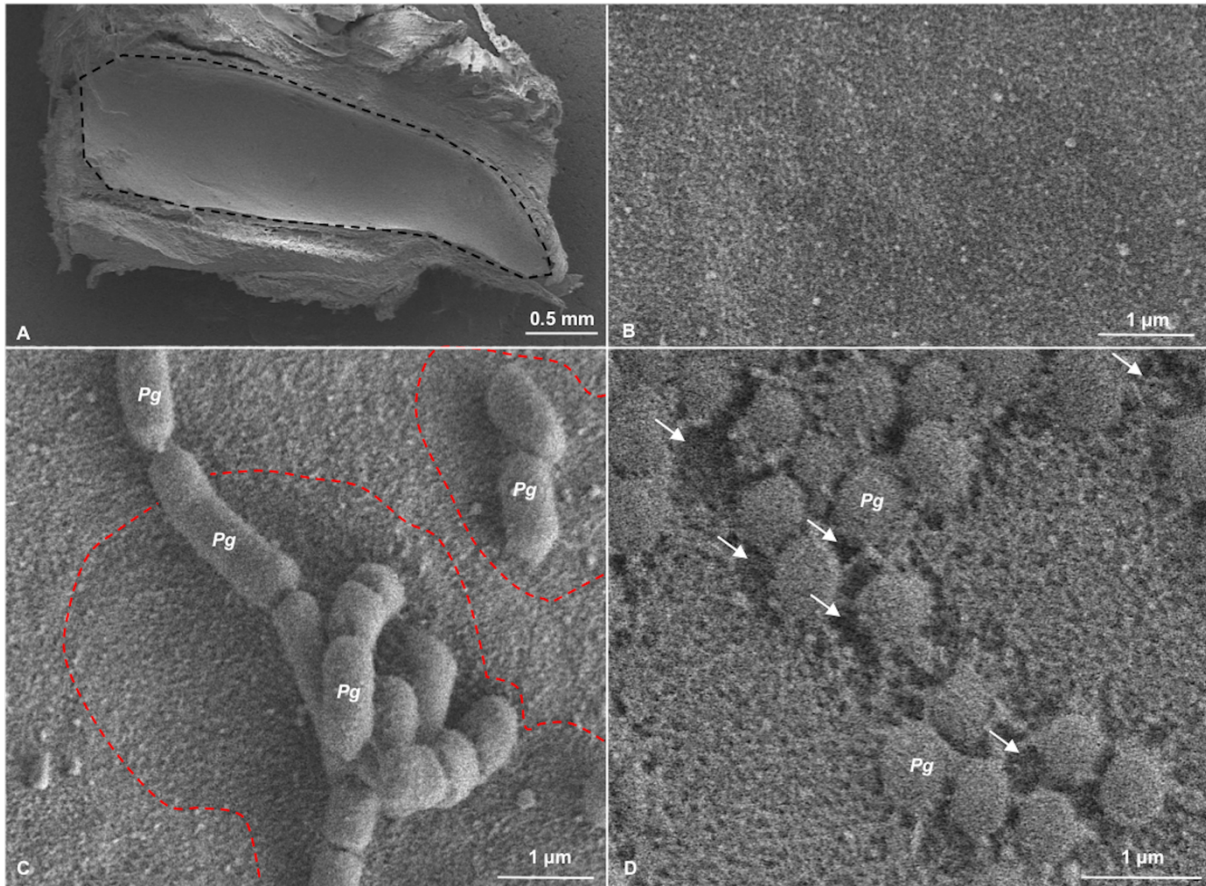


Figure IV.6 : Scanning electron microscopy of enamel organ cap preparations

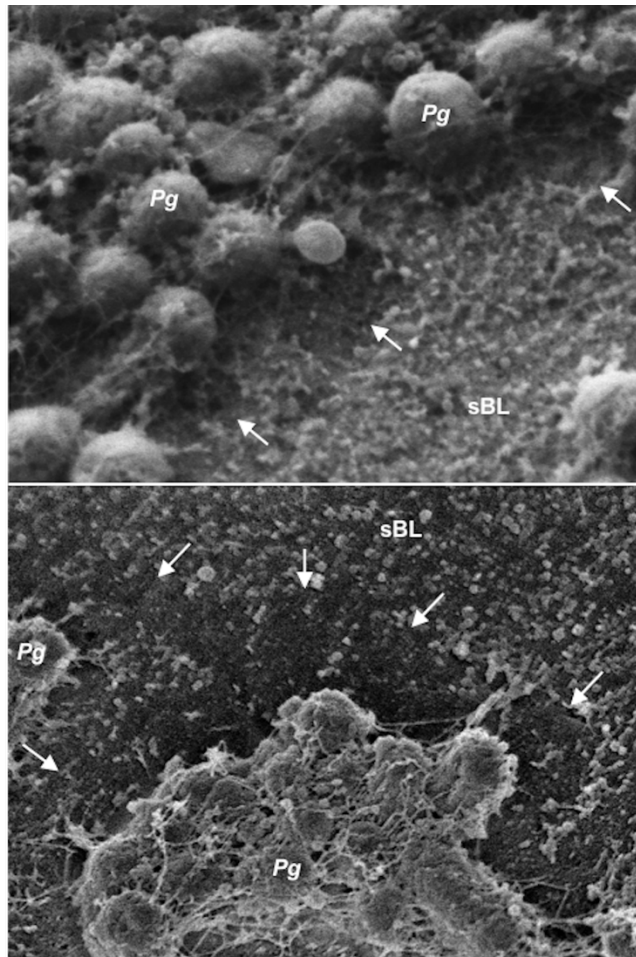
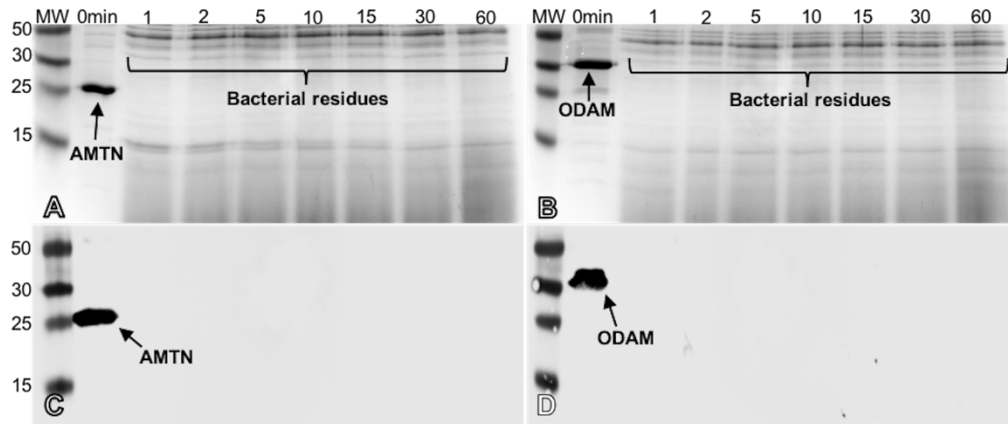


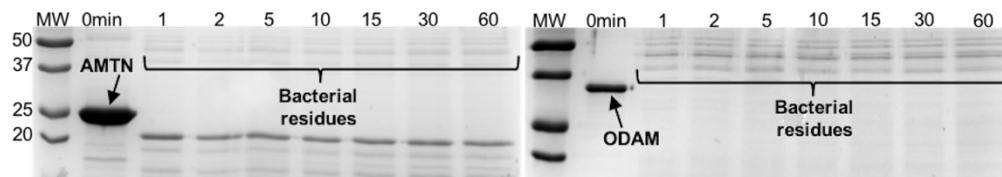
Figure IV.7 : Scanning electron microscopy of junctional epithelium caps exposed to *P. gingivalis* (*Pg*) for six hours

IV.13 – Supplemental figures



Supplementary figure IV.1 : SDS-PAGE (top) and Western-blot (bottom) analysis of *in vitro* digestion assays of AMTN and ODAM by *P. gingivalis*

AMTN (**A-C**) and ODAM (**B-D**) are digested totally and extremely rapidly (under 1 min).



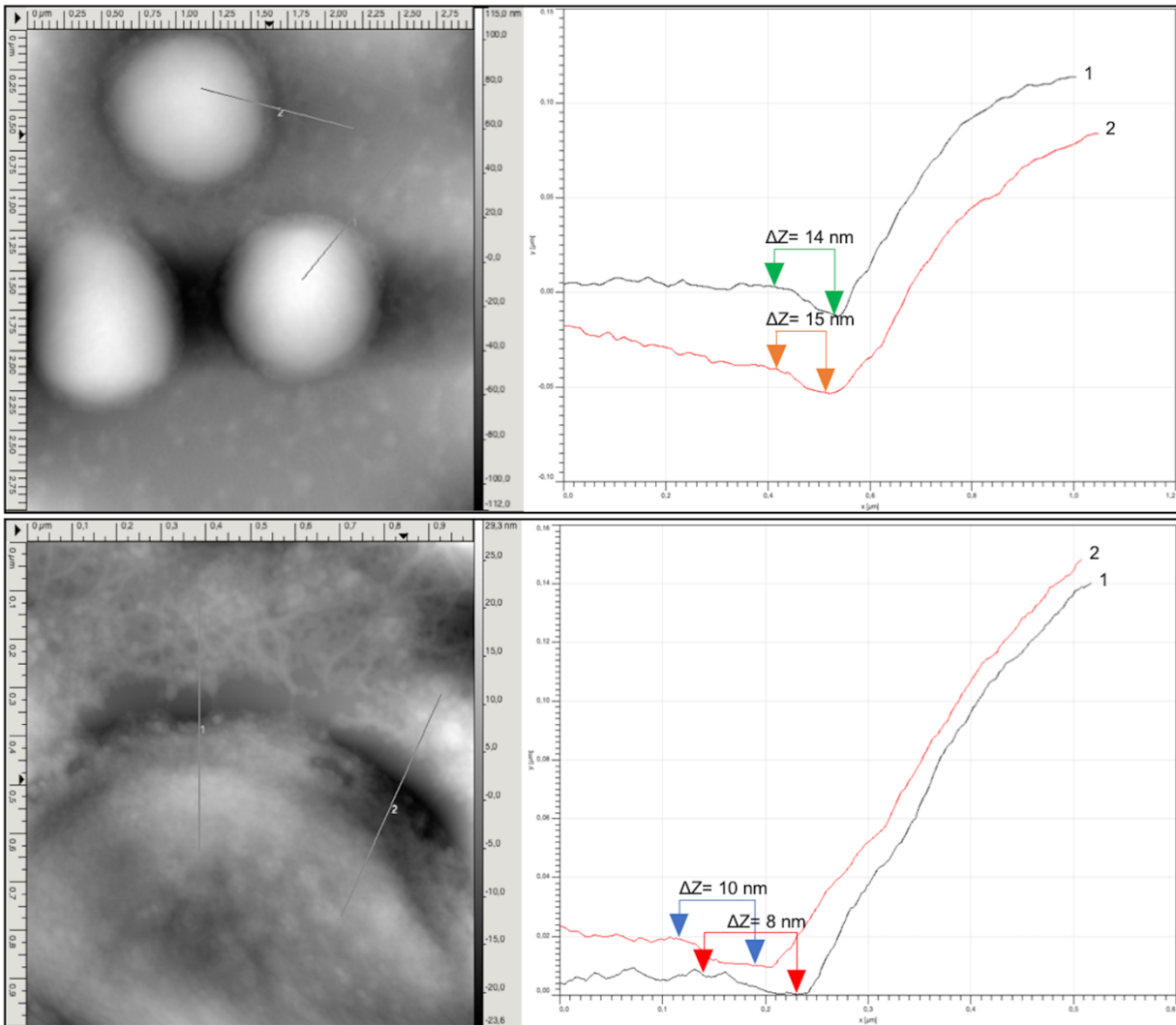
Supplementary figure IV.2 : SDS-PAGE analysis of the *in vitro* digestion of AMTN and ODAM by *P. gingivalis* in the presence of a cocktail of protease inhibitors

While AMTN is still partially digested, ODAM is completely degraded within as little as one minute.



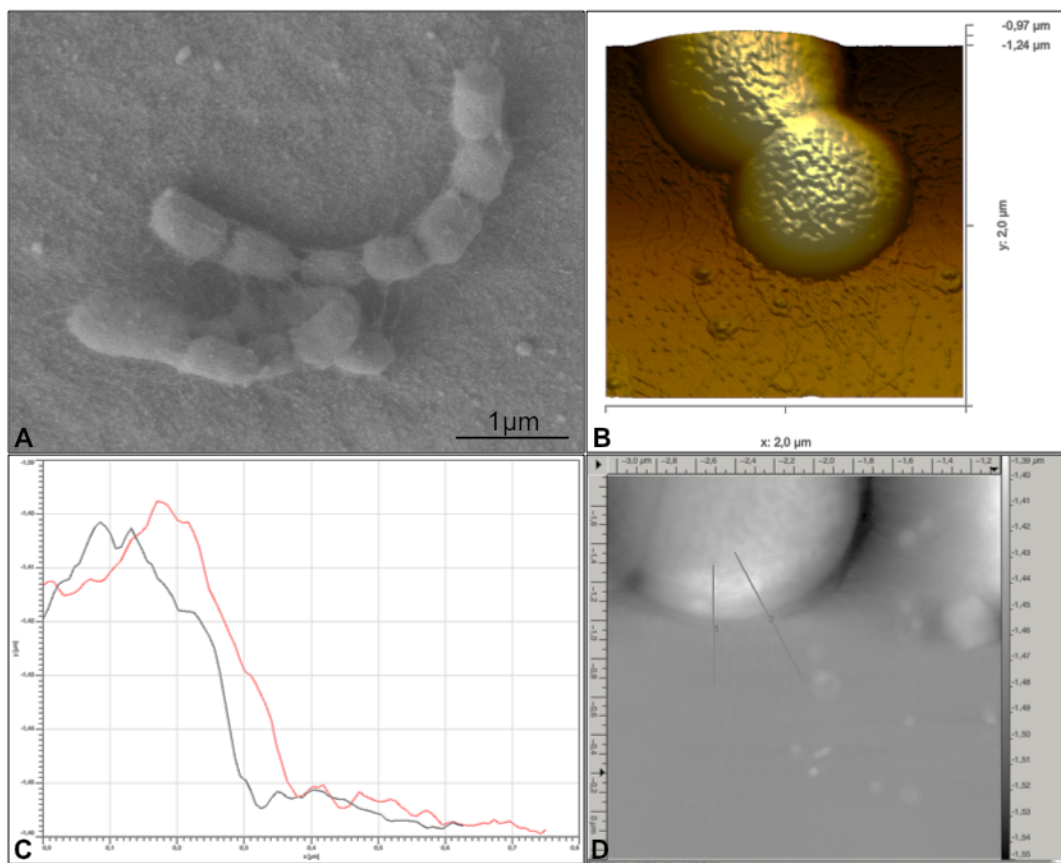
Supplementary figure IV.3 : Western blot analysis of the *in vitro* digestion of Lm332 over time with *P. gingivalis*

The $\alpha 3$ sub-unit of Lm332 is susceptible to proteases released by the bacteria.



Supplementary figure IV.4 : Exposure to *P.gingivalis* to a reconstituted sBL causes a pericellular destruction area

Atomic force microscopy analysis shows that the depth of the resulting crater ranges from 8 to 15 nm.



Supplementary figure IV. 5 : Exposure to *A. actinomycetemcomitans* to both reconstituted and native sBL reveals no destruction area

Scanning electron microscopy (A) on the native sBL reveals no destruction area after 6 hours exposure with *A. actinomycetemcomitans*. Atomic force microscopy shows (B) no degradation of the reconstituted sBL by *A. actinomycetemcomitans* and the analysis (C-D) demonstrated the absence of depth around the bacteria (black line = line 1; red line = line 2).

VQQQLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQIF	3666,97
TSLIHSLFPGGILPTSQAGANPDVQDGSLPAGGAGVN	3627,85
PQIFTSLIHSLFPGGILPTSQAGANPDVQDGSLSL	3588,83
SEELPQIFTSLIHSLFPGGILPTSQAGANPDVQ	3575,85
QQLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQIFT	3540,90
NSLKRVDVSLGGCSLNKPPFLMLLKGSTRFNKT	3521,85
MTPGTQTHPLTLGGLNVQQQLHPHVLPIFVTQ	3501,85
TLGPDLLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQQQ	3489,80
MLTLGPDLLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQ	3477,81
QQLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQIF	3439,85
VQQQLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQ	3406,82
LGPDLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQQQ	3388,76
VLPFVTQLGAQGTLSSEELPQIFTSLIH	3363,86
LTLGPDLLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQ	3346,77
QLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQIF	3311,79
LPNVDLVLSQTKDIARARRLQAEAEEAR	3292,74
LAPDQGTLPNQOQSNQVFPSSLIPLTQML	3278,70
LLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQQQLHPH	3240,68
TLGPDLLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQ	3233,68
LHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQIF	3183,73
QQLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQ	3179,70
LGPDLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQ	3132,64
LPFVTQLGAQGTLSSEELPQIFTSLI	3125,44
VLPFVTQLGAQGTLSSEELPQIFTSLI	3115,47
LTPTFNKLCGNSRQMACTPISCPGELCPQ	3109,47
QLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQ	3051,64
LHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQ	3034,61
LAPDQGTLPNQOQSNQVFPSSLIPLTQ	3033,58
IFTSLIHSFPFGGILPTSQAGANPDVQ	3007,56
THPLTLGGLNVQQQLHPHVLPIFVTQ	2886,58
VLPFVTQLGAQGTLSSEELPQIFT	2800,52
GPDLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLN	2790,35
HLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQQ	2765,43
FPGGILPTSQAGANPDVQDGSLPAGGAGVN	2765,43
LLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQQQ	2756,43
VLPFVTQLGAQGTLSSEELPQIF	2699,48
HLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQ	2637,37
TSLIHSLFPGGILPTSQAGANPDVQ	2632,38
PTSQAGANPDVQDGSLPAGGAGVNPATQG	2631,34
QLGAQGTLSSEELPQIFTSLIH	2594,39
LGPDLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTL	2564,34
THPLTLGGLNVQQQLHPHVLPIF	2558,41
LGAQGTLSSEELPQIFTSLIH	2466,34
LGAQGTLSSEELPQIFTSLIH	2466,33
TLGPDLLHLLNPAAGMTPGTQTHPL	2451,26
VLPFVTQLGAQGTLSSEELPQ	2439,32
LPIFVTQLGAQGTLSSEELPQ	2340,26
IIHSLFPGGILPTSQAGANPDVQ	2331,22
HLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGL	2296,20
PLQTSGSMPLQKPALGLPPTK	2273,28
MLTLGPDLLHLLNPAAGMTPGTQ	2247,14
GPDLHLLNPAAGMTPGTQTHPL	2237,13
PLQTSGSMPLQKPALGLPPT	2145,19
HLLNPAAGMTPGTQTHPLTL	2069,07
TQLGAQGTLSSEELPQIF	2031,05
TSLIHSLFPGGILPTSQAG	2008,10
SLFPGGILPTSQAGANPDVQ	1967,99
LLNPAAGMTPGTQTHPLTL	1932,01
LFPGGILPTSQAGANPDVQ	1880,96
LTQMLTLGPDLLHLLNPA	1845,99
SNQVFPSSLIPLTQML	1773,93
GSMPLQKPALGLPPTK	1747,00
PLQTSGSMPLQKPAL	1679,93
VLPFVTQLGAQGTIL	1668,98
HSLFPGGILPTSQAGAN	1665,85
QQLHPHVLPIFVTQ	1655,91
QSNQVFPSSLIPLT	1642,89
SNQVFPSSLIPLT	1514,83
IIHSLFPGGILPTS	1450,82
LVGGTAPGSGHTI	1262,67
IFTSLIHS	1029,59
SLIPLTQML	1014,58
IFTSLIHS	942,55

Supplementary Table IV.1 : Top down Mass Spectrometry of the AMTN fragments created by *P. gingivalis* after 2 h of incubation

Fragments	Observed Mass (kDa)
MLTLGPDHLHLLNPAAGMTPGTQTHPLTLGGLNVQQQLHPHVLPIFVTQLGAQGTLSSEELPQIFTSLLIHSFLFPGGILPTSQAGANPDVQDGLSPAGGAGVNPATQGGTPAGR	11446,98
EQPQQVTPRSPQQTRQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	8214,12
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQ	6327,05
ALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	5931,98
DQFAGLLPNQIPLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	5747,87
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMS	5296,56
GLLPNQIPLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	5286,67
LLPNQIPLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	5229,65
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVM	5209,53
PQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQKEAIFRH	5192,50
YAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQ	5036,47
AQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	5001,50
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIA	4979,43
QYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVM	4953,41
LMSASNSNELLNLLNNGQLLPLQLQGPLNSWIPPFSGILQQQQQ	4857,51
FGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	4802,41
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPE	4795,30
PFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEI	4778,28
PLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFKMP	4775,36
HDSAGVFMPTSPKPTTNVFTSAVDQITPELPEEKDKTDSLRL	4761,29
FGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQ	4674,32
IPLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	4664,33
GYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	4655,34
SASNSNELLNLLNNGQLLPLQLQGPLNSWIPPFSGILQQQQQ	4613,38
LMSASNSNELLNLLNNGQLLPLQLQGPLNSWIPPFSGILQQQQ	4601,39
YIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	4598,33
QYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPE	4539,19
SASNSNELLNLLNNGQLLPLQLQGPLNSWIPPFSGILQQQQQ	4485,32
YISQKVSADSKTQQAERALGSAADAQRAKNGAGEALEISSE	4419,21
PLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSF	4419,21
QIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVM	4404,22
QQQQAQIPGLSQFSLSALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQGAQ	4397,23
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLG	4397,12
PGLSQFSLSALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQGAQAGQVDPLQ	4380,19
LMSASNSNELLNLLNNGQLLPLQLQGPLNSWIPPFSGILQ	4345,27
TGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	4344,12
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQ	4227,02
TGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSF	4213,02
EASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	4183,04
QQQQAQIPGLSQFSLSALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQ	4141,11
ALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQ	4125,06
LGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQKEAIFRHDSAGVFMPT	4106,06
AKFLGNQVSYGQSLSFYRVDGRGRHPSAHDVILEG	4106,06
LAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	4097,06
TGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFS	4065,95
QAQIPGLSQFSLSALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQGAQ	4013,05
AEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	3983,98
TGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVVF	3978,92
LAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQ	3968,97
DPVAGDIKGCDCNLEGLPEICDAHGRCLCRPGVEGPR	3960,89
HDSAGVFMPTSPKPTTNVFTSAVDQITPELPEEK	3944,90
PLQLQGPLNSWIPPFSGILQQQQQAQIPGLSQFSLS	3943,08
SNSNELLNLLNNGQLLPLQLQGPLNSWIPPFSGILQ	3941,08
YAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVM	3918,95
EPAISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	3912,94
FAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	3895,93
QQAQIPGLSQFSLSALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQ	3884,99
TGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYV	3831,85
QAQIPGLSQFSLSALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQ	3756,93
AQFGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVM	3755,88
AQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	3748,86
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQQLA	3739,81
TGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPY	3732,78
SASNSNELLNLLNNGQLLPLQLQGPLNSWIPPF	3689,90
ISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	3614,66
MPQEQGMFQYYPVYMLPWEQPPQQTVP	3598,67
FGYIPQLAEPASISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVM	3556,79
GAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	3549,77
QQQYEEQIPFYAQFGYIPQLAEPASISGGQQ	3427,63
QAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	3421,71
GAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSF	3421,67
GGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPLYLQK	3415,69
PGLSQFSLSALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQ	3371,74

KSFGLPGDMVLEKKPDVLTGQHMSIYE	3371,74
QEQGMFYYPVYMLPWEQPQTVPR	3370,58
GQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPYLQK	3358,67
QQQQAQIPGLSQFSLSDQFAGLLPNQIPL	3349,76
LNNQQLPLQLQGPLNSWPPFSGILQQQQ	3341,77
TGEASFAQGAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGSHV	3341,59
PSTTNVFTSAVDQTITPELPEEKDKTDSLRL	3319,63
PFYAQFGYIPQLAEPASGGQQQLAFDPQL	3293,68
QGPLNSWPPFSGILQQQQQAQIPGLSQFS	3293,68
AGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	3293,65
GAQAGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFS	3274,60
AGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSF	3165,56
TTNVFTSAVDQTITPELPEEKDKTDSLRL	3135,54
QQAQIPGLSQFSLSDQFAGLLPNQIPL	3093,65
QLAFDPQLGTAPEIAVMSTGEEIPYLQK	3045,54
GSSHHHHHNYFYGGGTMAPLIPQR	2988,39
GQMFYYPVYMLPWEQPQTVPR	2985,42
PLQLQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	2823,44
AGQVDPLQLQTPPQTQPGPSHVMPYV	2785,39
PAISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVMSTG	2782,43
PSTTNVFTSAVDQTITPELPEEKDK	2746,35
EPAISGGQQQLAFDPQLGTAPEIAVM	2669,29
QEQGMFYYPVYMLPWEQ	2562,34
PSTTNVFTSAVDQTITPELPEEK	2504,23
SALDQFAGLLPNQIPLTGEASFAQ	2487,26
LQTPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	2485,24
LMSASNSNELLNLLNNGQLLPL	2368,23
TTNVFTSAVDQTITPELPEEK	2319,15
TPPQTQPGPSHVMPYVFSFK	2244,10
LQTPPQTQPGPSHVMPYVFS	2210,08
PGLSQFSLSDQFAGLLPNQ	2204,20
QYEEQIPFYAQFGYIPQ	2119,99
TGEASFAQGAQAGQVDPLQL	1986,96
MPQEQQGMFYYPVY	1907,82
FGYIPQLAEPASGGQQQ	1902,95
GILQQQQQAQIPGLSQF	1882,99
TPPQTQPGPSHVMPYVF	1881,91
QQQYEEQIPFYAQFG	1874,85
YMLPWEQPQTVPR	1871,92
EEQIPFYAQFGYIPQ	1828,87
LNNQQLPLQLQGPLN	1731,95
MVLPWEQPQTVPR	1708,86
TQPGPSHVMPYVFS	1545,73
QQQYEEQIPFYA	1542,70
LDQFAGLLPNQIPL	1537,85
QQQYEEQIPFY	1471,66
EEQIPFYAQF	1270,59
MVLPWEQPQQ	1254,60
WPPFSGILQ	1156,63
FSLSDQFAG	1154,56

Supplementary Table IV.2 : Top down Mass Spectrometry of the ODAM fragments created by *P. gingivalis* after 2 h of incubation

Proteases	Family	Cleavage sites		
		AMTN	ODAM	SCPPPQ1
α -chymotrypsin	Serine proteases	34	56	7
Trypsin	Serine proteases	5	10	2
Elastase	Serine proteases	23	29	9
Subtilisin	non-specific proteases	34	23	6
Endoproteinase Glu-C	Serine proteases	9	11	3
Proteinase K	Serine proteases	99	129	51
Clostripain	Cysteine proteases	4	5	1
Pepsin	Aspartic proteases	47	80	28

Supplementary Table IV.3 : *In silico* analysis of the cleavage of sBL proteins

Chapitre V –Brevet provisoire

V.1 – Description du brevet et contribution des auteurs

Au cours des études qui ont mené à l'écriture du troisième manuscrit, nous avons observé que SCPPPQ1 était la seule protéine à être résistante suite à son incubation avec des bactéries associées à la MP (**Fig. V.1 et V.2**). Cette résistance se fait également avec plusieurs familles d'enzymes (**Fig. IV.4**). Afin de voir l'effet de cette résistance sur les bactéries, nous avons visualisé celles-ci en MEB. Pour la même quantité de bactéries incubées au départ, nous pouvons voir que les bactéries incubées avec SCPPPQ1 sont 75% moins nombreuses en comparaison des bactéries incubées avec le milieu de stockage de la protéine ou avec les protéines sœurs (**Fig. V.3**). Aussi, nous pouvons observer que seulement après cette incubation, les bactéries forment d'important réseaux de polysaccharides qui sont une réponse au stress dû à un environnement agressif [131] (**Fig. V.4**). De même un grand nombre de vésicules membranaires externes (OMVs en anglais) pululent sur la bactérie ce qui est également reconnu comme un mécanisme de défense face à un milieu externe agressif [132] (**Fig. V.5**). D'autres données que nous avons collectées au cours des années favorisent l'effet anti-bactérien de SCPPPQ1, comme le fait que la protéine nécessite une production bactérienne de 18h alors que ses protéines sœurs nécessitent une pousse de 6 h. Des plages montrant une variation sur la pousse des bactéries sont également visibles sur des plaques LB-agar incubées avec SCPPPQ1 (**Fig. V.6**). Ces découvertes ont alors mené à l'écriture d'un brevet provisoire afin de protéger le possible effet antibactérien de la protéine. Nous recherchons actuellement un potentiel site fonctionnel dans ce rôle d'inhibition de la division bactérienne.

Pour ce brevet provisoire, Dr Nanci et moi-même avons défini les expériences que j'ai menées par la suite. Dr Nanci m'a également impliqué dans l'ensemble du processus pour le dépôt du brevet provisoire. L'équipe Benoît&Côté a écrit le brevet provisoire que nous avons par la suite révisé et approuvé avant sa soumission. J'ai fourni l'ensemble des figures nécessaires à cette demande.

V.2 – Brevet provisoire

Title: ANTIMICROBIAL PROTEIN, ITS DERIVED PEPTIDES AND MIMICKING COMPOUNDS, METHODS AND USES THEREOF

V.2.1 - BACKGROUND

(a) Field

[0001] The subject matter disclosed generally relates to an antimicrobial protein, its derived peptides and mimicking compounds, pharmaceutical compositions, methods and uses thereof for treatment or prevention of infectious diseases.

(b) Related Prior Art

[0002] Antibiotics are commonly used in the treatment and/or prevention of infectious diseases caused by various microorganisms such as bacteria. Most antibiotics are compounds derived from plants or fungus, which are produce as a defense mechanism against bacterial infection. However, resistance of bacteria against these antibiotics often occurs. In fact, conventional antibiotics kill bacteria by binding to specific targets that are involved in bacterial DNA and protein synthesis. Therefore, resistance can occur when bacteria modify these targets, such that antibiotics do not bind to these proteins, or when bacteria produce specific enzymes that inactivate the antibiotics.

[0003] Pathogenic bacteria are usually found on or surrounding the surfaces of epithelial cells forming an epithelial barrier. If the epithelial barrier is compromised, the cells can penetrate into deeper tissue layers where they can expand and trigger infectious diseases. For instance, periodontal diseases (PD) affect a large segment of the population and their severity increases with age. Mild to moderate forms affect over 80% of adults, while up to 15% suffer from severe periodontitis. PD eventually lead to tooth and bone loss. Moreover, there is growing evidence that PD are linked to cardiovascular and respiratory diseases, as well as diabetes, thus causing serious health concerns that goes beyond the mouth.

[0004] In the tooth, a specialized BL (sBL) binds epithelial cells to mineralized surfaces rather than connective tissue, thereby creating secluded environments that are critical for mineralization and for protection of the tooth supporting tissues from the aggressive oral environment. The junctional epithelium (JE) is a specialized portion of the gingiva that seals off the tooth supporting tissues from the oral environment. The JE uniquely attaches to the tooth via sBL, where are localized three secreted proteins namely amelotin (AMTN), odontogenic ameloblast-associated (ODAM) and secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1 (SCPPPQ1) that are expressed by the JE. These proteins are believed to participate with Laminin-332 (Lm332), that is also expressed by the JE, in structuring the supramolecular organization of the sBL and, hence, represent solid candidates in maintaining the integrity and function of the JE. However, their susceptibility to bacteria and/or bacterial products (e.g. enzymes) remains unknown, which constitutes an important aspect for maintaining the gingival seal and health.

[0005] The human subgingival plaque harbors more than 700 bacterial species. Some of them lead to PD when the equilibrium of the oral microbiome is compromised. Among these bacterial species, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and *Treponema denticola* (*T. denticola*) are strongly linked to PD, which secrete a variety of enzymes that are generally associated with destruction of subepithelial connective tissue. There is actually no cure and no reliable manner of controlling bacteria during PD.

[0006] Therefore, there is an urgent need for novel preventive and therapeutic treatments of infectious diseases including PD, without triggering bacterial resistance or causing undesirable side effects.

V.2.2 - SUMMARY

[0007] According to an embodiment, there is provided a recombinant or modified isolated protein comprising an amino acid sequence chosen from:

MKFLILAGLLSTATALPIPLEQYAESSSEQRIFIFYPPQVPPFFP
QVLFPLPPQPPLISIPFFFPYNPNQVLTPNDLIALLIAILNQLGN
FSGT (SEQ ID No.:1), and

a functional variant thereof, in which the recombinant or modified isolated protein being resistant to microbial degradation and having antimicrobial activity.

[0008] According to another embodiment, there is provided a peptide comprising an amino acid sequence chosen from:

LILAGLLSTATALPIPLEQYAESSSEQ (SEQ ID No.:2),
YPPQVPPFFPQVLFPLPPQPPLISIPFFFP (SEQ ID No.:3),
NPNQVLTPNDLIALLIAILNQLGNFSGT (SEQ ID No.:4),
RFIFYPPQVPPFFP (SEQ ID No.:5),
FPLPPQPP (SEQ ID No.:6),
PFFFPYNP (SEQ ID No.:7), and

a functional variant thereof, in which the peptide being resistant to microbial degradation and having antimicrobial activity.

[0009] According to another embodiment, there is provided a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence encoding the recombinant protein, comprising a nucleotide sequence chosen from:

ATGAAATTTCT CATCTTGGCT GGCCTTTTGA GCACTGCCAC TGCTCTGCCC
ATCCCCTCG AACAAATATGC TGAAAGTTCC AGTGAACAGA GATTTATCTT
TTACCCACCA CAAGTACCAC CATTTTCC TCAGATTTCT ATTCCTTTTC
CTTTTCCTTA CAATCCAAAT CAGGTCCTCA CACCTAATGA TCTTATCGCG

TACTCATTG CTATTTTGAA CCAACTAGGG AACTTCTCTG GGACATAA (SEQ ID No.:8), and

a variant thereof being at least 90% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID No.:8.

[0010] According to another embodiment, there is provided a vector comprising the nucleic acid molecule.

[0011] According to another embodiment, there is provided a recombinant host cell comprising the vector.

[0012] According to another embodiment, there is provided a transfecting carrier comprising the vector.

[0013] According to another embodiment, there is provided a pharmaceutical composition comprising the recombinant or modified isolated protein and/or the peptide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or excipient.

[0014] According to another embodiment, there is provided a coating for a medical device comprising the pharmaceutical composition.

[0015] According to another embodiment, there is provided a method of treating or preventing an infectious disease comprising a microbial, bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal and/or a condition resulting from bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of the recombinant or modified isolated protein and/or the peptide and/or the pharmaceutical composition.

[0016] According to another embodiment, there is provided a method of treating or preventing an infectious disease comprising a microbial, bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal and/or a condition resulting from bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal, comprising transfecting to a target cell in the mammal a therapeutically effective amount of the vector and/or the transfecting carrier.

[0017] According to another embodiment, there is provided a method for the preparation of the recombinant protein, comprising:

providing a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding the recombinant protein in a vector;

transforming a host cell with the vector comprising the nucleic acid molecule;

culturing the host cell under conditions allowing expression of the recombinant protein; and harvesting the recombinant protein from the host cells.

[0018] According to another embodiment, there is provided a use of the recombinant or modified isolated protein and/or the peptide and/or the pharmaceutical composition, comprising treatment and prevention of infectious diseases, treatment and prevention of post-operation bacterial infections and systemic propagations, surface sterilization in industry and hospital applications, antibacterial solutions, antibacterial surface coating in industry and hospital applications, or personal care products.

[0019] The recombinant protein and/or the peptide and/or the pharmaceutical composition may be in association with other antibiotics.

[0020] According to another embodiment, there is provided a use of the nucleic acid molecule and/or the vector and/or the recombinant host cell and/or the transfecting carrier, comprising treatment and prevention of infectious diseases, or treatment and prevention of post-operation bacterial infections and systemic propagations.

[0021] The nucleic acid molecule and/or the vector and/or the recombinant host cell and/or the transfecting carrier may be in association with other antibiotics.

[0022] According to another embodiment, there is provided a use of a modulator for targeting a signaling pathway that involves directly or indirectly the recombinant or modified isolated protein and/or the peptide.

[0023] The modulator may be an agonist or an antagonist.

[0024] The following terms are defined below.

[0025] As used herein, the terms “comprises,” “comprising,” “includes,” “including,” “has,” “having” or any other variation thereof, are intended to cover a non-exclusive inclusion. For example, a process, method, article, or apparatus that comprises a list of elements is not necessarily limited to only those elements but may include other elements not expressly listed or inherent to such process, method, article, or apparatus. Further, unless expressly stated to the contrary, “or” refers to an inclusive or and not to an exclusive or.

[0026] Also, use of the “a” or “an” are employed to describe elements and components of the invention. This is done merely for convenience and to give a general sense of the invention. This description should be read to include one or at least one and the singular also includes the plural unless it is obvious that it is meant otherwise.

[0027] Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. However, the following definitions refer to the particular embodiments described herein and are not to be taken as limiting; the invention includes equivalents for other undescribed embodiments. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

[0028] The term “antibiotic” is intended to mean an adverse effect on the normal biological function of bacteria, whereby this means death or destruction, as well as inhibition of growth or proliferation of the bacteria, along with impairment of metabolic functions.

[0029] The term “wound” is intended to mean any damage or loss to any type of tissue of a subject caused by, for examples, cuts, incisions (including surgical incisions), ulcerations, abrasions, microbial infections, diseases or disorders, necrotic lesions, lacerations, fractures, contusions, burns and amputations.

[0030] The term “healing wounds” is intended to mean a process to repair wounds. This process is compromised by bacterial infections. In this case, a bandage can be enriched with an antimicrobial protein, its derived peptides, mimicking compounds, or pharmaceutical compositions comprising thereof and applied to healing wounds to prevent local infections and the spread of bacteria, and to accelerate and promote healing.

[0031] The term “microorganisms” is intended to mean the prokaryotes with eubacteria and archaeobacteria, fungi (mycota with myxo mycetes, phycomycetes and eumycetes), plant and animal protozoan organisms and viruses.

[0032] The term “protein” is intended to mean all lengths of amino acid sequences, thus also peptides. In this case, proteins can also consist of various chains, which are connected, for example, by covalent bonds, ionic bonds or van der Waals forces.

[0033] The term “microbe” is intended to mean a bacterium, fungus, or virus.

[0034] The term “antimicrobial” is intended to mean bactericidal, fungicidal, and antiviral.

[0035] The term “antimicrobial agent” is intended to mean a protein, peptide, compound or pharmaceutical composition thereof having a bactericidal, fungicidal, and/or antiviral activity.

[0036] The term “antibacterial agent” is intended to mean a protein, peptide, compound or pharmaceutical composition thereof that reduces the bacterial concentration by killing bacteria and/or inhibiting the growth of bacteria.

[0037] The term “bactericidal agent” is intended to mean a protein, peptide, compound or pharmaceutical composition thereof that kills bacteria.

[0038] The term “bacteriostatic agent” is intended to mean a protein, peptide, compound or pharmaceutical composition thereof that inhibits and/or prevents the growth of bacteria.

[0039] The term “infectious disease” is intended to mean any disease caused by an infection.

[0040] The term “bacterial infection” is intended to mean any infection caused by bacteria.

[0041] The term “treating or preventing bacterial infection” is intended to mean ameliorate or alleviate the symptoms of the disease caused by the bacterial infection. The treatment is considered therapeutic if it results in at least one of the following: reducing the bacterial concentration by killing bacteria causing the infection; preventing growth of bacteria causing the infection; decreasing in mortality and/or morbidity due to the disease caused by the bacterial infection.

[0042] The term “therapeutically effective amount” is intended to mean an amount of a therapeutic agent necessary to achieve a desired physiological effect, including, for example, healing injuries.

[0043] The term “therapeutic agent” is intended to mean an active ingredient that exerts or is capable of exerting a pharmaceutical effect in a subject.

[0044] The term "subject" is intended to mean humans and non-human mammals including, for examples, primates, cats, dogs, swine, cattle, sheep, goats, horses, rabbits, rats, mice and the like.

[0045] The term “composition” is intended to mean a product comprising the specified ingredients in the specified amounts, as well as any product which results, directly or indirectly, from combination of the specified ingredients in the specified amounts. Such term in relation to pharmaceutical composition or other compositions in general, is intended to encompass a product comprising the active ingredient(s) and the inert ingredient(s) that make up the carrier, as well as any product which results, directly or indirectly, from combination, complexation or aggregation of any two or more of the ingredients, or from dissociation of one or more of the ingredients, or from other types of reactions or interactions of one or more of the ingredients. Accordingly, the pharmaceutical compositions or other compositions in general of the present invention encompass any composition made by admixing a protein, peptide or compound of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0046] The term "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to mean that the carrier, diluent or excipient must be compatible with the other ingredients of the composition and not deleterious to the recipient thereof.

[0047] The term "transfection" is intended to mean an introduction of a nucleic acid molecule into a target cell. For instance, transfection methods can be applied in the areas of medicine, agriculture, pharmaceuticals, and biomedical research. In the context of the present invention, transfection comprises gene therapy, wherein a foreign gene can be stably incorporated into a subject's genome thereby conferring upon the transfected cell, the ability to produce the product of the transfected gene.

[0048] Features and advantages of the subject matter hereof will become more apparent in light of the following detailed description of selected embodiments, as illustrated in the accompanying figures. As will be realized, the subject matter disclosed and claimed is capable of modifications in various respects, all without departing from the scope of the claims. Accordingly, the drawings and the description are to be regarded as illustrative in nature, and not as restrictive and the full scope of the subject matter is set forth in the claims.

V.2.3 - BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0049] Further features and advantages of the present disclosure will become apparent from the following detailed description, taken in combination with the appended drawings, in which:

[0050] **Figs V.1A-B** illustrate representative pictures of western blot analysis following *in vitro* digestion assay of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 by (A) *A. actinomycetemcomitans* or *F. nucleatum* showing no degradation of the proteins, while digestion assay by (B) more aggressive bacteria as *T. denticola*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* degrade AMTN and ODAM but not SCPPPQ1, according to an embodiment.

[0051] **Figs. V.2A-C** illustrate graphs showing the results of top-down mass spectrometry of (A) AMTN, (B) ODAM and (C) SCPPPQ1 proteins before (Blue) and after (orange) incubation with *P. gingivalis*, confirming the degradation of AMTN and ODAM and

the non-degradation of SCPPPQ1 as previously observed by western blot analysis. The right panels highlight the cleavage sites (red arrows) for the proteins, according to an embodiment.

[0052] Figs. V.3A-D illustrate representative pictures of scanning electron microscopy (SEM) of *P. gingivalis* after incubation (A) without protein, (B) with ODAM protein and (C) with SCPPPQ1 protein. (D) graph showing that the incubation with SCPPPQ1 protein decreases the quantity of the bacteria per μm^2 comparing to the incubation with ODAM protein and the control, according to an embodiment.

[0053] Figs. V.4A-B illustrate representative pictures of scanning electron microscopy (SEM) of *P. gingivalis* after incubation with SCPPPQ1 protein showing an increase of the number of polysaccharide films that can result in a response from stress, according to an embodiment.

[0054] Figs. V.5A-C illustrate representative scanning electron microscope (SEM) images of *P. gingivalis* after incubation (A) without protein (i.e. control), (B) with ODAM protein and (C) with SCPPPQ1 protein, showing a larger number of outer membrane vesicles (OMVs) only in presence of SCPPPQ1, according to an embodiment.

[0055] Fig. V.6 illustrates representative pictures of a lysis test on agar plates to assess the antibacterial activity of various concentrations of (A) AMTN protein and (B) SCPPPQ1 protein, according to an embodiment.

V.3.4 - DETAILED DESCRIPTION

[0056] In embodiments there are disclosed an antimicrobial protein, its derived peptides and mimicking compounds, pharmaceutical compositions, methods and uses thereof for treatment or prevention of infectious diseases.

[0057] Referring to Fig. V.1A-B, *in vitro* susceptibility of sBL proteins to oral bacteria has been evaluated. Recombinant sBL proteins were incubated during two hours with various oral bacteria and western immunoblotting analysis revealed no degradation in the presence of *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* (Fig. V.1A). In contrast, incubation with *P.*

gingivalis, *T. denticola*, and *P. intermedia* resulted in complete degradation of AMTN, ODAM but not of SCPPPQ1 proteins (**Fig. V.1B**).

[0058] Now referring to **Figs. V.2A-C**, to confirm the degradation of AMTN, ODAM but not of SCPPPQ1 proteins and to determine their respective cleavage sites, mass spectrometry was performed using the top-down assay after incubation of the sBL proteins with *P. gingivalis*. The bacteria extensively cleaved AMTN into multiple fragments of 1 to 14 kDa (**Fig. V.2A**) and ODAM of 1 to 9 kDa (**Fig. V.2B**). The predominant fragments were from 2 to 5 kDa for both proteins. SCPPPQ1 protein was not degraded after incubation with *P. gingivalis* (**Fig. V.2C**), confirming the previously presented SDS-PAGE and western blot analysis observations. Under control condition, at time 0 and when no bacteria were added to the samples for two hours, no degradation was observed.

[0059] Now referring to **Figs. V.3A-D**, the number of bacteria (i.e. *P. gingivalis*) has been observed by scanning electron microscopy (SEM) after the incubation. A sample was taken at 0 min and 120 min from bacterial suspensions and then deposited on a disk for visualization by SEM. The pictures have been analyzed by ImageJ. The results demonstrate that the control bacteria (**Fig. V.3A**) (i.e. bacteria incubated without proteins but with the buffer) or those incubated with ODAM (**Fig. V.3B**) are of the same number while there is a significant reduction of about 75% of the bacteria number after incubation with SCPPPQ1 (**Figs. V.3C-D**). In fact, the bacteria are in very low numbers, separated and they are not showing any sign of bacterial division. Similar results have been observed with *P. intermedia* and *T. denticola*.

[0060] Now referring to **Figs V.4 and V.5**, observations having regard to the appearance of bacteria (i.e *P. gingivalis*) has been performed by scanning electron microscopy (SEM) after the incubation. A sample was taken at 0 min and 120 min from bacterial suspensions and then deposited on a disk for visualization by SEM. The pictures have been analyzed by ImageJ. In **Figs. V.4A-B**, the results demonstrate that bacteria exposed to SCPPPQ1 have developed several polysaccharide films, which is a stress response in order to protect themselves from an aggressive environment. Moreover, as shown in **Fig. V.5**, the incubation of *P. gingivalis* with SCPPPQ1 protein resulted in a larger number of outer membrane vesicles (OMVs). In fact,

OMVs are produced in large quantities when the bacterium responds to an external attack, indicating that the bacterium is susceptible to the antibacterial effect of the SCPPPQ1 protein.

[0061] Now referring to **Fig. V.6**, a lysis test on agar plates was also performed in order to assess the antibacterial activity of SCPPPQ1. An agar plate coated with *E. coli* bacteria was incubated overnight at 37°C with small drops of SCPPPQ1 solution at different concentrations (1, 10, 100 µg). Lysis ranges have been observed where SCPPPQ1 protein (**Fig. V.6B**) is present, but not in control (i.e. without proteins) or with AMTN protein (**Fig. V.6A**).

[0062] SCPPPQ1 has demonstrated resistance to bacterial degradation and bactericidal/bacteriostatic effects, which are unsuspected properties. SCPPPQ1 protein is the only one among the sBL proteins to be resistant to bacteria and/or bacterial products (e.g. enzymes). More precisely, although SCPPPQ1 protein belongs to the same extracellular matrix (sBL) and protein family as ODAM and AMTN, its resistance to bacterial degradation and antibacterial properties would be totally unexpected by one skilled in the art. In addition, in the presence of SCPPPQ1 protein, bacteria do not associate with one another anymore and do not seem to divide, like this is the case with controls.

[0063] Moreover, bacterial growth and activity of host cells (i.e. *E. coli*) is considerably reduced when exposed to SCPPPQ1 protein, resulting in a significantly slowed production of this protein. In fact, SCPPPQ1 protein takes much longer to be produced (i.e. overnight) than AMTN and ODAM proteins (i.e. 6 hours) for a similar or lower amount. These findings highlight that SCPPPQ1 protein affects the number and/or the activity of bacteria.

[0064] It should also be noted that SCPPPQ1 is a small protein having about 41.7% cyclic groups in its structure and the majority of these groups are mainly clustered in the central portion of the protein. Many bactericidal compounds are made from highly cyclic molecules. One skilled in the art would understand that this portion of the SCPPPQ1 protein could therefore be considered as the active part of the protein for its antibacterial effect on bacteria.

[0065] Most of the compounds found in the medical market concern chemical molecules, which can lead to bacterial resistance. Considering the importance of finding novel antibacterial agents that can fight against this phenomenon, such a protein is of important

interest for treating and preventing infectious diseases. Recombinant forms of SCPPPQ1 proteins derived from the mammals including, for example, human recombinant SCPPPQ1 proteins, are stable enough to trigger limited side effects in a subject.

[0066] Recombinant proteins can be produced in prokaryotes (e.g. bacteria) or eukaryotes (e.g. mammalian cells). For instance, *E. coli* is one of the organisms of choice for the production of recombinant proteins. Its use as a cell factory is well-established and it has become the most popular expression platform. One skilled in the art would understand that there are various molecular tools and protocols for the high-level production of heterologous proteins, such as a vast catalog of expression plasmids, a great number of engineered strains and many cultivation strategies. On the other hand, production of recombinant proteins in mammalian host cells provides post-translational modifications that could improve their functions.

[0067] Moreover, the nucleotide sequence for producing recombinant forms of SCPPPQ1 protein or its derived peptides can originate from human or other mammals including, for example, rat and pig. One skilled in the art would understand that human recombinant proteins would be preferable for applications in humans. However, nucleotide sequences derived from other mammals could also be used for production of recombinant SCPPPQ1 protein for human applications, especially its derived peptides. Thus, this protein and its derived peptides could also be useful for veterinary treatments such as, for example, in dog, cattle and pig.

[0068] Among the various potential applications of the present invention, recombinant forms of SCPPPQ1 protein or its derived peptides can be combined with conventional antibiotics in order to provide synergistic effects in terms of antibacterial activity. Therefore, there is some non-limiting examples listed below:

- Treatment and prevention of infectious diseases (e.g. bacterial infections in the eyes, mouth and wounds),
- Treatment and prevention of post-operation bacterial infections and systemic propagations (e.g. implant),

- Surface sterilization in industry (e.g. food industry) and hospital applications (e.g. surgical tools and areas),
- Antibacterial solutions that don't have the side effects of the triclosan used (e.g. hand gels and cleaning surfaces solution),
- Antibacterial surface coating in industry (e.g. food industry) and hospital applications (e.g. surgical tools and areas), and
- Health products (e.g. antibacterial toothpaste, creams and drops).

[0069] The present invention will be more readily understood by referring to the following examples which are given to illustrate the invention rather than to limit its scope.

V.3.5 - EXAMPLE 1

Production and characterization of the recombinant sBL proteins

Cloning procedures

[0070] Truncated versions of *odam*, *amtn*, and *scpppq1* genes lacking regions encoding the predicted N-terminal signal sequence were PCR-amplified from human cDNA sequences using primers as previously described in A. Fouillen, et al. *Interactions of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins of a specialized basal lamina that attaches epithelial cells to tooth mineral*, Sci. Rep. 7 (2017) 46683. PCR products were cloned into the vector pHT for purification studies. The recombinant pHT plasmids allow to produce recombinant proteins with an in-frame N-terminal hexahistidyl-tag (His-tag) and TEV protease cleavage site. *Escherichia coli* strains XL-1 Blue were used as hosts for cloning.

Protein overexpression and purification

[0071] BL21(DE3)-star cells containing either pHT-hAmtn or pHT-hOdam were grown at 37°C and 250 rpm to an Optical density at 660 nm (OD₆₀₀) around 0.6, and protein expression was induced with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) for 5 h at 30°C and 250 rpm. Bacterial cells were harvested, suspended in Equilibration buffer (50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 7) at 4°C, and sonicated six times 15 seconds between 15 seconds ice incubations. Lysates were centrifuged at 13,400 g and the 6His-tagged protein in the supernatant was bound on nickel-nitriloacetic acid (Ni-NTA)-agarose affinity resin (QIAGEN) at room temperature. After washing the resin with 10 volumes of Binding buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 7), proteins were eluted with Elution buffer (50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazole, pH 7). Collected fractions were assessed for protein content using the Bradford assay and analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Chosen fractions were then dialyzed into TEV buffer (25 mM Na₂HPO₄, 125 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.4) and had their N-terminal His-tag cleaved using His-tagged TEV protease (Sigma-Aldrich) in a 1:70 ratio (TEV: Protein) overnight at room temperature. Following cleavage, the solution was applied to a Ni-NTA-agarose affinity resin and the flow through containing cleaved protein was collected. Proteins were dialyzed into 50 mM Na₂HPO₄

(pH 7.2) and stored at 4°C. Finally, proteins were purified by size exclusion chromatography using a Superose 6 GL 10/300 gel filtration column for ODAM or a S200 gel filtration column for AMTN (GE Healthcare). Columns were pre-equilibrated with 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4). Fractions were evaluated for purity by SDS-PAGE. SCPPPQ1 was expressed in pHThScpppq1 and grown overnight and purified in the same conditions than ODAM and AMTN but in denaturing conditions where buffers contained 8 M of Urea. Purified Lm332 was commercially obtained (EUV101, KeraFast, Boston, MA, USA).

Enzymology assay

[0072] 20 µg of purified proteins in their final buffer were added to 2.2 µg of 8 proteases in 10 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl, from the kits Proti-Ace and Proti-Ace 2 (Hampton Research) and incubated at 37°C for 1 hour. The resulting products were then analyzed by SDS-PAGE. 20 µg of purified proteins in 20 µl of enzymes buffer (10 mM HEPES pH 7.5 500 mM NaCl) as a control.

Bacterial culture

[0073] *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 were grown anaerobically (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) at 37°C in Todd-Hewitt broth (THB; Becton Dickinson, Canada) supplemented with 0.001% hemin and 0.0001% vitamin K. *Treponema denticola* was grown anaerobically in liquid medium containing 12.5 mg of brain heart infusion, 10 mg of Trypticase, 2.5 mg of yeast extract, 0.5 mg of sodium thioglycolate, 1 mg of L-cysteine, 0.25 mg of L-asparagine, 2 mg of glucose, 6 µg of thiamine pyrophosphate, and 2 mg of sodium bicarbonate per ml; 2% rabbit serum; and 0.2% volatile fatty acids, as described earlier. The volatile fatty acids solution consisted of 0.5 ml each of isobutyric, DL-2-methylbutyric, isovaleric, and valeric acids dissolved in 100 ml of 0.1 N KOH.

Bacterial incubation with purified proteins

[0074] Approximately 250 µg of purified proteins was exposed in a test tube, one by one, to 400 µl of a suspension of bacteria at a OD₆₆₀ of 1.0 for 2 hours at 37°C. 40 µl was sampled every 15 min for western blot analysis. Protein alone in the bacteria media was used as

a control. The same procedure was applied in presence of a cocktail of protease inhibitor (Sigma-Aldrich) The number of bacteria in the suspension at the start and end of the assay was evaluated by scanning electron microscopy (SEM).

Top-down LC-MS/MS analysis

[0075] Samples before and after incubation with *P. gingivalis* were diluted in 25% ACN 0.3%TFA and loaded onto a 50x4.6 mm PLRP-S 300A column (Agilent Technologies) connected to an Accela pump (Thermo Scientific) and a RTC autosampler (Pal systems). The buffers used for chromatography were 0.1% formic acid (buffer A) and 100% acetonitrile/0.1% formic acid (buffer B). Proteins and peptides were eluted with a two-slope gradient at a flow rate of 120 mL/min. Solvent B first increased from 20 to 40% in 70 min and then from 40 to 70% in 5 min. The HPLC system was coupled to Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Scientific) through an Electrospray Ion Source. The spray and S-lens voltages were set to 3.6 kV and 50 V, respectively. Capillary temperature was set to 225°C. Full scan MS survey spectra (m/z 500-1700) in profile mode were acquired in the Orbitrap with a resolution of 120,000 with a target value at 5e5. The 3 most intense protein/peptide ions were fragmented in the HCD collision cell and analyzed in the Orbitrap with a target value at 5e5 and a normalized collision energy at 36 V. Target ions selected for fragmentation were dynamically excluded for 25 sec.

[0076] For data processing, protein database searching was performed with ProSightPC 4.0.2.1 (Thermo Scientific) against the protein sequences of interest. The mass tolerances for precursor and fragment ions were set to 1000 Da and 20 ppm, respectively. The minimum number of matching fragment was set to 4 and the only modification used was acetylation of protein N-terminal. The number of matching fragments were quantified and classed by kDa to evaluate the effect of *P. gingivalis* incubation on each protein.

Scanning electron microscopy

[0077] Following bacterial incubations, tissues and bacterial samples were fixed for 1 hour at 4°C in 2.5% glutaraldehyde and subsequently rinsed three times with 0.1M phosphate buffer (PB), pH 7.3, and incubated for 30 min in 1% osmium tetroxide at RT. The tissues were dehydrated through an ethanol series (30%, 50%, 70%, 90%, 95% and two times 100%)

followed by drying using a Critical Point Drier CPD300 (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada). Characterization of the samples was carried out by a JEOL JSM-7400F (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) field-emission scanning electron microscope (FE-SEM) operated at 1.5 kV. A FE-SEM Regulus 8230 (Hitachi, Tokyo, Japan) operated at an imaging voltage between 0,8 and 1,5 kV was used for higher resolution images to observe the bacterial effects on the sBL.

[0078] While preferred embodiments have been described above and illustrated in the accompanying drawings, it will be evident to those skilled in the art that modifications may be made without departing from this disclosure. Such modifications are considered as possible variants comprised in the scope of the disclosure.

V.3.6 - CLAIMS

1. A recombinant or modified isolated protein comprising an amino acid sequence chosen from:
 - MKFLILAGLLSTATALPIPLEQYAESSSEQRFIFYPPQVPPFFP
QVLFPLPPQPPLISIPFFFPYNPNQVLTPNDLIALLIAILNQLGN
FSGT (SEQ ID No.:1), and
 - a functional variant thereof,wherein the recombinant or modified isolated protein being resistant to microbial degradation and having antimicrobial activity.

2. A peptide comprising an amino acid sequence chosen from:
 - LILAGLLSTATALPIPLEQYAESSSEQ (SEQ ID No.:2),
 - YPPQVPPFFPQVLFPLPPQPPLISIPFFFP (SEQ ID No.:3),
 - NPNQVLTPNDLIALLIAILNQLGNFSGT (SEQ ID No.:4),
 - RFIFYPPQVPPFFFP (SEQ ID No.:5),
 - FPLPPQPP (SEQ ID No.:6),
 - PFFFPYNP (SEQ ID No.:7), and
 - a functional variant thereof,wherein the peptide being resistant to microbial degradation and having antimicrobial activity.

3. A nucleic acid molecule having a nucleotide sequence encoding the recombinant protein according to claim 1, comprising a nucleotide sequence chosen from:
 - ATGAAATTTCT CATCTTGGCT GGCCTTTTGA GCACTGCCAC TGCTCTGCCC
ATCCCCCTCG AACAAATATGC TGAAAGTTCC AGTGAACAGA GATTTATCTT
TTACCCACCA CAAGTACCAC CATT TTTCCC TCAGATTTCT ATTCCTTTTC
CTTTTCCTTA CAATCCAAAT CAGGTCCTCA CACCTAATGA TCTTATCGCG
T TACTCATTG CTATTTTGAA CCAACTAGGG AACTTCTCTG GGACATAA (SEQ ID
No.:8), and
 - a variant thereof being at least 90% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID No.:8.

4. A vector comprising the nucleic acid molecule according to claim 3.
5. A recombinant host cell comprising the vector according to claim 4.
6. A transfecting carrier comprising the vector according to claim 4.
7. A pharmaceutical composition comprising the recombinant or modified isolated protein according to claim 1 and/or the peptide according to claim 2, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and at least one pharmaceutically acceptable carrier, diluent and/or excipient.
8. A coating for a medical device comprising the pharmaceutical composition according to claim 7.
9. A method of treating or preventing an infectious disease comprising a microbial, bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal and/or a condition resulting from bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of the recombinant or modified isolated protein according to claim 1 and/or the peptide according to claim 2 and/or the pharmaceutical composition according to claim 7.
10. A method of treating or preventing an infectious disease comprising a microbial, bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal and/or a condition resulting from bacterial, fungal, viral and/or parasitic infection in a mammal, comprising transfecting to a target cell in the mammal a therapeutically effective amount of the vector according to claim 4 and/or the transfecting carrier according to claim 6.
11. A method for the preparation of the recombinant protein according to claim 1, comprising:
 - providing a nucleic acid molecule according to claim 3 comprising a nucleotide sequence encoding the recombinant protein in a vector;
 - transforming a host cell with the vector comprising the nucleic acid molecule;

- culturing the host cell under conditions allowing expression of the recombinant protein; and
 - harvesting the recombinant protein from the host cells.
12. Use of the recombinant or modified isolated protein according to claim 1 and/or the peptide according to claim 2 and/or the pharmaceutical composition according to claim 7, comprising treatment and prevention of infectious diseases, treatment and prevention of post-operation bacterial infections and systemic propagations, surface sterilization in industry and hospital applications, antibacterial solutions, antibacterial surface coating in industry and hospital applications, or personal care products.
 13. The use of claim 12, wherein the recombinant protein according to claim 1 and/or the peptide according to claim 2 and/or the pharmaceutical composition according to claim 7 are in association with other antibiotics.
 14. Use of the nucleic acid molecule according to claim 3 and/or the vector according to claim 4 and/or the recombinant host cell according to claim 5 and/or the transfecting carrier according to claim 6, comprising treatment and prevention of infectious diseases, or treatment and prevention of post-operation bacterial infections and systemic propagations.
 15. The use of claim 14, wherein the nucleic acid molecule according to claim 3 and/or the vector according to claim 4 and/or the recombinant host cell according to claim 5 and/or the transfecting carrier according to claim 6 are in association with other antibiotics.
 16. Use of a modulator for targeting a signaling pathway that involves directly or indirectly the recombinant or modified isolated protein according to claim 1 and/or the peptide according to claim 2.
 17. The use of claim 16, wherein the modulator is an agonist or an antagonist.

V.3.7 - ABSTRACT

The present document describes an antimicrobial protein, its derived peptides and mimicking compounds, pharmaceutical compositions, methods and uses thereof for treatment or prevention of infectious diseases.

V.3.8 – FIGURES LEGENDS

Fig V.1: Western blot analysis following *in vitro* exposure of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 to bacteria. (A) There is no degradation with *F. nucleatum* (B) while *P. gingivalis* degrade AMTN and ODAM in less than 15 min, but SCPPPQ1 is not affected.

Fig V.2: Top-down Mass spectrometry of (A) AMTN, (B) ODAM and (C) SCPPPQ1 before (Blue) and after (orange) incubation with *P. gingivalis* confirms the degradation of AMTN and ODAM and the non-degradation of SCPPPQ1 observed by Western blot analysis (Fig. V.1). The right panels highlight the cleavage sites (red arrows) for the proteins.

Fig V.3: Scanning electron microscopy of bacteria after a two hours exposure to (A) buffer alone and buffer containing (B) ODAM or (C) SCPPPQ1. Evaluation of the number of bacteria per surface (D) reveals an important decrease of the bacterial population following exposure with SCPPPQ1.

Fig V.4: Scanning electron microscopy of bacteria after a two hours exposure to buffer containing SCPPPQ1. Following exposure to the protein, the bacteria form an important biofilm.

Fig V.5: Scanning electron microscopy of bacteria after a two hours exposure to (A) buffer alone and buffer containing (B) ODAM or (C) SCPPPQ1. Following exposure to the protein, numerous outer membrane vesicles appear on the bacterial surface.

Fig V.6: Lysis test on agar plates to assess the antibacterial activity. ODAM (A) has no effect on the bacterial viability comparing to SCPPPQ1 (B) that creates lysis area. Increasing concentration of SCPPPQ1 increase the size of the lysis area.

V.3.9 - FIGURES

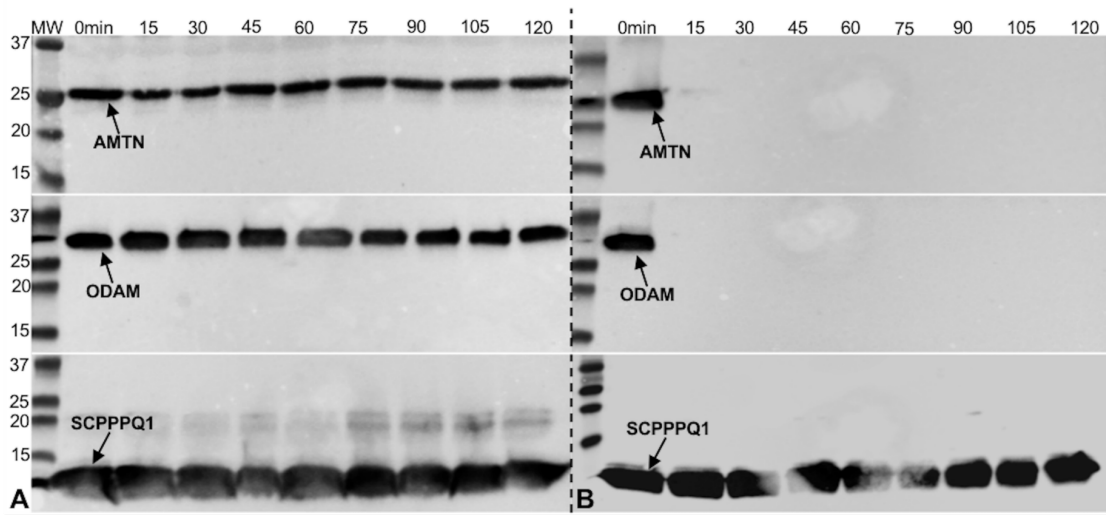


Figure V.1 : Western blot analysis following *in vitro* digestion assay of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 after incubations with different oral bacteria

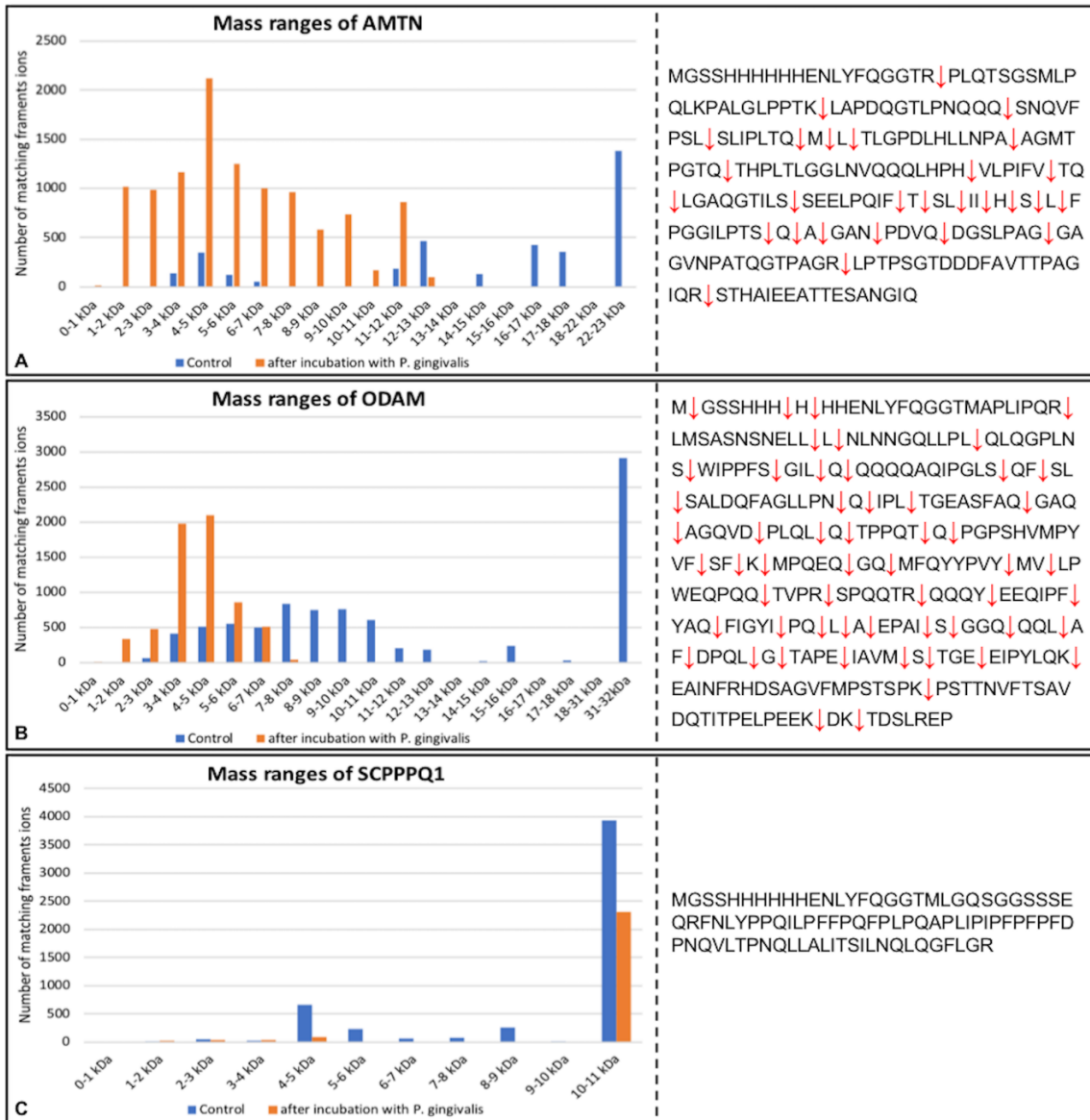


Figure V.2 : Top-down mass spectrometry of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins before and after incubation with *P. gingivalis*

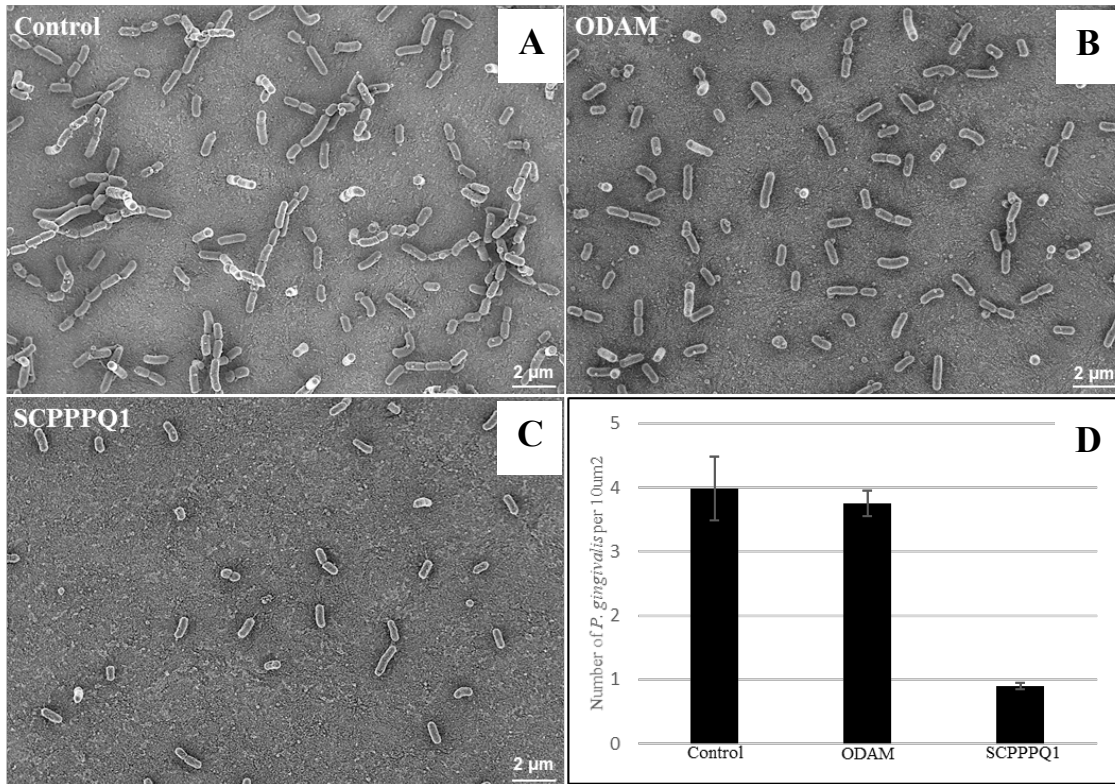


Figure V.3 : Scanning electron microscopy (SEM) of *P. gingivalis* after incubation without protein, with ODAM protein and with SCPPPQ1 protein

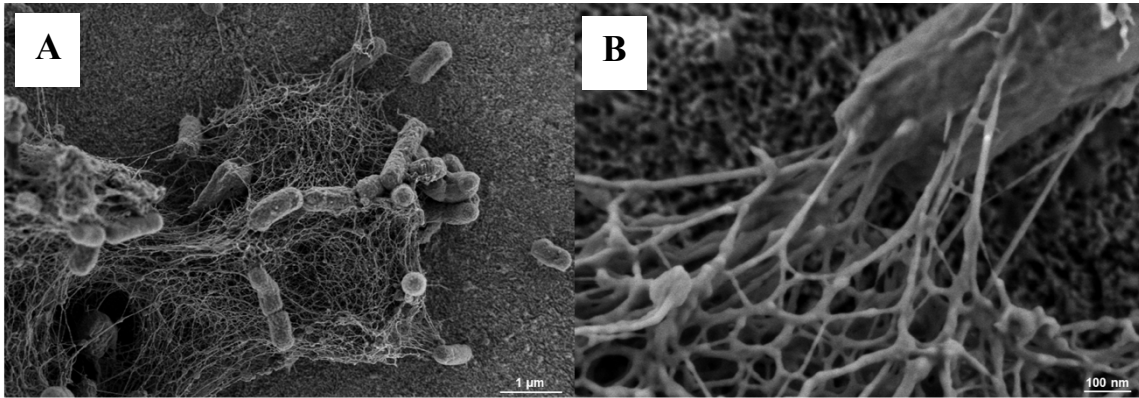


Figure V.4 : Scanning electron microscopy of *P. gingivalis* after incubation with SCPPPQ1

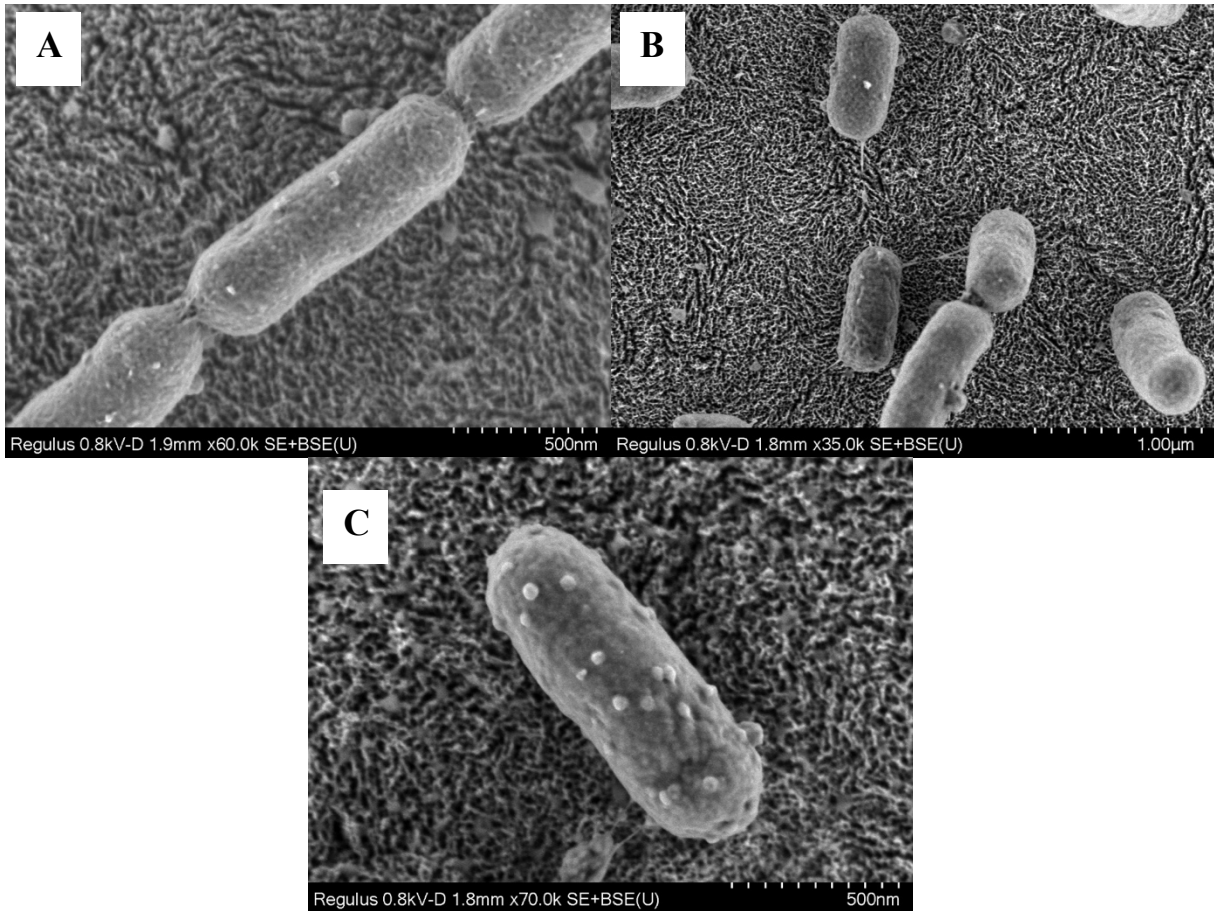


Figure V.5 : Scanning electron microscope (SEM) images of *P. gingivalis* show a large number of outer membrane vesicles (OMVs) only in presence of SCPPPQ1

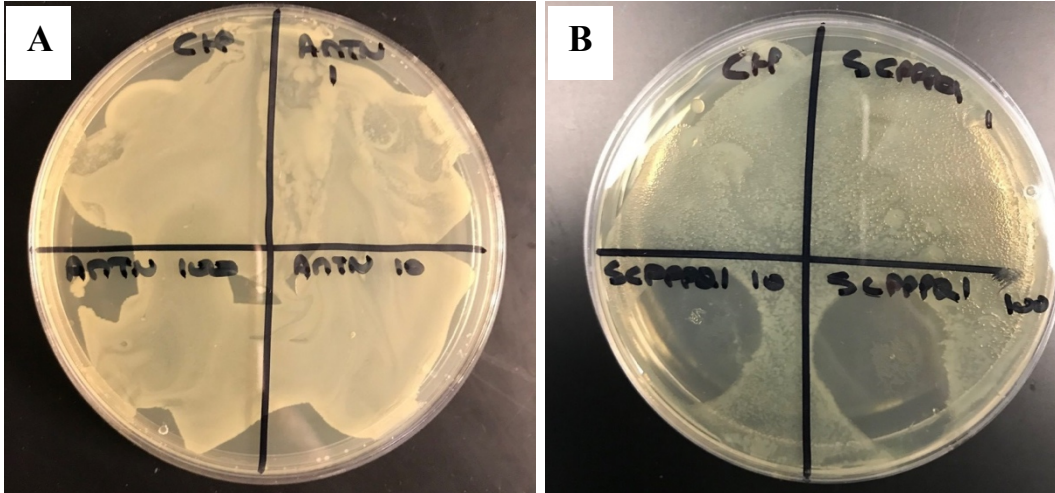


Figure V.6 : Lysis test on agar plates to assess the antibacterial activity

Chapitre VI – Discussion

L'EJ est un épithélium unique créant un scellement autour de la dent afin de protéger les tissus parodontaux de l'environnement agressif de la cavité buccale. Cette adhésion se fait via une LBS dont 3 des 4 composants ont récemment été découverts par le groupe du Dr Nanci. La découverte et l'étude de ces nouvelles protéines a permis de mieux comprendre cet agencement unique qui est la première barrière physique contre l'intrusion des bactéries ayant ainsi un rôle important dans le maintien de la santé parodontale. Au fond du sulcus, ces molécules sont directement en contact avec les bactéries périodonto-pathogènes et leurs dérivés, et en considérant que les prémisses de la MP sont dues à un décollement de l'EJ, nous avons caractérisé la structure et les interactions de ces protéines afin d'éclaircir leurs liens avec la maladie. Une combinaison de techniques de biologie moléculaire et structurale a mis en avant que les composants de la LBS ont la capacité d'interagir afin de former un réseau supramoléculaire et que l'intégrité des protéines et de ce réseau peut être affectée par les bactéries associées à la MP. Il est essentiel de mieux comprendre ces molécules afin de déterminer les mécanismes d'initiation de la MP afin de développer des approches thérapeutiques.

VI.1 – Le rôle des protéines de la LBS

L'étude du rôle des protéines dans un système *in vivo* se fait essentiellement par l'analyse du phénotype de l'animal déficient en une protéine cible. Malheureusement, les modèles totalement déficients en Lam332 ou une de ces chaînes entraînent une létalité précoce de l'animal [67]. Pour contourner ce phénotype, nous avons exploité une souris transgénique *LAMC2* humaine inductible par la doxycycline afin d'étudier le rôle de la Lam332 au niveau de la LBS puisqu'elle est l'un des 4 constituants de cette matrice extracellulaire unique (Premier article présenté dans cette thèse [58]).

VI.1.1 – L'importance de la Lam332

Ce modèle murin suggère que le stade de sécrétion n'est pas affecté. Cependant, le phénotype généré au niveau de la maturation par cette souris est complexe. Les données montrent une structuration inadéquate de la LBS entre les améloblastes et l'émail mature perturbant le

processus de maturation aboutissant à une couche d'émail significativement hypominéralisée. L'albumine est une protéine qui est visible au sein d'un grand nombre de tissus mais qui est absente ou très faiblement présente au niveau de l'émail [133]. C'est ainsi un excellent contrôle pour évaluer la perméabilité de la LBS dans notre cas. Le fait qu'on la retrouve en grande quantité au sein de l'émail en maturation chez les souris *LAMC2-Dox* suggère l'existence potentiellement anormale de plusieurs molécules exogènes. Cette présence insolite viendrait contrecarrer le processus complexe de la maturation de l'émail résultant en l'hypominéralisation observée. Certaines conditions pathologiques [134] ont mis en avant que la présence d'albumine au cours de la maturation affecterait l'expansion des cristaux de l'émail [133]. Alors que les molécules que nous étudions, exceptée ODAM, sont normalement localisées uniquement à l'interface entre les cellules épithéliales et l'émail, on observe une accumulation anormale de ces protéines au sein des cellules de l'OE qui sont quant à elles totalement désorganisées. Cette distribution aléatoire des protéines de la LBS montre que la structuration de la matrice extracellulaire est sévèrement affectée induisant probablement ces problèmes de perméabilité (**Fig. II.7**).

Une des possibilités retenues est que la différence d'homologie, bien que faible (homologie de 85% [135]), résulte en des différences de caractéristiques biochimiques de la protéine. Ces variations peuvent entraîner un changement de conformation ou diminuer les interactions entre la chaîne $\gamma 2$ et les autres composants de la LBS. L'absence d'interaction est le plus plausible puisque les protéines ont été localisées mais ont une distribution anormale. On pourrait aussi supposer que le traitement de la chaîne $\gamma 2$ humaine chez la souris pourrait poser problème puisque le traitement (comme par exemple sa sécrétion ou sa glycosylation), de cette chaîne est essentiel dans la fonction correcte des LB typiques [136]. En effet, la formation d'une LB typique non fonctionnelle du côté apical des améloblastes affecterait leurs sécrétion, polarité et résulterait en des accumulations ectopiques. Néanmoins, l'absence de phénotype des LB durant le stade de pré-sécrétion et dans les tissus épithéliaux dans le reste de l'organisme suppose un traitement sans problème de la chaîne $\gamma 2$.

Pour faire suite à ces analyses, nous avons utilisé ce modèle animal comme « KO » conditionnel en arrêtant de lui donner de la doxycycline (Off-Dox). Une, 2 ou 3 semaines suite à l'arrêt de la prise de l'antibiotique, les animaux sont sacrifiés afin d'évaluer l'effet de l'absence de la protéine. Ces animaux montrent d'importants défauts au niveau de la zone de maturation de la LBS. Un immunomarquage en utilisant des billes d'or montrent que les protéines sont diffuses et l'on retrouve d'importantes zones de matrice dystrophique (**Fig. VI.1**) (Données de Katia Ponce, non publiées).

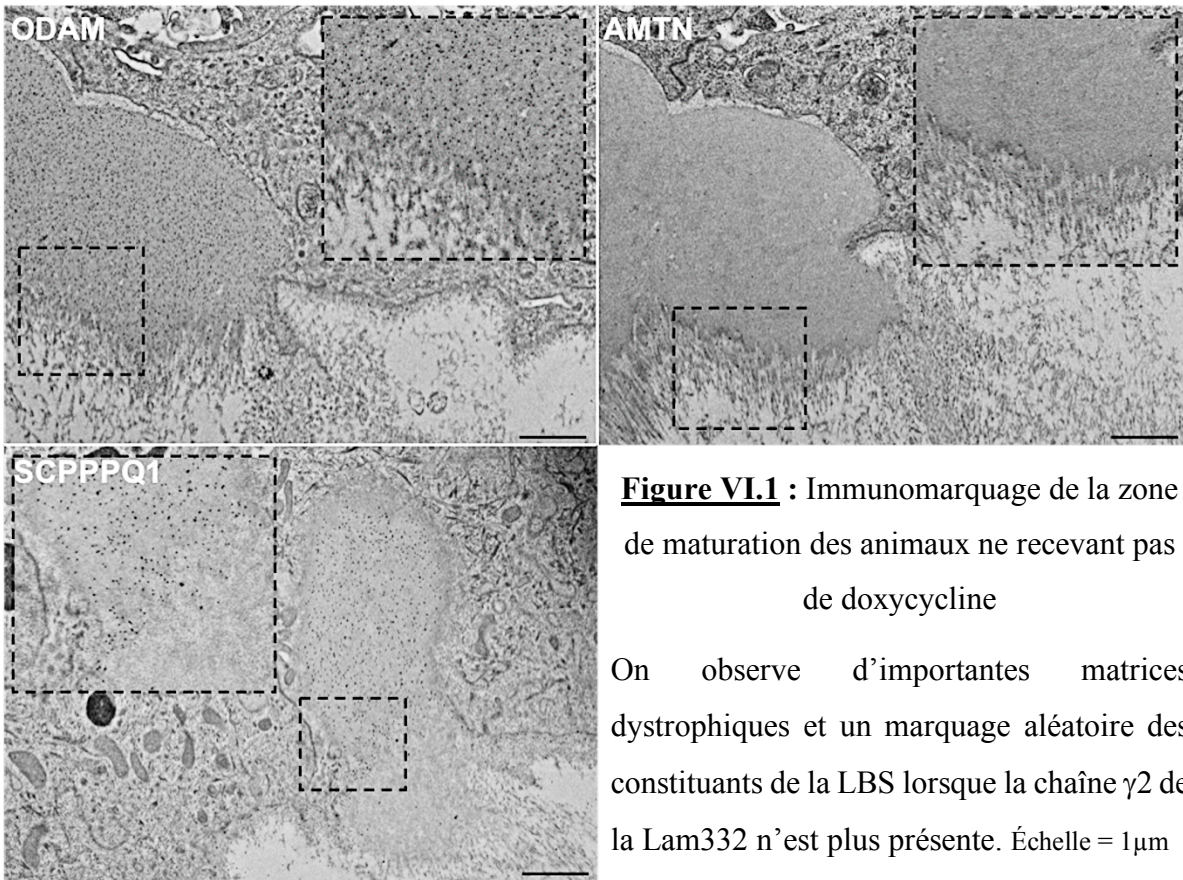


Figure VI.1 : Immunomarquage de la zone de maturation des animaux ne recevant pas de doxycycline

On observe d'importantes matrices dystrophiques et un marquage aléatoire des constituants de la LBS lorsque la chaîne $\gamma 2$ de la Lam332 n'est plus présente. Échelle = 1 μ m

De telles matrices sont similaires à celles retrouvées dans les TOECs, qui rappelons-le sont des tumeurs calcifiées concentriques où l'on retrouve une partie d'ODAM, APIN, qui crée des plaques amyloïdes [46]. Il est d'ailleurs intéressant de voir qu'ODAM est localisée préférentiellement au sein des matrices alors qu'AMTN et SCPPPQ1 se retrouvent au bord de ces zones dystrophiques, c'est-à-dire face à la dent. La distribution anormale des protéines et l'absence de la chaîne $\gamma 2$ mènent à des décollements importants de la LBS qui devient alors

irrégulière (**Fig. VI.2**). Tout comme les animaux recevant de la Dox, on observe des défauts importants dans la minéralisation de la dent en MEB (**Fig. VI.3**) (Données de MEB de Dr Contreras-Rodriguez, non publiées). Il n'y a aucune structuration et orientation des cristaux et l'émail paraît mou et contenir de nombreuses imperfections. Un tel email est également visible chez des patients atteints d'EB jonctionnelle due à des mutations de la Lam332 [137].

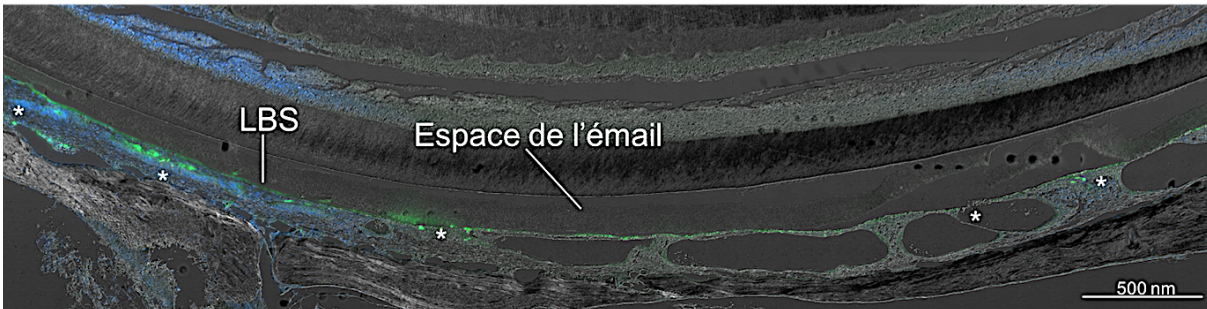


Figure VI.2 : Observation en DIC et fluorescence d'une incisive de rat d'un animal Off-Dox. Localisation diffuse d'ODAM (en vert) au sein d'une LBS irrégulière (*) et ayant de nombreux décollements.

Bien que les altérations dentaires résultant de la prise de Dox soient rares et négligeables [138], nous nous sommes assurés que les effets dramatiques observés n'étaient pas dus à l'absorption prolongée de Dox en utilisant des animaux sauvages recevant des doses similaires de Dox. L'analyse préliminaires des animaux où l'apport de Dox est supprimé montrent donc des défauts similaires, mais avec un phénotype plus sévère, que ceux du modèle recevant la Dox. L'absence de la chaîne $\gamma 2$ résulte en des matrices dystrophiques plus importantes et on observe une absence totale de cohésion cellulaire au sein de l'OE au stade de maturation résultant en une LBS absente ou irrégulière. Ces deux modèles sont cohérents et soulignent l'importance de la Lam332, et plus particulièrement de la chaîne $\gamma 2$, dans la formation d'un scellement efficace dans le maintien de la santé parodontale.

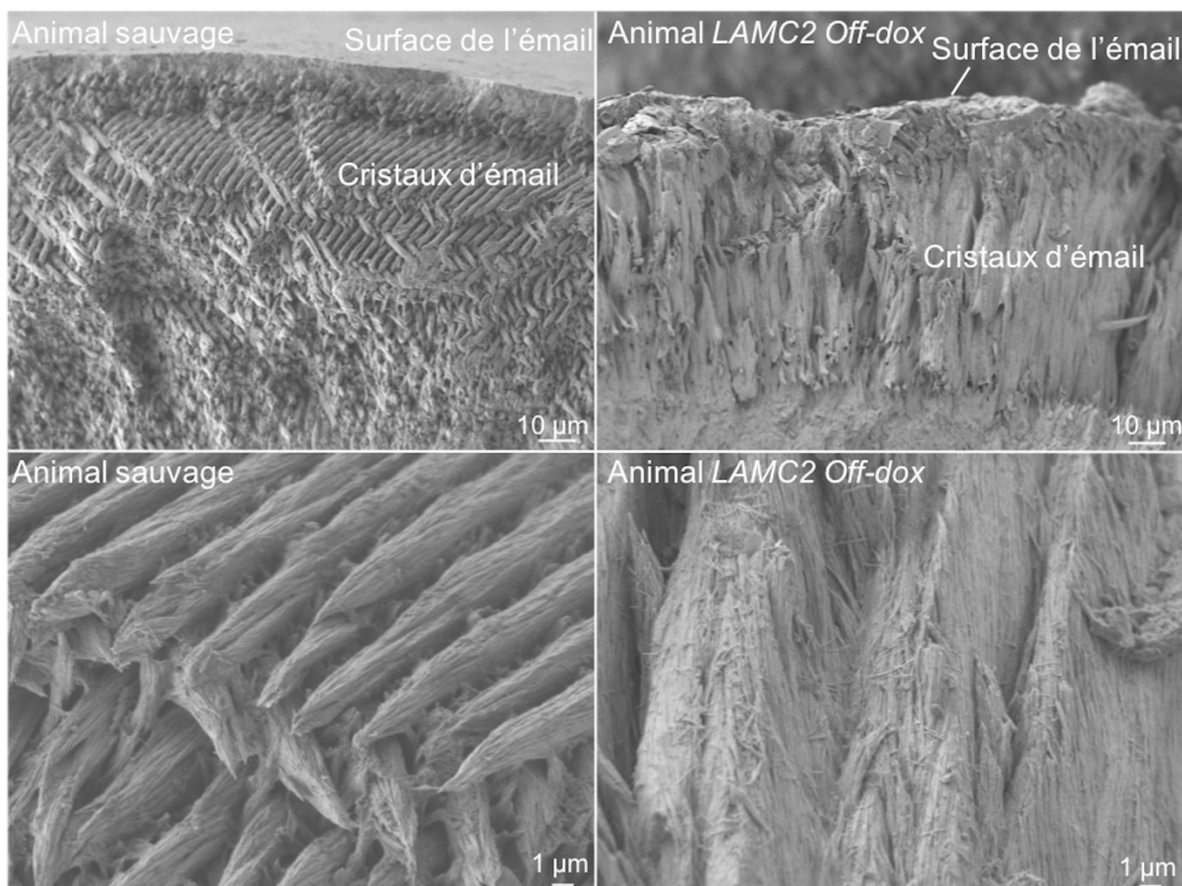


Figure VI.3 : Comparaison de l'émail d'un animal sauvage avec celui d'un animal *LAMC2* déficient conditionnellement en la chaîne $\gamma 2$ de la Lam332

VI.1.2 – L'implication d'AMTN et d'ODAM

Les études des animaux déficients en ODAM ou AMTN ont montré que seule ODAM aurait un effet sur le scellement de l'EJ qui mimique la MP [59, 60, 68]. Concernant le modèle animal sur-exprimant AMTN, les effets observés sur le minéral sont à prendre avec précaution puisqu'il y a un manque de contrôles pour valider le phénotype visualisé [59]. En effet, dans ce modèle transgénique la protéine est produite et surexprimée bien plus tôt que dans une souris sauvage [7, 59]. AMTN est visible dès les premières étapes de sécrétion, alors qu'elle n'est normalement présente qu'au début de la maturation. Cette surexpression n'affecte ni l'expression d'autres protéines de l'émail ni la formation de la LBS mais sa présence dès l'étape de sécrétion peut perturber les protéines formant l'émail, dans ce processus précis et complexe permettant la formation et l'organisation des cristaux, et mener à des défauts dans la microstructure [139].

Une surexpression d'AMTN sous le promoteur d'ODAM ou de SCPPPQ1 devrait être envisagée pour valider ce phénotype. Concernant le modèle déficient en AMTN [60], celui-ci est également remis en cause puisqu'aucune donnée ne semble montrer un rôle significatif d'AMTN dans la minéralisation de la dent [61]. Aucun défaut n'est visible sur les molaires et les incisives du maxillaire. Seulement les incisives de la mandibule montrent un émail friable à la surface de la dent et au bout de celle-ci, cependant de nombreuses publications définissent ces effets comme majeurs [117, 140].

Il n'existe malheureusement pas à l'heure actuelle de souris déficiente ou transgénique pour la protéine SCPPPQ1 afin que nous puissions avoir le tableau complet de l'effet de chacune des protéines.

VI.1.3 – Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles (PTMs) ont un rôle majeur dans la fonction de certaines protéines [141] et dans la structuration des LB typiques [142]. La LBS tout comme les autres LB contient des molécules ayant des PTMs [143]. À la suite des découvertes des composants de la LBS, les différentes protéines ont montré un potentiel à être modifiée post-traductionnellement [6, 7, 38]. L'étude d'animaux recevant de la tunicamycine, un antibiotique entraînant la perte de N-glycosylation, montre des défauts importants au niveau de la LBS [144]. La laminine est une protéine hautement N-glycosylée [43], alors qu'AMTN ne posséderait qu'un site de N-glycosylation et qu'ODAM et SCPPPQ1 ne seraient pas N-glycosylées [6, 8, 34]. Il est intéressant de constater que les défauts observés au niveau des animaux recevant de la tunicamycine sont similaires à ceux observés au niveau des animaux *LAMC2* recevant ou non la Dox. On observe donc des matrices dystrophiques et une distribution anormale des autres composants de la LBS (**Fig. VI.4**) (Données de Katia Ponce, non publiées). Également une perte de perméabilité est visible due à la détection d'albumine au sein de l'émail (**Fig. VI.4**) (Données de Katia Ponce, non publiées). Même si la faible présence ou l'absence de N-glycosylation d'AMTN, ODAM ou SCPPPQ1 doit être confirmée (vu que ce sont des études de prédictions *in silico*), la similitude de phénotype en absence de N-glycosylation et des animaux *LAMC2* supporte l'importance des modifications post-traductionnelles de la Lam332 et montre l'importance de l'intégrité de la structure afin de créer une LBS fonctionnelle et sélectivement

perméable. Les études présentées dans cette thèse exploitent les protéines recombinantes, c'est-à-dire sans PTMs, il sera alors essentiel de visualiser l'impact de ces modifications sur la fonctionnalité des protéines et leurs interactions. Il faut rappeler que les PTMs peuvent représenter jusqu'à un tiers du poids moléculaire de certaines des protéines étudiées et qu'elles peuvent avoir des rôles importants dans l'association, la stabilisation ou la fonction des protéines.

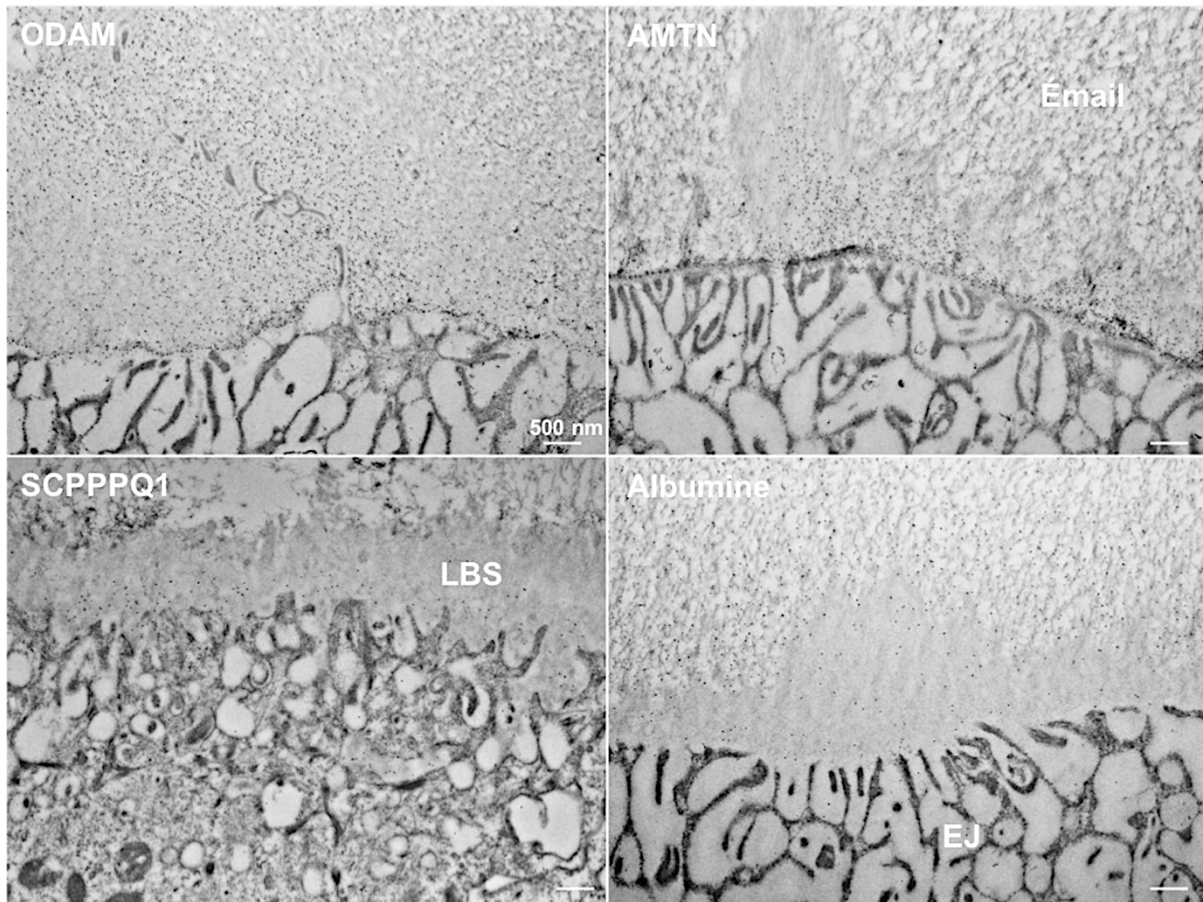


Figure VI.4 : Immunomarquage en utilisant de billes d'or des animaux recevant de la tunicamycine

Les animaux montrent des matrices dystrophiques importantes et une diffusion des protéines de la LBS. On observe aussi une perte de la perméabilité due à la présence d'albumine au sein de l'émail.

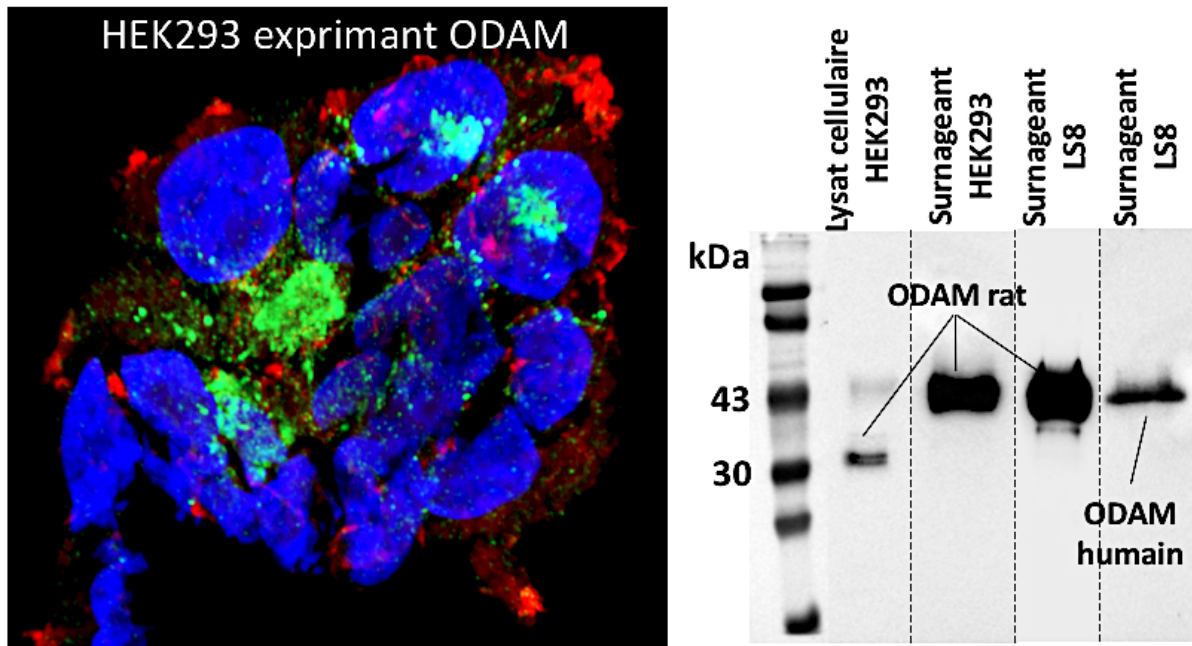


Figure VI.5 : Résultats des infections de cellules par ODAM

Les cellules expriment ODAM (en vert) au niveau de l'appareil de Golgi (Noyau en bleu et filament d'actine en rouge). La protéine au sein des cellules semble être non ou peu modifiée post-traductionnellement comparée à celle retrouvée dans le milieu cellulaire.

Afin d'étudier les PTMs, nous avons exploité un système de lentivirus (VectorBuilder) qui nous a permis d'obtenir des lignées stables HEK293 (cellules humaines embryonnaires du rein) et LS8 (cellules dérivées des améloblastes) produisant ODAM soit de rat soit humaine (**Fig. VI.5**). La protéine localise principalement autour du noyau au niveau de l'appareil de Golgi. Comme attendu, la protéine est également sécrétée puisque nous la détectons par immunobuvardage dans le milieu de culture avec un poids moléculaire d'environ 43 kDa (**Fig. VI.5**) (Données de Benoit Bessette, non publiées). L'analyse prochaine de la protéine en spectrométrie de masse apportera les informations quant à l'état des PTMs. ODAM semble se comporter similairement dans les cellules HEK293 que les LS8 qui sont des cellules dérivées des améloblastes. La sécrétion à un poids moléculaire similaire suggère que le type cellulaire n'affecte pas le traitement de la protéine. On remarque aussi l'obtention d'une quantité plus élevée d'ODAM de rat vis-à-vis

d'ODAM humain pour un nombre équivalent de cellules. L'étude de ces lignées stables produisant ODAM serviront à comprendre d'où viennent les différences du taux d'expression mais également à étudier leurs comportements cellulaires et à analyser les possibles variations au niveau de l'ARNm pour étudier le lien d'ODAM avec le cancer.

VI.1.4 – La relation d'ODAM avec les cancers épithéliaux

Enfin, nous avons évoqué dans l'introduction la relation particulière d'ODAM avec les cancers épithéliaux, alors que dans les tissus sains ODAM n'est pas présente [11]. Les études actuelles se contredisent sur le fait qu'ODAM aurait un rôle d'inhibiteur ou de propagation des cancers et cela ne permet pas d'établir le rôle de la protéine ni de définir avec précision son utilisation dans une voie de signalisation particulière [75, 77, 79]. Des différentes protéines formant la LBS, uniquement ODAM est retrouvée normalement au niveau des cellules de l'EJ. Ce dernier a la particularité d'être incomplètement différencié qui est un caractère commun aux cellules cancéreuses qui proviennent d'une dédifférenciation des cellules saines. De manière surprenante, les deux types cellulaires contiennent de grandes quantités d'ODAM qui aurait hypothétiquement un rôle dans la différenciation cellulaire. Nos résultats montrent que les cellules produisant ODAM ont une vitesse de dédoublement plus rapide que celles sans la protéine (**Fig. VI.6**) (Données de Benoit Bessette, non publiées). Une des problématiques du cancer est sa capacité à se propager rapidement. L'observation qu'ODAM influence la multiplication des cellules pourrait alors aller de pair avec la vitesse de propagation des cancers. Des études montrant un lien entre ODAM et des cancers agressifs vont ainsi dans le sens de nos observations tout comme le fait que les cellules de l'EJ ont un renouvellement rapide. Également, ODAM serait associé à l'inflammation continue de l'EJ qui est un caractère aussi partagé avec les cellules cancéreuses. Vu qu'ODAM agirait avec la voie PTEN/AKT, il serait intéressant d'évaluer les niveaux de ces deux protéines dans les cellules

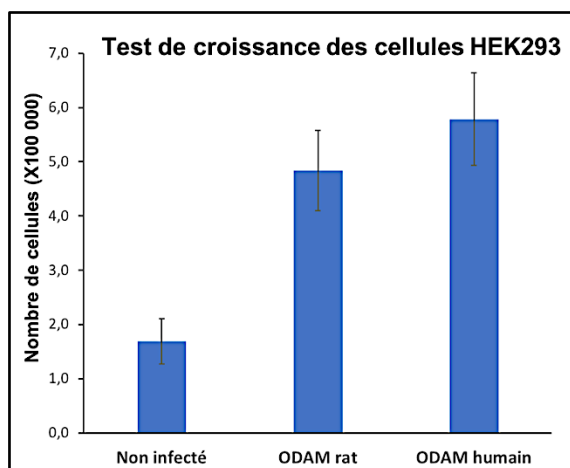


Figure VI.6 : Test de croissance des cellules HEK293 suivant leurs infections

infectées mais également dans les cellules de l'EJ qui contrôlent sainement ODAM. Des études de séquençages à haut débit d'ARN et du comportement cellulaire de lignées stables comportant ODAM devront suivre pour valider l'implication d'ODAM dans les changements cellulaires. Les modifications post-traductionnelles d'ODAM devront aussi être prises en compte dans le rôle qu'à la protéine dans le cancer. Son association avec les néoplasies reste encore obscure et des analyses complémentaires seront nécessaires afin de déterminer l'ensemble des facettes de cette protéine à multiples fonctions.

VI.2 – La caractérisation du réseau de la LBS

Suite à l'identification d'AMTN, ODAM et SCPPPQ1 comme étant des constituants de la LBS permettant la fixation des cellules épithéliales à la surface minéralisée des dents [5-8, 34, 35], aucune étude n'avait permis une caractérisation générale des protéines afin de déterminer leurs structures et interactomes. Le but était donc d'obtenir des informations structurales et de les exploiter pour développer nos connaissances sur le rôle et la fonction de chacune des protéines.

VI.2.1 – Les protéines au sein de la LBS

Le second article de cette thèse a permis de caractériser la distribution spatiale d'AMTN, ODAM et SCPPPQ1 au sein de la LBS afin d'éclaircir leurs arrangements, de montrer leurs propensions d'interactions et de déterminer pour la première fois leurs structures quaternaires. Cette disposition différentielle met en avant le rôle de chacune des protéines dans l'assemblage

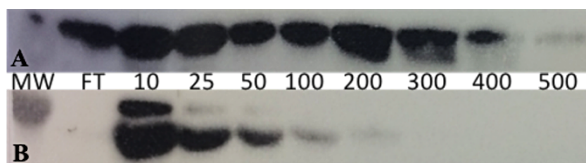


Figure VI.7 : Évaluation de l'affinité

d'AMTN (A) et ODAM (B) avec

l'hydroxyapatite

de la matrice extracellulaire et dans la capacité unique de la LBS d'adhérer aux surfaces minéralisées. Grâce à des études antérieures, nous savons que les molécules que nous étudions ont la capacité d'adhérer au minéral, mais nous ne savons pas si elles ont chacune une affinité différente avec celui-ci. Nous avons mis en place une étude de l'affinité des molécules d'étude avec l'hydroxyapatite, la composante principale de l'émail [145]. Les molécules ont été incubées sur des billes d'hydroxyapatite puis éluées en augmentant

progressivement la concentration en phosphate de la solution. Les ions de phosphate vont jouer le rôle de compétiteur et permettre une élution des molécules (**Fig. VI.7**). Dans ce test nous avons pu observer que SCPPPQ1 était la protéine ayant le plus d'affinité avec l'hydroxyapatite, suivi d'AMTN et enfin d'ODAM. Ces résultats sont très intéressants et supportent la distribution spatiale observée puisqu'AMTN et SCPPPQ1 sont localisées du côté de la dent, avec une prédominance pour cette dernière (**Fig. III.7**), ce qui permet de supposer qu'elles ont toutes deux un potentiel rôle dans l'adhésion de la LBS avec la dent. Néanmoins, la situation semble plus complexe vu l'absence de phénotype pendant la maturation chez les animaux déficients en ODAM ou en AMTN [60, 68]. Seule une délamination partielle de l'EJ est observée dans les animaux « KO » ODAM [68]. Donc, soit d'autres molécules encore inconnues peuvent être impliquées dans la structuration de la LBS soit l'absence d'une des molécules est compensée. On peut ainsi penser que l'absence d'AMTN est compensée par SCPPPQ1 puisque nos données placent SCPPPQ1 plus proche de l'émail. Malheureusement aucune étude sur l'expression de molécule compensatrice dans ces animaux déficients n'a été réalisée.

VI.2. 2 – La capacité d'interaction des protéines

Les protéines co-localisent au sein d'une même structure, la LBS, et nos données sur les animaux transgéniques *LAMC2* montrent une distribution aléatoire des molécules lorsque la Lam332 n'est pas intègre, résultant en une LBS anormale. Dans le second article présenté dans cette thèse, nous avons montré par BTH et co-IP qu'AMTN, ODAM et SCPPPQ1 ont la capacité d'interagir ensemble. Cette association résulte en la formation d'un réseau supramoléculaire similaire à des LB typiques reportées dans la littérature [129].

Puisqu'aucune information sur ces protéines n'est disponible, il est important de mettre en avant des motifs et/ou d'obtenir le plus de données possibles sur leurs séquences. Puisque les protéines interagissent entre elles, nous avons cherché à déterminer leurs potentiels sites d'interaction. À ces fins, nous avons présélectionné des motifs par « phage display » [123] puis identifié les AA importants en combinant la mutagenèse dirigée avec la quantification enzymatique du BTH [146]. La technique de BTH avait été préalablement utilisée avec succès afin de montrer le potentiel d'interaction des protéines. Cette étude préliminaire a permis d'identifier que les AA 112 et 207 à 209 d'ODAM joueraient un rôle dans l'interaction avec AMTN (**Fig. VI.8 rouge**).

Les AA 106, 107, 110, 152 et 153 d'AMTN semblent important pour son interaction avec SCPPPQ1 (**Fig. VI.8 vert**). Les AA 27 à 30 et 66 de SCPPPQ1 semblent quant à eux important pour l'interaction avec ODAM (**Fig. VI.8 orange**).

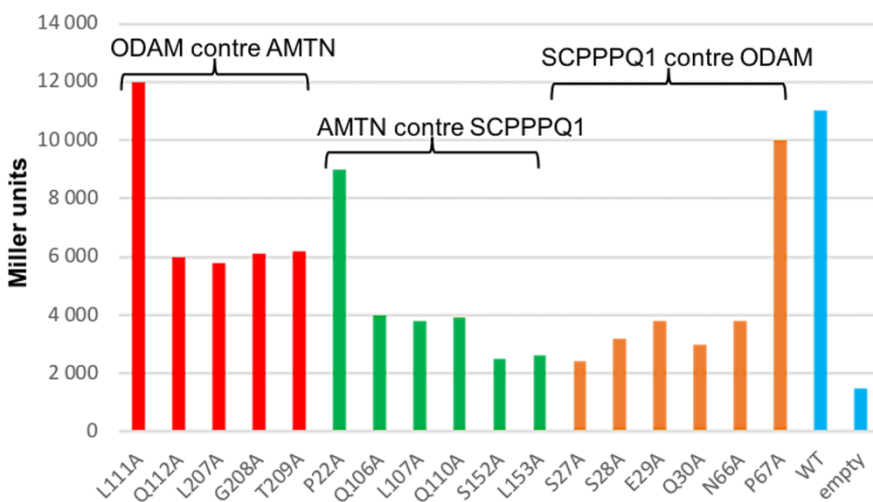


Figure VI.8 :
Évaluation de l'importance des acides aminés sélectionnée par « phage display » en utilisant le double hybride bactérien

Ces données préliminaires restent à confirmer et à être validées par d'autres techniques. Il s'agira de valider aussi que ces mutations ponctuelles n'affectent pas les conformations globales des protéines et donc l'accès au site d'interaction. Des études complémentaires dans un système eucaryote en utilisant le double hybride mammalien (MTH en anglais) pourraient également être utilisées afin de prendre en considération les modifications post-traductionnelles, qui comme nous l'avons expliqué précédemment, peuvent représenter une portion importante de la protéine.

De façon très intéressante, les sites identifiés par « phage display » et testés par BTH suite à la mutagenèse dirigée sont des sites que l'on retrouve exclusivement dans des portions conservées au cours de l'évolution (**Fig. VI.9**). Pour rappel, dans le second article nous avons aussi observé que l'interaction de protéines entre espèces n'affecte aucunement leur capacité d'association, soutenant l'hypothèse que les sites d'interaction se situent dans les portions en AA conservées (**Supplementary fig. III.2**).

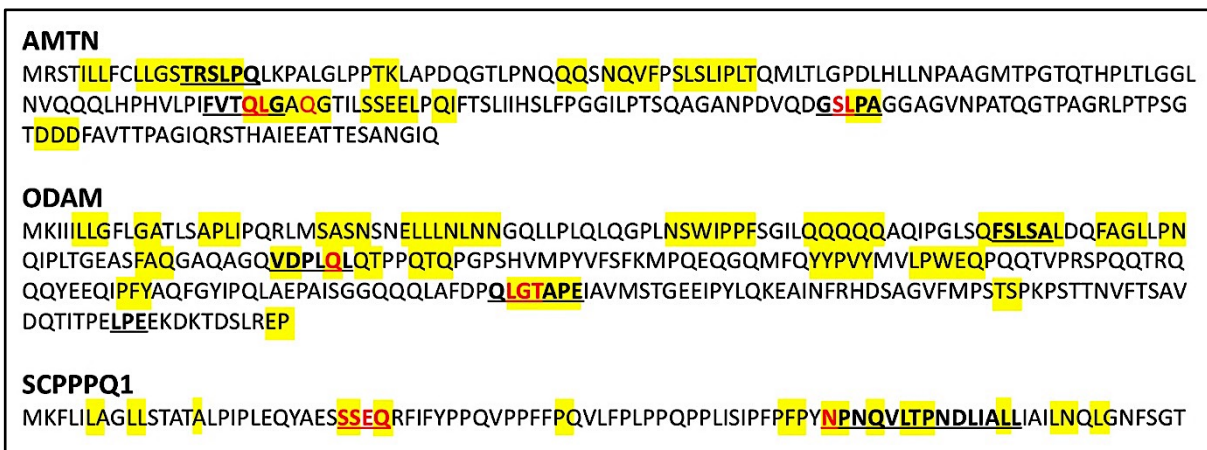


Figure VI.9 : Sommaire des données de « phage display », double hybride bactérien et de l'évolution

La conservation à travers l'évolution est représentée en jaune, les données de « phage display » en gras et soulignées et les acides aminés ayant un impact en BTH dans les interactions en rouge.

VI.2.3 – La structure des protéines

Au cours des dernières décennies, on a pu observer une augmentation des études structurales dans l'apport de multiples informations cruciales pour la compréhension de systèmes complexes amenant à la découverte de nouvelles thérapies [147]. Nous avons cherché à exploiter ces technologies pour accroître nos connaissances sur les molécules d'intérêt.

Le second article présenté dans cette thèse [9] a montré qu'AMTN et ODAM sont des protéines intrinsèquement désordonnées formant des complexes globulaires de haut poids moléculaire. Dû à ces caractéristiques, nous n'avons pas pu exploiter des méthodes de cristallographie aux rayons X (X-ray) ni de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). En plus de l'AFM et de la MET, nous avons utilisé le SAXS qui est une technique permettant la caractérisation de molécules flexibles. Les données de Kratky nous ont permis de confirmer la nature désorganisée d'AMTN et d'ODAM (**Fig. VI.10**) préalablement observée par dichroïsme circulaire. C'est un trait commun que partagent les protéines dérivant de SPARC [148]. Les portions désordonnées des protéines rendent les protéines flexibles et leur permettent de bouger librement afin de trouver et recruter des partenaires dans leur environnement afin de former des multimères [149]. Le dichroïsme circulaire révèle que le mélange d'AMTN et d'ODAM résulte

en une diminution des portions désordonnées et une augmentation importante d'hélices α , suggérant que les deux protéines interagissent en formant ce type de structure (**Supplementary fig. III.1**).

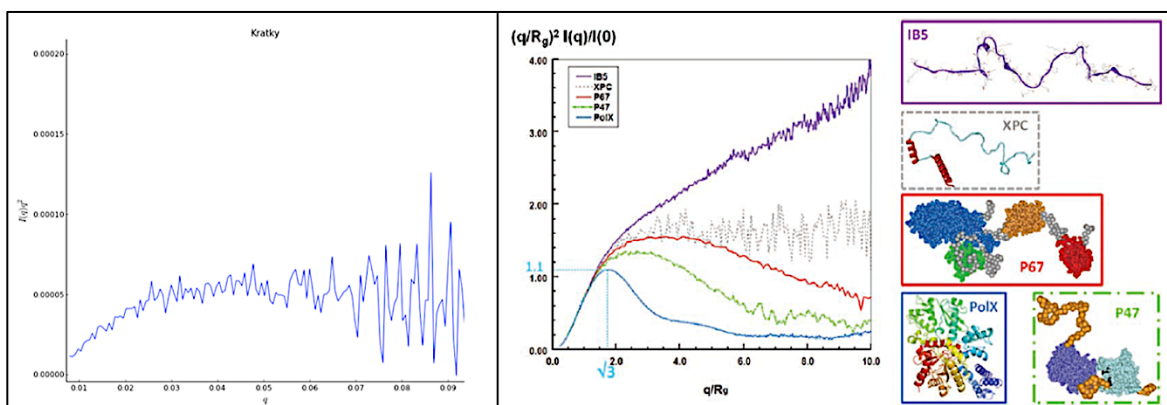


Figure VI.10 : Données de Kratky représentative d'ODAM

Les données SAXS montrent que la protéine est intrinsèquement désorganisée comparées à l'allure des courbes typiques attendues suivant la structure des protéines. <http://pubs.rsc.org>

Malheureusement, les données SAXS pour déterminer l'enveloppe des protéines n'ont pas été concluantes à cause de la non reproductibilité des résultats. On a cependant pu observer par AFM et MET que l'interaction d'AMTN et ODAM formait des complexes globulaires (**Fig. III.5**). L'observation en MET a été faite en coloration négative et en conditions cryogéniques (**Fig. III.5a-c, insets**) permettant de valider que ces complexes globulaires ne sont pas des artefacts de préparation possiblement dus à une étape de séchage et qu'elles ont un comportement natif à former ce type de structure.

SCPPPQ1 est quant à elle purifiée en conditions dénaturante (présence d'urée) limitant ainsi l'analyse de sa structure tertiaire voire quaternaire. Mais lorsqu'elle est ajoutée à ses deux protéines sœurs, elle permet la formation d'un réseau supramoléculaire. SCPPPQ1 est donc une petite molécule qui pourrait avoir un lien de pont entre les différentes protéines de la LBS en plus de jouer un rôle dans l'adhésion avec l'hydroxyapatite comme nous l'avons mentionné au début de la discussion. Il ne faut pas oublier la présence de la Lam332 dans le tableau de la LBS. En effet, on a montré l'importance de cette protéine et plus particulièrement de sa chaîne $\gamma 2$

dans l'agencement d'une LBS fonctionnelle. La perturbation de cette protéine entraîne la diffusion des molécules et donc la perte d'interactions ordonnées entre les composants de la LBS. La Lam332 jouerait donc un rôle important au sein de la LBS formant le « squelette » soutenant les autres protéines et aiderait à la coordination des interactions supramoléculaires entre AMTN, ODAM et SCPPPQ1. Dans le troisième manuscrit, nous avons d'ailleurs observé que l'ajout de la Lam332 aux 3 autres protéines entraîne la formation d'un réseau contenant des pores plus restreints, ce qui peut avoir hypothétiquement un lien avec la perméabilité. Il est intéressant de voir que l'interaction des 4 molécules forment toujours un réseau supramoléculaire qui pourrait ainsi être considéré comme une LBS reconstituée *in vitro*.

L'augmentation des connaissances sur l'architecture de ce réseau unique et sur ses constituants permettra de mieux définir comment le scellement de la jonction dento-gingival est établi et ceci permettra assurément le développement de traitements innovants pour lutter contre la maladie parodontale.

VI.3 – La relation de la maladie parodontale avec la LBS

Afin de maintenir la santé parodontale, les cellules de l'EJ doivent créer un scellement autour de la dent via l'adhésion unique des cellules épithéliales aux surfaces minéralisées. Comme nous l'avons introduit, ce scellement est crucial pour la prévention de la MP puisque la perte d'adhésion est une des premières étapes menant à la MP chronique [150]. Une fois l'inflammation installée par les bactéries, il est difficile de distinguer si la destruction des tissus est la cause directe des bactéries ou de la réponse immunitaire de l'organisme. La majorité des études concernant la MP se sont focalisées sur l'attaque du tissu conjonctif en arrière de l'EJ par les produits dérivant des bactéries [91]. Notre travail innove dans la détermination de l'impact direct de bactéries associées à la MP sur la LBS dans un contexte où l'inflammation n'intervient pas. En effet, nous avons mené de nombreux tests *in vitro* sur les protéines seules ou formant une LBS reconstituée [9], ou *ex-vivo* sur une LBS native [143]. Les résultats ont montré que certaines bactéries périodonto-pathogènes telles que *P. gingivalis* et *T. denticola* peuvent dégrader les protéines de la LBS, exceptée SCPPPQ1, et affecter la structure des LBS reconstituées et natives.

VI.3.1 – Les bactéries

De manière générale, les bactéries du groupe rouge, telles que *P. gingivalis*, protéolysent complètement et rapidement les protéines de la LBS exceptée SCPPPQ1. Les bactéries du groupe orange ne clivent aucunement ces composants exceptée *P. intermedia*. Cette dernière a une activité protéolytique semblable à celles du groupe rouge et pourrait jouer un rôle dans l'initiation de l'affaiblissement du scellement gingival afin d'ouvrir le chemin aux bactéries du groupe rouge qui auraient par la suite un effet protéolytique plus dévastateur. L'altération continue de la LBS par les bactéries affecterait drastiquement le rattachement de l'EJ à la surface minéralisée de la dent. Empêcher la « colle » de faire effet conduira à l'augmentation progressive de la poche due à la migration apicale de l'EJ et permettra aux bactéries d'augmenter la surface d'attaque afin de perturber la cohésion des cellules de l'EJ [106].

VI.3.2 – L'influence de la maladie parodontale sur les protéines de la LBS

Ce ne sont pas les bactéries elles-mêmes qui agissent directement pour créer l'inflammation mais le fait du relargage d'un cocktail d'enzymes tel que les gingipaïnes pour *P. gingivalis* qui sont des enzymes de la famille des trypsines [151]. La Lam332 est connue pour être grandement affectée par ces molécules [152] et nous avons montré qu'AMTN et ODAM le sont également. Seule SCPPPQ1 n'est pas affectée ni par les enzymes, ni par les périodonto-pathogènes. Les images MEB de la dégradation de la LBS reconstituée par *P. gingivalis* montrent des restes de fragments sur la surface de l'HOPG qui est une visualisation intéressante puisqu'on a montré dans le second article la capacité de SCPPPQ1 à avoir un profil linéaire sur ces mêmes surfaces [9] (**Fig. III.6c**).

Comme nous l'avons introduit, des études d'ODAM et AMTN dans différents modèles animaux montrent un lien de ces deux molécules avec la MP [118, 153]. Rappelons par exemple que l'on retrouve des quantités élevées de fragments d'ODAM dans le liquide crévulaire de patients atteints de MP [118] et que l'on observe une diminution importante de l'immunomarquage d'AMTN dans des modèles de souris infectées par *P. gingivalis* [117]. Ces résultats sont cohérents avec la dégradation élevée que nous avons observé au cours de nos études. Le clivage de la Lam332 par les bactéries périodonto-pathogènes (**Supplementary figure IV.3**) est également cohérent avec les fragments de Lam332 retrouvés dans le liquide crévulaire au

cours de la MP [153]. Ces deux caractéristiques montrent que la Lam332 est affectée et comme le montrent nos études sur les animaux *LAMC2*, son altération créerait une perte de cohésion de la LBS et une diffusion anormale des protéines. Ceci permettrait l'intrusion des bactéries dans les zones les plus profondes du tissu afin d'étendre leurs infections/inflammations.

VI.3.3 – Comprendre la maladie afin de lutter contre elle

Ces données ont montré pour la première fois que les bactéries associées aux MP avaient la capacité d'affecter directement le scellement de la jonction dento-gingivale en s'attaquant à la LBS. Cette étude est unique par sa façon d'aborder le problème car elle permet d'éviter la prise en compte de la réponse immunitaire dans la destruction du tissu. Le fait d'avoir démontré que la LBS est une cible directe des bactéries permet de mieux cerner comment la formation de la poche parodontale pourrait s'initier. De plus, nos visualisations montrent des effets dévastateurs qui s'étalent sur des périodes relativement courtes (2 à 6 h) en comparaison du temps d'action des pathogènes chez une personne atteinte de MP (plusieurs jours/semaines). On peut alors imaginer les dégâts importants que les bactéries peuvent entraîner lors d'une incubation prolongée. Comprendre que les enzymes ont la capacité de détruire les constituants de la LBS ou de perturber l'organisation globale de cette matrice adhésive est critique pour la détermination de cible thérapeutique.

Le décollement de la LBS par sa destruction permet d'ouvrir la porte à la propagation des bactéries le long de l'EJ ce qui mène à une invasion bactérienne, dans un premier temps à un niveau topique, mais qui mènera par la suite à une dissémination systémique. En d'autres mots, le scellement gingival est une véritable barrière afin d'éviter l'accès de plusieurs populations bactériennes à l'intérieur du corps. Déterminer le mécanisme d'action de ces pathogènes sur la LBS pourra fournir des données déterminantes pour lutter contre la propagation de la MP et des maladies systémiques. De ces découvertes de nouvelles méthodes de soins afin de traiter la MP pourront être développées afin de ne plus seulement prévenir la maladie par un contrôle de la plaque bactérienne ou dans de plus sévères cas par l'application d'un implant. Ce dernier est malheureusement aussi sujet aux infections bactériennes et seulement une lutte directe contre les acteurs des péri-implantites serait efficace afin d'éviter des dégâts dentaires et osseux importants. Puisqu'il est possible de recréer expérimentalement les effets d'une péri-implantite

chez le rat [154], il serait alors intéressant d'étudier si l'EJ est fonctionnel et s'est totalement reconstitué afin de sécréter des protéines composants la LBS. Si l'EJ est intègre, il faudra étudier la possibilité de fonctionnaliser la surface de l'implant pour aider à sa relation avec la LBS ou pour lutter contre l'adhésion précoce des bactéries qui ralentiront le processus d'intégration de l'implant [155].

VI.4 – Du fondamental à l'appliqué

Au cours des études sur l'implication de bactéries associées à la MP sur la LBS, nous avons observé la résistance de SCPPPQ1 à ces bactéries alors que ses protéines sœurs se font totalement cliver en peu de temps (**Fig. IV.1-2**). Il est aussi reconnu que *P. gingivalis* a un effet hautement destructeur et que peu de molécules résistent à ces protéases [130]. Nous avons donc étudié plus précisément la protéine et avons cherché à déterminer les possibles effets de sa résistance.

VI.4.1 – SCPPPQ1 face à la maladie parodontale

Les essais enzymatiques que nous avons établis pour le troisième manuscrit de cette thèse ont montré que SCPPPQ1 est insensible aux enzymes de type trypsine, qui compose la majorité des protéases des bactéries pathogènes buccales [130, 156]. En plus de sa résistance inattendue, la protéine a un effet sur la pousse bactérienne puisqu'on observe une diminution d'environ 75% du nombre total de bactéries après incubation avec SCPPPQ1 comparé aux autres incubations (Tampon, AMTN, ODAM) (**Fig V.3**). On observe que les bactéries sont plus dispersées et seules alors que pour les autres incubations, on observe des bactéries associées en chaînes et nombreuses d'entre elles sont en processus de division cellulaire. Nous avons à l'heure actuelle testé la protéine entière contre trois souches bactériennes orales qui sont toutes à Gram négatif. L'effet observé a été le même, c'est-à-dire une diminution drastique du nombre de bactéries après l'incubation avec la protéine. Nous devons aussi étudier si l'effet est similaire sur des bactéries à Gram positif. Une étude de l'effet dose-réponse sera également exploitée pour déterminer les meilleurs paramètres d'action de la molécule.

Seules les bactéries incubées avec SCPPPQ1 forment des biofilms (**Fig V.4**). La formation d'un tel réseau de polysaccharide est une réponse de protection [157] face à cet

environnement qu'elles considèrent comme agressif. Ces mêmes bactéries présentent de nombreuses OMVs qui bourgeonnent à leurs surfaces alors que pour les autres incubations, on observe une faible quantité de ces vésicules (**Fig V.5**). Il a récemment été montré que les OMVs sont également une réponse à un environnement agressif [132]. Dans notre cas la grande quantité d'OMVs à la surface des bactéries montrent à quel point les bactéries considèrent SCPPPQ1 comme un agent nocif.

VI.4.2 – Mécanismes des OMVs

Afin de relâcher son cocktail enzymatique, *P. gingivalis* libère les enzymes soit de façon soluble soit par l'intermédiaire d'OMVs [132]. La translocation des enzymes se fait par l'intermédiaire du nouvellement découvert système de sécrétion de type IX (T9SS) [158]. Au cours du transfert, les protéinases sont reliées à un LPS anionique qui va permettre de fixer la molécule sécrétée à la paroi cellulaire. La membrane externe bactérienne se gonfle pour produire par la suite les OMVs [159]. Sur nos données MEB des LBS reconstituées et natives, on observe des vésicules similaires à ces OMVs [102] (**Fig. IV.5-6**). Vu que la présence d'OMVs est associée avec un environnement agressif [132], nous allons exploiter cet aspect dans notre étude sur l'implication de SCPPPQ1 comme molécule antibactérienne. Le ciblage de la voie de sécrétion des gingipaines [160] peut permettre de contrecarrer les effets destructeurs des bactéries périodontopathogènes. Les seuls inhibiteurs alors connus de ces molécules ont des effets dramatiques sur les tissus environnants [161]. Il n'y a actuellement aucune molécule connue pouvant permettre d'arrêter les effets dévastateurs causés par ces bactéries et qui permettrait de prévenir l'initiation et la propagation des poches parodontales [91]. SCPPPQ1 est une protéine qui n'est pas produite en continu au sein des cellules de l'EJ, elle pourrait ainsi avoir une action à court terme prévenant la MP mais pourrait se faire déborder par le surnombre de bactéries. Aussi, si les molécules avec lesquelles elle interagit se font dégrader, SCPPPQ1 même si elle est intacte se retrouverait soit (a) collée à l'émail et aurait donc une action limitée pour éviter l'invasion des cellules, soit (b) dans le liquide crévulaire et serait alors rapidement éloignée du site d'action.

Cette thèse a permis de développer un aspect translationnel passant du fondamental à la découverte d'une molécule ayant un potentiel médical. Ceci a amené à l'écriture d'un brevet provisoire qui pourrait mener au développement de procédé appliqué. Nous espérons cibler

précisément la partie fonctionnelle de la protéine permettant cette activité antibactérienne et déterminer l'étendue de l'action de ce peptide sur une multitude de bactéries. Il sera aussi important de développer des liens avec l'industrie chimique/pharmaceutique afin de modifier chimiquement les peptides dans le but de les stabiliser ou de les exploiter dans un plus large spectre que celui que nous avons actuellement défini.

La découverte de l'effet d'un tel peptide pourrait amener à de nombreuses applications médicales dans la prévention d'infections de blessures, l'application sur des prothèses, le traitement de plaies ou encore dans le recouvrement de surface. On pourrait aussi utiliser ces peptides dans des gels antibactériens pour se laver les mains ou encore dans le recouvrement de surface plastique dans l'industrie agro-alimentaire. Le potentiel de cette molécule permettrait d'explorer de multiples applications qui pourraient servir mondialement à la communauté.

Conclusion

La maladie parodontale a une portée mondiale affectant la vie de ceux qui la contractent et représente une importante contrainte financière. Il est reconnu que le décollement de l'EJ, entraînant la formation des poches parodontales, est dû à l'activité bactérienne. Ce détachement pourrait être soit dû à la fissure des cellules soit à la perte d'adhésion de l'EJ. Néanmoins, le mécanisme déclencheur menant à la formation de ces poches reste obscur.

La découverte des molécules composant la « colle » nécessaire à l'adhésion unique des cellules épithéliales à la dent a permis d'exploiter de nouvelles approches afin de mieux comprendre la LBS et son association à l'émail. Pour la première fois, nous avons montré que le décollement de l'EJ peut se faire sans fissuration des cellules et pourrait être une prémisse à la MP ouvrant ainsi la porte à l'infection. La dégradation au fur et à mesure de la LBS mènerait au décollement progressif et à la migration apicale de l'EJ. La surface d'échange augmenterait, permettant ainsi aux bactéries de s'infiltrer et d'enflammer les tissus sous-jacents. Une fois que ce processus est installé, nous nous trouvons dans un cercle vicieux puisque la LBS, qui est détruite continuellement, ne peut plus se recoller et migre de plus en plus apicalement. Malheureusement aucun médicament n'est actuellement efficace pour lutter contre cette maladie ce qui résulte en des traitements lourds et dispendieux menant ultimement à la perte de la dent et son remplacement par l'implant.

L'étude des protéines composant la LBS est essentielle afin de déterminer comment cette structure supramoléculaire se forme et s'associe de manière unique avec le minéral. Ce projet a permis d'éclaircir le comportement des protéines et d'observer le résultat de leurs associations. L'identification des motifs impliqués dans ces différents processus permettra par la suite de développer des approches thérapeutiques à la MP et non plus une approche uniquement de prévention. Le but ultime est de trouver le moyen de maintenir le scellement gingival ou de promouvoir la reformation de l'EJ dans les cas de maladies plus avancées.

Enfin la découverte d'un potentiel antibactérien de SCPPPQ1 apporte une nouvelle dimension à la LBS et à la possible utilisation de cette molécule dans le traitement de la MP. Nos futurs travaux permettront d'identifier le fragment d'intérêt et de mieux définir les actions de cette petite molécule unique que l'on pourrait exploiter thérapeutiquement dans diverses maladies impliquant les bactéries.

Bibliographie

1. Nanci, A., *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*, ed. A. Nanci. Vol. 9. 2017, St-Louis: Mosby Elsevier. 1-411.
2. Jiang, Q., et al., *Morphological and functional characteristics of human gingival junctional epithelium*. BMC Oral Health, 2014: p. 14-30.
3. Schroeder, H.E. and M.A. Listgarten, *The gingival tissues: The architecture of peridental protection*. Periodontology 2000, 1997. **13**: p. 91-120.
4. Hormia, M., et al., *The epithelium-Tooth Interface - A basal lamina rich in Laminin-5 and Lacking Other Known Laminins Isoforms*. J DENT RES, 1998. **77**(7): p. 1479-1485.
5. Moffatt, P., et al., *Identification of secreted and membrane proteins in the rat incisor enamel organ using a signal-trap screening approach*. Eur J Oral Sci, 2006. **114**(1): p. 139-146.
6. Moffatt, P., et al., *Characterization of Apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia*. J Cell Biochem, 2008. **103**(3): p. 941-56.
7. Moffatt, P., et al., *Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium*. Biochem J, 2006. **399**: p. 37-46.
8. Moffatt, P., et al., *Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces*. Cell Tissue Res, 2014. **358**(3): p. 843-855.
9. Fouillen, A., et al., *Interactions of AMTN, ODAM and SCPPPQ1 proteins of a specialized basal lamina that attaches epithelial cells to tooth mineral*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 46683.
10. Holcroft, J. and B. Ganss, *Identification of amelotin- and ODAM-interacting enamel matrix proteins using the yeast two-hybrid system*. Eur J Oral Sci, 2011. **119** Suppl 1: p. 301-306.
11. Kestler, D.P., et al., *Expression of odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) in dental and other epithelial neoplasms*. Mol.Med., 2008. **14**(5-6): p. 318-326.
12. Shimono, M., et al., *Biological characteristics of the junctional epithelium*. Journal of Electron Microscopy, 2003. **52**(6): p. 627-639.
13. Salonen, J.I., *Proliferative potential of attached cells of human junctional epithelium*. J Periodont Res, 1994. **29**: p. 41-45.
14. Nishio, C., et al., *Expression pattern of Odontogenic Ameloblast-associated and amelotin during formation and regeneration of the junctional epithelium*. European Cells and Materials, 2010. **20**: p. 393-402.
15. Atsuta, I., et al., *Ultrastructural localization of laminin-5 (gamma 2 chain) in the rat peri-implant oral mucosa around a titanium-dental implant by immuno-electron microscopy*. Biomaterials, 2005. **26**(32): p. 6280-6287.
16. Brownell, A. and H. Slavkin, *Role of basal lamina in tissue interactions*. Ren physiol, 1980. **3**(1-6): p. 193-204.
17. Yurchenco, P.D., P.S. Amenta, and B.L. Patton, *Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens*. Mat Biol, 2004. **22**(7): p. 521-538.
18. Pozzi, A., P.D. Yurchenco, and R.V. Iozzo, *The nature and biology of basement membranes*. Matrix Biol, 2017. **57-58**: p. 1-11.

19. Nanci, A., et al., *Cytochemical and immunocytochemical characterization of the basement membrane-like structure associated with maturation ameloblasts*. J.Dent.Res.(Sp Iss), 1987. **66**: p. 353.
20. Sahlberg, C., et al., *Laminin γ 2 expression is developmentally regulated during murine tooth morphogenesis and is intense in ameloblasts*. J Dent Res, 1998. **77**(8): p. 1589-96.
21. Sawada, T., et al., *Expression and localization of laminin 5, laminin 10, type IV collagen, and amelotin in adult murine gingiva*. J Mol Histol, 2014. **45**(3): p. 293-302.
22. Iwasaki, K., et al., *Amelotin--a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein*. J Dent.Res., 2005. **84**(12): p. 1127-1132.
23. Kawasaki, K., A.V. Buchanan, and K.M. Weiss, *Gene duplication and the evolution of vertebrate skeletal mineralization*. Cells Tissues Organs, 2007. **186**(1): p. 7-24.
24. Sage, H., et al., *Distribution of the Calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice*. The journal of Histochemistry and cytochemistry, 1989. **37**(6): p. 819-829.
25. Ledda, F., et al., *The Expression of the Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) Is Associated with the Neoplastic Progression of Human Melanoma*. Journal of Investigative Dermatology, 1997. **108**(2): p. 210-214.
26. Kawasaki, K. and K.M. Weiss, *Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2006. **306**(3): p. 295-316.
27. Huq, N.L., et al., *A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4*. Arch Oral Biol, 2005. **50**(7): p. 599-609.
28. Kawasaki, K., *The SCPP gene repertoire in bony vertebrates and graded differences in mineralized tissues*. Dev Genes Evol, 2009. **219**(3): p. 147-157.
29. Holt, C., E.S. Sorensen, and R.A. Clegg, *Role of calcium phosphate nanoclusters in the control of calcification*. FEBS J, 2009. **276**(8): p. 2308-23.
30. Abbarin, N., et al., *The enamel protein amelotin is a promoter of hydroxyapatite mineralization*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(5): p. 775-85.
31. Gasse, B., J. Silvent, and J.Y. Sire, *Evolutionary Analysis Suggests That AMTN is Enamel-specific and a Candidate for AI*. Journal of Dental Research, 2012.
32. Gasse, B., et al., *Amelotin: an enamel matrix protein that experienced distinct evolutionary histories in amphibians, sauropsids and mammals*. BMC Evol Biol, 2015. **15**: p. 47.
33. Gasse, B., et al., *Amelotin Gene Structure and Expression during Enamel Formation in the Opossum Monodelphis domestica*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0133314.
34. Moffatt, P., et al., *Amelotin, a novel secreted protein that localizes to basal lamina of epithelia attached enamel*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(Suppl 1): p. S340.
35. Dos Santos Neves, J., et al., *Odontogenic ameloblast-associated and amelotin are novel basal lamina components*. Histochem Cell Biol, 2011. **137**(3): p. 329-338.
36. Yu, M., et al., *A Highly Conserved Motif within the Amelotin Protein Controls the Surface Growth of Brushite*. Crystal Growth & Design, 2018.
37. Timpl, R., et al., *Nature of the collagenous protein in a tumour basement membrane*. Eur J Biochem, 1978. **84**: p. 43-52.
38. Miyazaki, K., *Laminin-5 (laminin-332): Unique biological activity and role in tumor growth and invasion*. Cancer Sci, 2006. **97**(2): p. 91-8.

39. Kariya, Y., et al., *Differential regulation of cellular adhesion and migration by recombinant laminin-5 forms with partial deletion or mutation within the G3 domain of alpha3 chain*. J Cell Biochem, 2003. **88**(3): p. 506-20.
40. Nakashima, Y., et al., *Regulation of cell adhesion and type VII collagen binding by the beta3 chain short arm of laminin-5: effect of its proteolytic cleavage*. J Biochem, 2005. **138**(5): p. 539-52.
41. Ogawa, T., et al., *Regulation of biological activity of laminin-5 by proteolytic processing of gamma2 chain*. J Cell Biochem, 2004. **92**(4): p. 701-14.
42. Tsubota, Y., et al., *Regulation of biological activity and matrix assembly of laminin-5 by COOH-terminal, LG4-5 domain of alpha3 chain*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 14370-7.
43. Fujiwara, S., et al., *Structure and distribution of N-linked oligosaccharide chains on various domains of mouse tumour laminin*. Biochem J, 1988. **252**: p. 453-461.
44. Kariya, Y., et al., *N-Glycosylation of laminin-332 regulates its biological functions. A novel function of the bisecting GlcNAc*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33036-45.
45. Bei, M., S. Stowell, and R. Maas, *Msx2 controls ameloblast terminal differentiation*. Dev Dyn, 2004. **231**(4): p. 758-65.
46. Solomon, A., et al., *Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein*. J Lab Clin.Med., 2003. **142**(5): p. 348-355.
47. Park, J.C., et al., *The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors*. Eur.J Oral Sci., 2007. **115**(2): p. 153-160.
48. Carneiro, K.M., et al., *Amyloid-like ribbons of amelogenins in enamel mineralization*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23105.
49. Lee, H.K., et al., *The odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) cooperates with RUNX2 and modulates enamel mineralization via regulation of MMP-20*. J Cell Biochem., 2010.
50. Ozyildirim, A.M., et al., *The lacrimal gland transcriptome is an unusually rich source of rare and poorly characterized gene transcripts*. Invest Ophthalmol.Vis.Sci, 2005. **46**(5): p. 1572-1580.
51. Group, T.F.C.a.R.G.E.R., *The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome*. Science, 2005. **309**: p. 1559-1563.
52. Bonass, W.A., et al., *Identification of rat enamel organ RNA transcripts using differential-display*. Connective Tissue Research, 1998. **39**(1-3): p. 249-256.
53. Dey, R., H.H. Son, and M.I. Cho, *Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained suppression subtractive hybridization*. Archives of Oral Biology, 2000. **46**: p. 249-260.
54. Aung, P.P., et al., *Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer*. Oncogene, 2006. **25**(17): p. 2546-2557.
55. Sekiguchi, M., K. Sakakibara, and G. Fujii, *Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma*. Jpn J Exp Med, 1978. **48**(1): p. 61-68.
56. Jue, S.S., et al., *Localization of ODA, PCNA, and CK14 in regenerating junctional epithelium during orthodontic tooth movement in rats*. Angle Orthod, 2014. **84**(3): p. 534-40.

57. Nishio, C., et al., *Disruption of periodontal integrity induces expression of apin by epithelial cell rests of Malassez*. J Periodontal Res, 2010. **45**(6): p. 709-713.
58. Wazen, R.M., et al., *Laminin gamma2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects*. Matrix Biol, 2016.
59. Lacruz, R.S., et al., *Targeted overexpression of amelotin disrupts the microstructure of dental enamel*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35200.
60. Nakayama, Y., J. Holcroft, and B. Ganss, *Enamel Hypomineralization and Structural Defects in Amelotin-deficient Mice*. Journal of Dental Research, 2015. **94**(5): p. 697-705.
61. Bartlett, J.D. and J.P. Simmer, *New perspectives on amelotin and amelogenesis*. J Dent Res, 2015. **94**(5): p. 642-4.
62. Lu, Y., et al., *Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation*. Biol Chem, 2008. **389**(6): p. 695-700.
63. Nunez, S.M., et al., *Maturation stage enamel malformations in Amtn and Klk4 null mice*. Matrix Biol, 2016. **52-54**: p. 219-233.
64. Ryan, M.C., et al., *Targeted disruption of the LAMA3 gene in mice reveals abnormalities in survival and late stage differentiation of epithelial cells*. J Cell Biol., 1999. **145**(6): p. 1309-1323.
65. Kiritsi, D., C. Has, and L. Bruckner-Tuderman, *Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa*. Cell Adh Migr, 2013. **7**(1): p. 135-41.
66. Meng, X., et al., *Targeted inactivation of murine laminin gamma2-chain gene recapitulates human junctional epidermolysis bullosa*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(4): p. 720-31.
67. Adair-Kirk, T.L., et al., *Keratinocyte-targeted expression of human laminin gamma2 rescues skin blistering and early lethality of laminin gamma2 deficient mice*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45546.
68. Wazen, R.M., et al., *Inactivation of the Odontogenic ameloblast-associated gene affects the integrity of the junctional epithelium and gingival healing*. Eur Cells Mater, 2015. **30**: p. 187-199.
69. Bosshardt, D.D. and N.P. Lang, *The junctional epithelium: from health to disease*. Journal of Dental Research, 2005. **84**(1): p. 9-20.
70. Smith, C.E., et al., *Deletion of amelotin exons 3-6 is associated with amelogenesis imperfecta*. Hum Mol Genet, 2016. **25**(16): p. 3578-3587.
71. Backman, B. and A.K. Holm, *Amelogenesis imperfecta: prevalence and incidence in a northern Swedish county*. Oral epidemiology, 1986. **14**: p. 43-47.
72. Chan, H.C., et al., *Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds*. Eur J Oral Sci, 2011. **119 Suppl 1**: p. 311-23.
73. Crivelini, M.M., et al., *Expression of odontogenic ameloblast-associated protein, amelotin, ameloblastin, and amelogenin in odontogenic tumors: immunohistochemical analysis and pathogenetic considerations*. J Oral Pathol Med, 2012. **41**(3): p. 272-80.
74. Murphy, C.L., et al., *Odontogenic ameloblast-associated protein nature of the amyloid found in calcifying epithelial odontogenic tumors and unerupted tooth follicles*. Amyloid., 2008. **15**(2): p. 89-95.
75. Siddiqui, S., et al., *Odontogenic ameloblast associated protein as a novel biomarker for human breast cancer*. Am.Surg., 2009. **75**(9): p. 769-775.
76. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, *Matrix metalloproteinases and tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(1): p. 9-34.

77. Lee, H.K., et al., *Expression pattern, subcellular localization, and functional implications of ODAM in ameloblasts, odontoblasts, osteoblasts, and various cancer cells*. Gene Expr Patterns, 2012. **12**(3-4): p. 102-8.
78. Lee, H.K., et al., *Odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM), via phosphorylation by bone morphogenetic protein receptor type IB (BMPR-IB), is implicated in ameloblast differentiation*. J Cell Biochem, 2012. **113**(5): p. 1754-65.
79. Kestler, D.P., et al., *ODAM expression inhibits human breast cancer tumorigenesis*. Breast Cancer (Auckl), 2011. **5**: p. 73-85.
80. Foster, J.S., et al., *Odontogenic ameloblast-associated protein (ODAM) inhibits growth and migration of human melanoma cells and elicits PTEN elevation and inactivation of PI3K/AKT signaling*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 227.
81. Luo, Y., et al., *ODAM is a predictor for biomedical recurrence and inhibits the migration and invasion of prostate cancer*. Am J Transl Res, 2016. **8**(2): p. 670-679.
82. McLoughlin, J., et al., *The clinical correlation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10, phosphorylation of AKT to an activated state, and odontogenic ameloblast-associated protein in gastrointestinal stromal tumors*. J Surg Res, 2016. **202**(2): p. 403-12.
83. Chen, M.L., et al., *The deficiency of Akt1 is sufficient to suppress tumor development in Pten^{+/-} mice*. Genes Dev, 2006. **20**(12): p. 1569-74.
84. Wong, G.S. and A.K. Rustgi, *Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis*. Br J Cancer, 2013. **108**(4): p. 755-61.
85. Li, X., et al., *Systemic diseases caused by oral infection*. Clinical Microbiology Reviews, 2000. **13**(4): p. 547-558.
86. Sandros, J., P.N. Papananou, and G. Dahlén, *Porphyromonas gingivalis invades oral epithelial cells in vitro*. J Periodont Res, 1993. **28**: p. 219-226.
87. Schytte Bix, I.J., et al., *Entrance of Actinobacillus actinomycetemcomitans into HEp-2 Cells In Vitro*. J Periodontal, 1992. **63**: p. 723-728.
88. Page, R.C. and H.E. Schroeder, *Pathogenesis of inflammatory periodontal disease*. Lab Invest, 1976. **34**: p. 235-249.
89. Costalonga, M. and M.C. Herzberg, *The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries*. Immunol Lett, 2014. **162**(2 Pt A): p. 22-38.
90. Suzumura, Y., et al., *Long junctional epithelium produced by application of bacterial proteases in rats*. J Periodont Res, 1989. **24**: p. 217-221.
91. Bosshardt, D.D., *The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences*. Periodontology 2000, 2018. **76**: p. 43-50.
92. Shaddox, L.M. and C.B. Walker, *Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions*. Clinical, cosmetic and Investigational Dentistry, 2010. **2**: p. 79-91.
93. Pollanen, M.T., J. Salonen, and V.J. Uitto, *Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease*. Periodontology 2000, 2003. **31**: p. 12-31.
94. Socransky, S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. J Clin Periodontol, 1998. **25**: p. 134-144.
95. Hashimoto, M., et al., *Binding of Porphyromonas gingivalis fimbriae to Treponema denticola dentilisin*. FEMS Microbiology Letters, 2003. **226**(2): p. 267-271.

96. Hasebe, A., et al., *Biological Activities of Bacteroides forsythus Lipoproteins and Their Possible Pathological Roles in Periodontal Disease*. Infection and Immunity, 2004. **72**(3): p. 1318-1325.
97. Grenier, D. and B.C. McBride, *Preliminary studies on the influence of in vivo growth on selected characteristics of porphyromonas gingivalis W83*. Microbial Ecology in Health and Disease, 1991. **4**: p. 105-111.
98. Grenier, D., D. Groleau, and A. Nanci, *Characterization of the wheat germ agglutinin-binding property of Treponema denticola* Journal of Periodontal Research, 1993. **28**: p. 211-218.
99. Han, Y.W., *Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen*. Curr Opin Microbiol, 2015. **23**: p. 141-7.
100. Raja, M., F. Ummer, and C.P. Dhivakar, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans - a tooth killer?* J Clin Diagn Res, 2014. **8**(8): p. ZE13-6.
101. Ruan, Y., et al., *Comparative genome analysis of Prevotella intermedia strain isolated from infected root canal reveals features related to pathogenicity and adaptation*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 122.
102. Zhu, Y., et al., *Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola synergistic polymicrobial biofilm development*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71727.
103. Lamont J, R., et al., *Porphyromonas gingivalis Invasion of Gingival Epithelial Cells*. Infection and Immunity, 1995. **63**(10): p. 3878-3885.
104. Curtis, M.A., M. Ramakrishnan, and J.M. Slaney, *Characterization of the trypsin-like enzymes of Porphyromonas gingivalis W83 using a radiolabelled active-site-directed inhibitor*. Journal of General Microbiology, 1993. **139**: p. 949-955.
105. Brien-Simpson, N.M., et al., *Porphyromonas gingivalis gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire*. Curr. Protein Pept. Sci., 2003. **4**(6): p. 409-426.
106. Bi, J., et al., *Suppression of alphavbeta6 Integrin Expression by Polymicrobial Oral Biofilms in Gingival Epithelial Cells*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 4411.
107. Schroeder, H.E. and R. Attstrom, *Effect of mechanical plaque control on development of subgingival plaque and initial gingivitis in neutropenic dogs*. J Dent Res, 1979. **87**: p. 279-287.
108. Attstrom, R. and J. Egelberg, *Emigration of blood neutrophils and monocytes into the gingival crevices*. J. periodont Res, 1970. **5**: p. 48-55.
109. Schroeder, H.E. and M.A. Listgarten, *The junctional epithelium: from strength to defense*. J dent Res, 2003. **82**(3): p. 158-161.
110. Popova, C., V. Dosseva-Panova, and V. Panov, *Microbiology of Periodontal Diseases. A Review*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014. **27**(3): p. 3754-3759.
111. Katz, J., et al., *Characterization of Porphyromonas gingivalis-induced degradation of epithelial cell junctional complexes*. Infection and Immunity, 2000. **68**(3): p. 1441-1449.
112. Tada, K., et al., *Proteolysis of ICAM-1 on human oral epithelial cells by gingipains*. J Dent Res, 2003. **82**(10): p. 796-801.
113. Tonetti, M.S., *Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration*. J Periodont Res, 1997. **32**(1 Pt 2): p. 104-109.
114. Yilmaz, O., *The chronicles of Porphyromonas gingivalis: the microbium, the human oral epithelium and their interplay*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 10): p. 2897-903.

115. Bezerra Bde, B., et al., *A.actinomycetemcomitans-induced periodontal disease promotes systemic and local responses in rat periodontium*. J Clin Periodontol, 2012. **39**(4): p. 333-41.
116. Fouillen, A., et al., *Bacteria selectively degrade the extracellular matrix attaching the gingiva to the tooth (under revision)*. Scientific reports, 2018.
117. Nakayama, Y., et al., *Localization and expression pattern of amelotin, odontogenic ameloblast-associated protein and follicular dendritic cell-secreted protein in the junctional epithelium of inflamed gingiva*. Odontology, 2017. **105**(3): p. 329-337.
118. Lee, H.K., et al., *Odontogenic Ameloblast-associated Protein (ODAM) Mediates Junctional Epithelium Attachment to Teeth via Integrin-ODAM-Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 5 (ARHGEF5)-RhoA Signaling*. J Biol Chem, 2015. **290**(23): p. 14740-53.
119. Derks, J. and C. Tomasi, *Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology*. J Clin Periodontol, 2015. **42 Suppl 16**: p. S158-71.
120. Giannobile, W.V. and N.P. Lang, *Are Dental Implants a Panacea or Should We Better Strive to Save Teeth?* J Dent Res, 2016. **95**(1): p. 5-6.
121. Tarnow, D.P., *Increasing Prevalence of Peri-implantitis: How Will We Manage?* J Dent Res, 2016. **95**(1): p. 7-8.
122. Karimova, G., et al., *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. Microbiology, 1998. **95**(1): p. 5752-5756.
123. Kokoszka, M.E. and B.K. Kay, *Mapping protein-protein interactions with phage-displayed combinatorial peptide libraries and alanine scanning*. Methods Mol Biol, 2015. **1248**: p. 173-88.
124. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W668-73.
125. Artimo, P., et al., *ExPASy: SIB bioinformatics resource portal*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Web Server issue): p. W597-603.
126. Cui, W., H.W. Rohrs, and M.L. Gross, *Top-down mass spectrometry: recent developments, applications and perspectives*. Analyst, 2011. **136**(19): p. 3854-64.
127. Kawai, K., et al., *Bioinspired choline-like ionic liquids: their penetration ability through cell membranes and application to SEM visualization of hydrous samples*. Langmuir, 2011. **27**(16): p. 9671-5.
128. Kikhney, A.G. and D.I. Svergun, *A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins*. FEBS Lett, 2015. **589**(19 Pt A): p. 2570-7.
129. Brody, S., et al., *Characterizing nanoscale topography of the aortic heart valve basement membrane for tissue engineering heart valve scaffold design*. Tissue Eng, 2006. **12**(2): p. 413-21.
130. Grenier, D., et al., *Role of gingipains in growth of Porphyromonas gingivalis in the presence of human serum albumin*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 5166-72.
131. Davey, M.E. and J.W. Costerton, *Molecular genetics analyses of biofilm formation in oral isolates*. Periodontology 2000, 2006. **42**: p. 13-26.
132. Kim, S.W., et al., *Outer membrane vesicles from beta-lactam-resistant Escherichia coli enable the survival of beta-lactam-susceptible E. coli in the presence of beta-lactam antibiotics*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5402.

133. Robinson, C., et al., *The role of albumin in developing rodent dental enamel: A possible explanation for white spot hypoplasia*. Journal of Dental Research, 1992. **71**: p. 1270-1274.
134. Kirkham, J., et al., *The chemical composition of tooth enamel in junctional epidermolysis bullosa*. Archives of Oral Biology, 2000. **45**: p. 377-386.
135. Marinkovich, M.P., et al., *Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically identical*. Laboratory Investigation, 1993. **69**: p. 295-299.
136. Rousselle, P. and K. Beck, *Laminin 332 processing impacts cellular behavior*. Cell Adh Migr, 2013. **7**(1): p. 122-34.
137. Yuen, W.Y., et al., *Enamel defects in carriers of a novel LAMA3 mutation underlying epidermolysis bullosa*. Acta Derm Venereol, 2012. **92**(6): p. 695-6.
138. Todd, S.R., et al., *No visible dental staining in children treated with doxycycline for suspected Rocky Mountain Spotted Fever*. J Pediatr, 2015. **166**(5): p. 1246-51.
139. Bartlett, J.D., *Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates*. ISRN Dent, 2013. **2013**: p. 684607.
140. Nakayama, Y., et al., *Amelotin gene expression is temporarily being upregulated at the initiation of apoptosis induced by TGFbeta1 in mouse gingival epithelial cells*. Apoptosis, 2016. **21**(10): p. 1057-70.
141. Parekh, R.B., *Effects of glycosylation on protein function*. Current Biology, 1991. **1**: p. 750-754.
142. Han, R., et al., *Basal lamina strengthens cell membrane integrity via the laminin G domain-binding motif of alpha-dystroglycan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(31): p. 12573-9.
143. Nanci, A., S. Zalzal, and Y. Kogaya, *Cytochemical characterization of basement membranes in the enamel organ of the rat incisor*. Histochemistry, 1993. **99**: p. 321-331.
144. Orsini, G., S. Zalzal, and A. Nanci, *Localized infusion of tunicamycin in rat hemimandibles: alteration of the basal lamina associated with maturation stage ameloblasts*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2001. **49**(2): p. 165-176.
145. Kallistova, A., et al., *Enamel apatite crystallinity significantly contributes to mammalian dental adaptations*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 5544.
146. Fields, S., *High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril*. FEBS J, 2005. **272**(21): p. 5391-9.
147. Congreve, M., C.W. Murray, and T.L. Blundell, *Keynote review: Structural biology and drug discovery*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(13): p. 895-907.
148. Bellahcène, A., et al., *Small Intergrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs): Multifunctional proteins in cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(3): p. 212-226.
149. Shimizu, K. and H. Toh, *Interaction between intrinsically disordered proteins frequently occurs in a human protein-protein interaction network*. J Mol Biol, 2009. **392**(5): p. 1253-65.
150. Schroeder, H.E., *Biological structure of the normal and diseased periodontium - Preface*. Periodontology 2000, 1997. **13**: p. 7-7.
151. DeCarlo, A.A. and G.J. Harber, *Hemagglutinin activity and heterogeneity of related Porphyromonas gingivalis proteinases*. Oral Microbiology and Immunology, 1997. **12**: p. 47-56.

152. Sawada, K., et al., *Purification and Characterization of a Trypsin-Like Serine Proteinase from Rat Brain Slices that Degrades Laminin and Type IV Collagen and Stimulates Protease-Activated Receptor-2*. Journal of Neurochemistry, 1999. **74**: p. 1731-1738.
153. Emingil, G., et al., *Gingival crevicular fluid laminin-5 gamma2-chain levels in periodontal disease*. J Clin Periodontol, 2006. **33**(7): p. 462-8.
154. Noguchi, S., et al., *The histopathological comparison on the destruction of the periodontal tissue between normal junctional epithelium and long junctional epithelium*. J Periodontal Res, 2016.
155. Oshiro, W., et al., *Effects of CaCl₂ hydrothermal treatment of titanium implant surfaces on early epithelial sealing*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2015. **131**: p. 141-7.
156. Wang, P.L., et al., *Purification and characterization of a trypsin-like protease from the culture supernatant of Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4*. Eur J Oral Sci, 1999. **107**(147-153).
157. Xu, X., et al., *Differences in survival, virulence and biofilm formation between sialidase-deficient and W83 wild-type Porphyromonas gingivalis strains under stressful environmental conditions*. BMC Microbiol, 2017. **17**(1): p. 178.
158. Lasica, A.M., et al., *The Type IX Secretion System (T9SS): Highlights and Recent Insights into Its Structure and Function*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 215.
159. Veith, P.D., et al., *Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles exclusively contain outer membrane and periplasmic proteins and carry a cargo enriched with virulence factors*. J Proteome Res, 2014. **13**(5): p. 2420-32.
160. Casu, B., et al., *Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14907.
161. Olsen, I. and J. Potempa, *Strategies for the inhibition of gingipains for the potential treatment of periodontitis and associated systemic diseases*. J Oral Microbiol, 2014. **6**.