

Université de Montréal

2M11.2715.3

Mise au point d'un système in vivo pour l'inactivation localisée et sélective des protéines de la matrice extracellulaire des tissus calcifiés chez le rat

par

Duy-Dat Vu, D.M.D.

Département de stomatologie

Faculté de médecine dentaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Juillet 1998

© Duy-Dat Vu, 1998



Université de Montréal

W
4
058
1999
V.107

Université de Montréal

provision de la nature expérimentale des données recueillies dans le but
d'être au point de vue rigoureux de votre part l'interaction localisée et sélective des

par
Département de psychologie
L'année de recherche humaine

différents points de la Faculté ont été les responsables
en vue de l'obtention de ceux de la
réponse de chaque individu
en réponse individuelle

juillet 1999

à l'Université de Montréal



Université de Montréal

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Mise au point d'un système in vivo pour l'inactivation localisée et sélective des protéines de la matrice extracellulaire des tissus calcifiés chez le rat

présenté par:

Duy-Dat Vu, D.M.D.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Gilles Lavigne, président-rapporteur

Dr Antonio Nanci, directeur de recherche

Dr Charles E. Smith, membre du jury

Mémoire accepté le: 98-10-28

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Les tissus calcifiés se composent d'une phase minérale et d'une matrice organique constituée généralement de collagène et de protéines non-collagéniques. Les protéines non-collagéniques sont multifonctionnelles et auraient un rôle dans les interactions cellules-matrice, matrice-matrice et dans le contrôle de la déposition minérale. Afin de mieux définir la fonction de certaines protéines de la matrice extracellulaire (*e.g.* sialoprotéine de l'os, ostéopontine, protéines de l'émail), nous proposons de développer un système expérimental qui nous permettra d'interférer sélectivement avec ces protéines ou d'inactiver temporairement leur expression.

L'incisive inférieure du rat a été choisie pour les besoins de notre étude puisque cette dent montre beaucoup de ressemblance à la dent humaine en termes de formation et d'organisation en général; elle a été bien cartographiée et on y retrouve tous les stades de développement dentaire. Elle représente donc un excellent modèle pour l'étude du développement des tissus calcifiés. Les principaux buts du projet sont (1) de mettre au point une approche chirurgicale pour accéder et pouvoir manipuler l'organe dentaire de l'incisive, (2) de développer un système d'infusion pour l'administration localisée d'agents expérimentaux à cet organe et aux tissus avoisinants et (3) de valider l'effet local des agents. En utilisant une pièce à main dentaire, une fenêtre chirurgicale a été créée à travers l'os alvéolaire de la surface buccale du ramus mandibulaire de rats Wistar de 100g. Le site chirurgical se situe à environ 2mm du bord postérieur du ramus surjacent la région entre l'os alvéolaire et l'apex de la dent. C'est à cet endroit que les cellules souches épithéliales et mésenchymateuses sont situées et subissent la différenciation cellulaire pour donner naissance aux diverses cellules de l'organe dentaire. En plus, on retrouve à cet endroit un remodelage actif de l'os permettant la croissance postérieure de la dent. Ensuite, une minipompe osmotique d'Alzet™ a été raccordée à la fenêtre osseuse par un cathéter pour l'administration d'agents expérimentaux. L'utilisation de la minipompe nous permet d'administrer une variété d'agents sur une période de temps prédéterminée d'une façon continue et contrôlée. Pour valider notre approche, nous avons administré du sulfate de vinblastine (un médicament dont l'effet sur les améloblastes est connu), le

complexe féruine-or (un traceur artificiel en particule) et de l'albumine marquée au dinitrophénol (une molécule qui recircule naturellement). Les animaux sont ensuite sacrifiés et leurs hémimandibules traitées pour les études histologiques et immunocytochimiques.

Les résultats démontrent que les effets du médicament et la présence de traceurs sont limités à l'hémimandibule traitée et se retrouvent dans l'organe de l'émail, la pulpe ainsi que les tissus supportant l'organe dentaire. Les changements cellulaires typiquement associés à l'administration de la vinblastine ont été obtenus et les traceurs ont été localisés tant dans le milieu extracellulaire que dans le système endosomal/lysosomal des cellules. Basé sur ces résultats, nous pouvons proposer que cette nouvelle approche chirurgicale puisse servir comme un modèle *in vivo* très avantageux avec lequel divers agents chimiques, médicaments thérapeutiques ainsi que des sondes moléculaires pourraient être administrés pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des tissus calcifiés et leurs altérations dans des états pathologiques.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	i
IDENTIFICATION DU JURY	ii
SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	viii
DÉDICACE	x

CHAPITRE 1

INTRODUCTION	1
LES TISSUS CALCIFIÉS DENTAIRES	1
DYNAMIQUE DE L'INCISIVE DU RAT	1
ANATOMIE DE L'APEX DE L'INCISIVE DU RAT	2
DÉVELOPPEMENT DE LA DENT	6
PROTÉINES DE L'ÉMAIL	8
OBJECTIF GÉNÉRAL	10
ÉTUDES ANTÉRIEURES	10
OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	11
ORIGINALITÉ DE L'ÉTUDE	12

CHAPITRE 2

Article: In Vivo Model for the Experimental Manipulation of Calcified Tissues:
 New Surgical Approach for Accessing the Odontogenic Organ and

Associated Tissues of the Rat Incisor.

CHAPITRE 3

DISCUSSION	14
PRÉPARATION DE LA FENÊTRE OSSEUSE	14
INSTALLATION DE LA MINIPOMPE	17
ÉTUDES ANTÉRIEURES	23
OBJECTIFS ATTEINTS	24
BUT À LONG TERME	25

CHAPITRE 4

CONCLUSION	27
------------------	----

CHAPITRE 5

REMERCIEMENTS	28
---------------------	----

CHAPITRE 6

BIBLIOGRAPHIE	29
---------------------	----

LISTE DES FIGURES*À l'intérieur de l'introduction:*

1. Anatomie de la mandibule et de l'incisive inférieure du rat 3

*À l'intérieur de l'article**À l'intérieur de la discussion:*

15. Différentes positions de la fenêtre osseuse et leurs conséquences sur notre
approche 15
16. Description des 3 méthodes utilisées pour raccorder et stabiliser le cathéter
à la fenêtre osseuse 19

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

μg	microgramme
μl	microlitre
μm	micromètre
ALB-DNP	albumine marquée au dinitrophénol
Am	améloblaste
AMEL	amélogénine
BSP	sialoprotéine de l'os (bone sialoprotein)
CaCl_2	chlorure de calcium (calcium chloride)
Coll	collagène
D	dentine
DNP	dinitrophénol (dinitrophenol)
E	émail
EDTA	ethylenedinitrilo tetraacetic acid, disosium salt, dihydrate
EO	organe de l'émail (enamel organ)
g	gramme
hr	heure (hour)
IEF	<i>isoelectric focussing</i>
IgG	immunoglobuline G
K_2CO_3	carbonate de potassium (potassium carbonate)
kDa	kiloDalton
kV	kilovolt
L	gauche (left)
M	mole
M179	amélogénine de souris
mg	milligramme
ml	millilitre

mm	millimètre
mvb	corps multivésiculaire (multivesicular body)
N	noyau (nucleus)
NaCl	chlorure de sodium (sodium chloride)
nm	nanomètre
Ocl	ostéoclaste
Od	odontoblaste
OPN	ostéopontine (osteopontin)
P	pulpe
Pa	pascal
PBS	tampon de saline-phosphate (phosphate buffered saline)
PBS-oval	bloqueur ovalbumine dans du PBS
PT	tissu parodontal (periodontal tissue)
R	droit (right)
rER	réticulum endoplasmique rugueux (rough endoplasmic reticulum)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sg	granule de sécrétion (secretion granule)
°C	degré centigrade

À mes parents

子曰、學而不思則罔、思而不學則殆。

*To learn without thinking is labour in vain. To think
without learning is desolation.* CONFUCIUS

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

INTRODUCTION

LES TISSUS CALCIFIÉS DENTAIRES

L'émail, la dentine et le cément forment les trois tissus calcifiés de la dent. Cette dernière est supportée par un quatrième tissu calcifié, l'os alvéolaire. La formation de ces tissus résulte d'un processus complexe impliquant différentes activités cellulaires et interactions entre les diverses composantes organiques et inorganiques de leur matrice extracellulaire (Robey, 1996). Il existe donc un rapport intime entre la partie organique et la phase minérale inorganique imprégnées dans la matrice de ces tissus durs osseux et dentaires. Il est généralement accepté que des composantes organiques de la matrice extracellulaire de ces tissus calcifiés créent un environnement local et unique nécessaire à la nucléation des cristaux apatites (hydroxyapatite) de calcium phosphate et subséquentement à la régulation de leur croissance (Weiner, 1986; Hunter et al., 1996; Landis, 1995; Christoffersen et Landis, 1991). Ainsi, la précipitation et la régulation biologiques des ions calciums-phosphates dans ces tissus sont contrôlées par des événements cellulaires reliés à une séquence bien définie de l'expression, la sécrétion, l'accumulation et la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (Eanes, 1992; Robey, 1996; Triffitt et al., 1998; Gehron Robey, 1996; Freemont, 1993; Bosshardt et al., 1998; Goldberg et al., 1995; Butler, 1998; Linde et Goldberg, 1993; Robinson et al., 1998; Smith et Nanci, 1995; Nanci et Smith, 1992; Zeichner-David et al., 1995; Ritchie et al., 1998; Butler, 1995). De cette manière, les cellules formatives «blastiques» des tissus osseux et dentaires orchestrent la formation et la minéralisation d'une matrice extracellulaire pour créer un tissu fonctionnellement rigide.

DYNAMIQUE DE L'INCISIVE DU RAT

Le processus de formation en général de l'incisive inférieure du rat, en excluant l'aspect temporel, montre des ressemblances à celui de la dent humaine (Warshawsky et al., 1981) et cette incisive a été le centre d'intérêt de plusieurs recherches puisqu'elle représente un excellent modèle pour l'étude du développement des tissus dentaires (Leblond et Warshawsky, 1979). Le processus de formation de cette dent est bien caractérisé et bien documenté, cette dernière a donc été choisie pour les besoins de ce

mémoire. En effet, l'incisive de rat est couramment utilisée comme modèle pour l'étude de plusieurs événements cellulaires impliqués dans la formation des tissus dentaires, surtout l'amélogénèse à cause de son éruption continue et du fait que l'on retrouve dans une seule dent toutes les étapes de la formation de l'émail (Smith et Nanci, 1989; Smith et Warshawsky, 1975b; Leblond et Warshawsky, 1979; Nanci et Smith, 1992; Nanci et Warshawsky, 1984; Smith et Nanci, 1995; Watson, 1960; Fearnhead, 1960; Fearnhead, 1961; Kallenbach et al., 1963; Warshawsky, 1968; Warshawsky, 1971; Warshawsky, 1978; Warshawsky, 1979; Warshawsky et Smith, 1971; Warshawsky et Smith, 1974; Weinstock et Leblond, 1971; Kallenbach, 1973; Warshawsky et Vugman, 1977; Smith, 1979). Par ailleurs, l'éruption continue de la dent implique la participation active des tissus de support environnant, c'est-à-dire l'os alvéolaire et le ligament parodontal. Cette éruption constante, compensée par l'attrition perpétuelle de cette incisive, résulte non seulement en une production incessante de tissus dentaires (émail, dentine, ciment) à l'apex mais aussi un remodelage actif de l'os alvéolaire entourant l'apex (Marks et Schroeder, 1996). Ainsi, ce modèle d'étude offre aussi la possibilité d'étudier le remodelage osseux dans un microenvironnement bien délimité.

ANATOMIE DE L'APEX DE L'INCISIVE DU RAT

La majorité de l'incisive inférieure repose dans le corps de la mandibule du rat. Son organe dentaire reste dans une cavité biologique isolée mais très active (**figure 1**).

D'après Smith et Warshawsky (1975a), l'«organe dentaire» peut être morphologiquement divisé en trois parties distinctes: la partie bulbeuse, la partie en forme de U et la membrane d'Hertwig. La partie bulbeuse, localisée à la partie la plus apicale de l'incisive, est considérée comme la source de cellules souches où le renouvellement de l'épithélium de l'incisive se produit. En plus, selon Thesleff et Jernval (1997), cette structure serait le «*enamel knot*» à la partie apicale de la dent. Elle décrit cette partie de la dent comme le centre organisationnel actif où il y a production de plusieurs facteurs de croissance. La partie en forme de U est dérivée de la partie bulbeuse et délimite la pulpe en formant les parois latérale, mésiale et labiale autour du foramen apical. Cette partie est composée de tous les types de cellules épithéliales reconnaissables comme les cellules

Figure 1. Anatomie de la mandibule et de l'incisive inférieure du rat (modifiés de Nanci et al., 1989; Young, 1995).

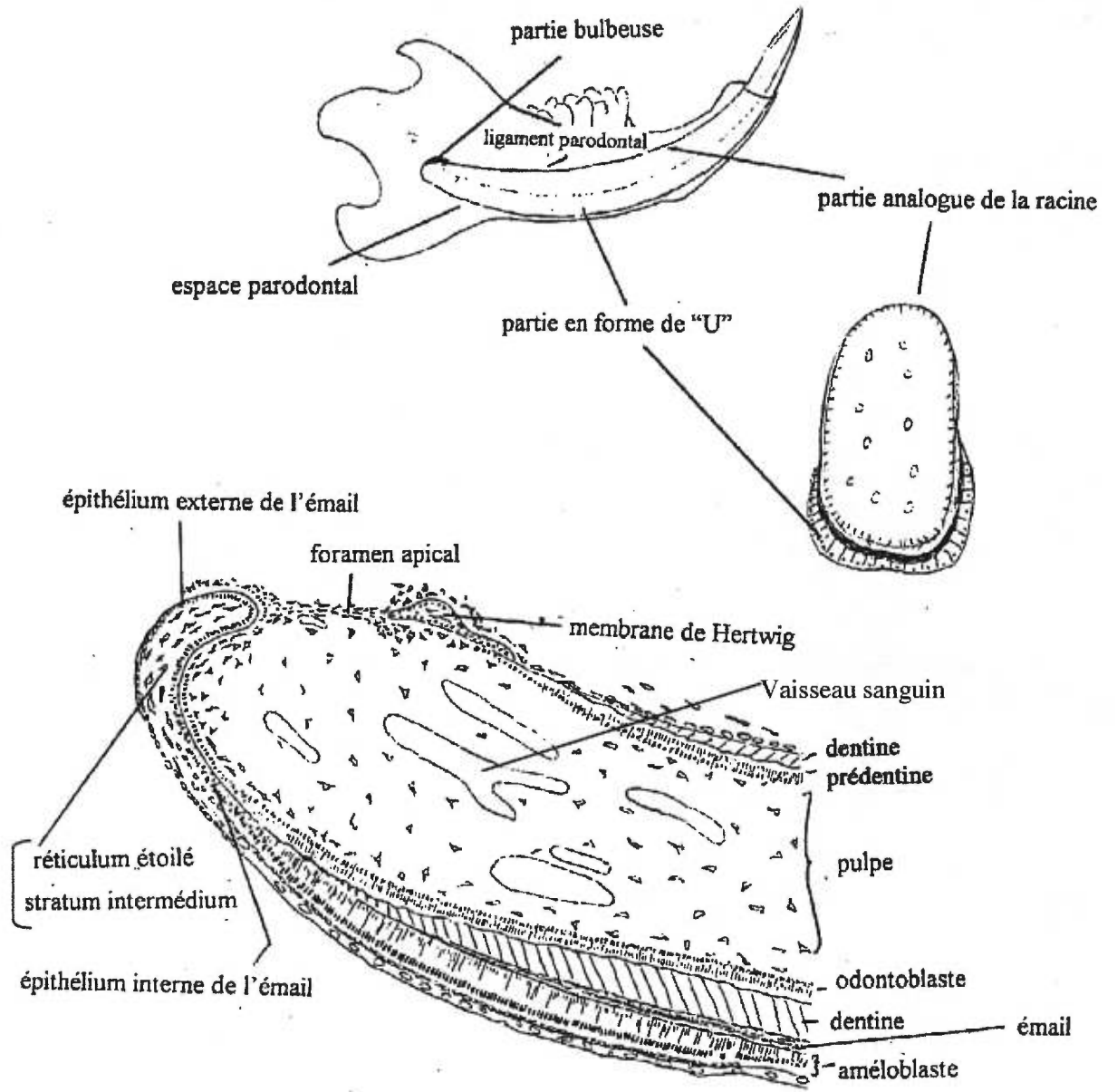


Figure 1

Illustration schématique non à l'échelle décrivant l'anatomie de la mandibule et de l'incisive inférieure du rat.

souches de l'organe de l'émail (épithélium externe de l'émail, le réticulum étoilé, le stratum intermédiaire et l'épithélium interne de l'émail) et de la membrane d'Hertwig, responsables de la différenciation des odontoblastes sur la partie analogue de la racine. Les odontoblastes sont dérivés de la papille dentaire localisée à l'apex vis-à-vis la partie bulbeuse.

Dans la mandibule, l'incisive du rat est séparée de l'os alvéolaire par une couche de tissu conjonctif appelée l'«*espace parodontal*» (Berkovitz et Shore, 1978a). À la surface linguale de cette dent, le tissu conjonctif de l'«*espace parodontal*» forme le ligament parodontal (Narayanan et Page, 1983). Par rapport à l'organe de l'émail situé à la surface labiale de l'incisive, l'«*espace parodontal*» contient un tissu conjonctif différent du ligament parodontal (Berkovitz et Shore, 1978a). L'apparence générale de ce tissu conjonctif adjacent à l'organe de l'émail est uniforme sur toute la longueur de la dent, seule l'épaisseur varie. Ainsi, cet espace parodontal est visiblement plus grand autour de l'apex de la dent (donc de l'organe dentaire) et diminue en épaisseur en se dirigeant occlusalement. Deux zones peuvent être distinguées dans ce tissu conjonctif en se basant sur la densité et la forme de ses fibroblastes: (1) la zone interne adjacente à l'organe de l'émail dans laquelle les cellules sont nombreuses et allongées dans les deux axes longitudinal et transverse de la dent, (2) la zone externe où les cellules sont plus rondes et dispersées (Berkovitz et Shore, 1978a).

Selon Berkovitz et Shore (1978a), la zone interne de l'espace parodontal contient plusieurs couches de fibroblastes allongés entre lesquelles des fibrilles de collagènes sont dispersées et orientées parallèlement à l'axe long de la dent. Les fibroblastes montrent de nombreuses organelles associées à la synthèse de protéine: rER, Golgi et mitochondries. Les cellules contiennent aussi des microtubules et des microfilaments. Elles sont en contacts les unes avec les autres par des desmosomes. Cette zone contient aussi un réseau extensif de capillaires. La zone externe du tissu conjonctif contient beaucoup moins de cellules et de collagènes mais plus de substance intercellulaire. Occasionnellement, on retrouve du collagène et des simples fibres nerveuses. Aucune fibre de collagène n'est insérée dans l'os alvéolaire. Les sinus veineux sont tellement

nombreux qu'ils occupent presque tout cet espace.

Comparativement au ligament parodontal, la concentration réduite, l'alignement et le manque d'insertion des fibres de collagène sont caractéristique de l'espace parodontal adjacent à l'organe de l'émail. Les fibroblastes des deux régions sont considérablement similaires morphologiquement. Par ailleurs, peu de fibres nerveuses myélinisées sont rencontrées dans la zone externe de l'espace parodontal par rapport au ligament parodontal où les fibres nerveuses sont abondantes (Berkovitz et Shore, 1978b). L'espace parodontal à la surface labial de l'incisive du rat a été considéré comme un coussin biologique, de nature hydraulique, protégeant l'organe dentaire des traumatismes (Kalnins et Berzins-Raimonds, 1949).

DÉVELOPPEMENT DE LA DENT

La formation dentaire résulte des interactions réciproques entre l'ectomésenchyme dérivé de la crête neurale et l'épithélium buccal formant l'organe dentaire, responsable de la production de tous les tissus de la dent (Ruch et al., 1995; Thesleff et al., 1996; Slavkin, 1990). En résumé, des cellules ectodermiques migrent de la crête neurale et se positionnent dans le mésenchyme le long de l'épithélium buccal aux sites des futures arcades dentaires. Ces cellules, dites ectomésenchymateuses, induisent la formation de la lame dentaire qui apparaît comme un épaississement continu de l'épithélium buccal qui s'invagine dans le mésenchyme. La lame dentaire indique la forme des futures arcades dentaires et elle prolifère formant ainsi les bourgeons des dents. Le mésenchyme se condense en relation à ces bourgeons et forme la papille qui induit l'organe de l'émail. À la suite de phénomènes inductifs réciproques, il en résulte la différenciation des améloblastes (d'origine épithéliale) et des odontoblastes (d'origine ectomésenchymateuse) suivie de la déposition des tissus durs de la dent.

On retrouve dans l'incisive inférieure du rat toutes les étapes de la formation dentaire des trois tissus dur de la dent, cependant, nous nous sommes intéressé particulièrement à l'amélogénèse. Toutes les étapes de cette dernière commencent à l'apex de la dent. Dans une section longitudinale à travers l'incisive, une couche continue

d'améloblastes peut être vue sur la surface labiale de la dent. Cette couche contient la séquence entière des stades développementaux dans la production de l'émail et a été morphologiquement et classé en 3 différents stades (Warshawsky et Smith, 1974; Leblond et Warshawsky, 1979; Smith et Nanci, 1989). Fonctionnellement, il a cependant été démontré que les améloblastes sont capables de produire des composantes matricielles dans les 3 stades (Nanci et Smith, 1992). Par rapport à cette classification, toute la longueur entière de l'organe de l'émail peut être divisée en: zone de présécrétion, zone de sécrétion et zone de maturation. Le renouvellement des populations de cellules de l'incisive du rat a été étudié avec la ^3H -thymidine (Smith et Warshawsky, 1975b). Il a été rapporté par radioautographie que la cohorte de cellules de chaque couche de l'organe de l'émail est dirigée incisivement avec l'éruption de cette dent (à un rythme de $27\mu\text{m}/\text{heure}$) et que toutes les cellules dans cette cohorte ont atteint la crevasse gingivale en même temps par rapport à leur position de départ.

En résumé, les améloblastes proviennent des cellules de l'épithélium interne de l'organe de l'émail ayant subi une induction permissive des cellules ectomésenchymateuses de la papille dentaire (Nanci et Smith, 1992). Cette induction permet à ces cellules l'initiation d'un processus sécrétoire qui aboutit éventuellement à la production de l'émail. Suite à leur différenciation, les améloblastes cessent de se diviser et changent de polarité cellulaire. Ce stade d'histodifférenciation est marqué par la migration de l'appareil de Golgi et des centrioles vers le pôle basal embryonnaire de la cellule. De plus, on observe la formation d'un complexe de jonction à ce site qui devient alors l'apex fonctionnel à partir duquel l'améloblaste effectue sa sécrétion extracellulaire. Tout juste avant le début de la sécrétion active des protéines de l'émail, la lame basale qui sépare les préodontoblastes des préaméloblastes (dérivés des cellules de la partie bulbeuse) disparaît (Nanci et Smith, 1992). Il a été démontré que les améloblastes phagocytent, du moins en partie, cette membrane basale. Cependant, il est à noter que quelques protéines de l'émail ont déjà été sécrétées au stade de «présécrétion» (Sawada et Nanci, 1995). Il a été proposé que ces protéines pourraient participer à la différenciation des cellules ectomésenchymateuses de la papille dentaire (préodontoblastes) en odontoblaste induisant ainsi la production active de dentine par ces derniers (Sawada et Nanci, 1995). Cette

formation dentinaire induirait à son tour la production de la matrice organique de l'émail, donc la sécrétion active des protéines de l'émail par les améloblastes. C'est à ce stade, appelé stade de sécrétion, que l'épaisseur complète de la couche d'émail est formée. Cette dernière comprendra une composante organique (protéines sécrétées par les améloblastes) et une phase inorganique sous forme de cristaux apatitiques. Suite au stade de sécrétion, l'améloblaste subit d'autres changements qui lui permettent de passer au stade de maturation. Au cours de la maturation, environ 50% des améloblastes meurent par apoptose et à la fin de la zone de maturation, les améloblastes deviennent plus petits de taille et une autre population de cellules meurent en desquamant dans la crevasse gingivale lors de l'éruption dentaire (Smith, 1998). Durant ce stade, les améloblastes débutent le processus de modulation au cours duquel on observe une alternance de l'apparence des cellules. La membrane au pôle apical de la cellule alterne entre une apparence lisse (20% du temps) et plissée (80% du temps) (Smith et Nanci, 1995). Cette alternance cyclique participe activement à la minéralisation complète de l'émail (croissance des cristaux) en créant un milieu favorable à la dégradation extracellulaire des protéines de l'émail. D'ailleurs, c'est à ce stade que les protéases cellulaires sont les plus actives dans la dégradation des amélogénines (Smith, 1998).

PROTÉINES DE L'ÉMAIL

Durant le développement de l'émail dentaire, les améloblastes sécrètent une matrice organique contenant deux grandes classes de protéines appelées amélogénines et non-amélogénines (Deutsch et al., 1995a; Robinson et al., 1995; Simmer et Fincham, 1995; Smith et Nanci, 1996; Nanci et al., 1996b; Eastoe, 1979; Deutsch, 1989; Nanci et Smith, 1992).

Les amélogénines constituent approximativement 90% de protéines de la matrice de l'émail et sont importantes pour la minéralisation de l'émail. Elles sont riches en proline, glutamine, leucine, histidine et sérine. Ces protéines sont basiques et hydrophobes avec un poids moléculaire variant entre 3 et 70 kDa. La synthèse de ce type de protéines débute dans la phase présécrétoire et augmente durant la phase de sécrétion jusqu'au point de représenter 90% du contenu organique de l'émail en formation.

Ensuite, les amélogénines sont dégradées par des enzymes spécifiques et/ou des protéases non spécifiques durant la phase de maturation des améloblastes (Smith, 1998). On ne connaît toujours pas si ces produits de dégradation jouent un rôle dans le processus de l'amélogénèse ou s'ils représentent simplement des intermédiaires de dégradation. Fonctionnellement, les amélogénines semblent intervenir dans la croissance en largeur et en épaisseur des cristaux de l'émail (Simmer et Fincham, 1995; Smith, 1998). Des études ont démontré que les amélogénines possèdent une action inhibitrice sur la croissance des cristaux d'émail, leur permettant de moduler la croissance en épaisseur de ces derniers (Robinson et al., 1998).

De leur côté, les non-amélogénines regroupent les énamélines, l'améloblastine, la tufteline et possiblement quelques autres protéines pas encore caractérisées (Fukae et al., 1996; Deutsch et al., 1995b; Krebsbach et al., 1996; Deutsch et al., 1991). Cette classe de protéines semble participer à la biominéralisation de l'émail en aidant la formation des cristaux d'hydroxyapatite, constituant principal de l'émail. Dans le cas de l'améloblastine, elle s'accumule préférentiellement au sites de croissance où elle joue un rôle dans l'élongation et la promotion des cristaux et est dégradée rapidement en plus petites molécules (Nanci et al., 1998). Il semblerait que le manque d'interaction entre les amélogénines intactes et quelques non-amélogénines puisse être le facteur clé menant à leur distribution différentielle au site de croissance et leur permettant d'exprimer différemment leurs activités. La dégradation rapide extracellulaire des non-amélogénines tel que l'améloblastine pourrait aussi contribuer à définir leurs activités en générant un nombre de fragments de protéines avec différentes propriétés fonctionnelles que la molécule parent (Nanci et al., 1998). Les non-amélogénines présentent un poids moléculaire variant entre 5 et 200 kDa. Elles seraient également phosphorylées, glycosylées et/ou sulfatées.

On retrouve également une glycoprotéine sulfatée parmi les non-amélogénines (Smith and Nanci, 1995; Smith et al., 1995). Cette protéine montre des similarités en poids moléculaire et avec le processus de dégradation rapide de l'améloblastine (Nanci et al., 1998).

OBJECTIF GÉNÉRAL

L'objectif général de notre étude a donc été de développer un modèle expérimental qui nous permettrait d'inactiver sélectivement et localement les activités cellulaires et/ou les protéines de la matrice extracellulaires impliqués dans la formation des tissus calcifiés en particulier l'émail, afin de mieux définir leurs rôles respectifs.

ÉTUDES ANTÉRIEURES

Un nombre limité d'études antérieures ont développé différents modèles expérimentaux *in vivo* visant à analyser le rôle des composants cellulaires et matriciels de l'organe de l'émail dans la formation de l'émail. Parmi ces modèles, on compte les expériences impliquant l'ostéotomie d'une partie du ramus de la mandibule du rat et les résections de racines (Redondo et al., 1995; Berkovitz et Thomas, 1969; Berkovitz, 1971a; Berkovitz, 1971b). On peut aussi mentionner les injections systémiques de traceurs tel que l'albumine marquée au DNP (Nanci et al., 1996a) et de produits chimiques tel que des enzymes inhibitrices (Nanci et al., 1984) ou le sulfate de vinblastine qui cause des altérations morphologique et fonctionnelle des améloblastes interférant ainsi avec la sécrétion de ces derniers (Moe et Mikkelsen, 1977; Nanci et al., 1987; Miake et al., 1982). Par ailleurs, étant donné que les injections systémiques sont souvent toxiques et morbides pour l'animal et qu'elles ont des effets non localisés et secondaires, d'autres modèles de microinjections ont été développés. Ces expériences consistaient principalement en la création d'une fenêtre osseuse sur la surface labiale de l'incisive à travers laquelle des traceurs ou des agents chimiques étaient injectés à l'aide de microséringue dans les tissus sous jacent, c'est-à-dire l'organe de l'émail au stade de sécrétion/maturation (McKee et Warshawsky, 1984; Eisenmann et al., 1989). Cependant, les manipulations chirurgicales impliquées dans cette technique de microinjection causent des dommages considérables à la couche de cellules situées en dessous de la fenêtre chirurgicale, altèrent ainsi les paramètres physiologiques en brisant l'intégrité de l'organe de l'émail, causaient une hypoplasie et requerraient d'attendre le déplacement des tissus non endommagés vers la fenêtre afin de pouvoir microinjecter les agents expérimentaux. Donc, ceci requiert une deuxième intervention chirurgicale. Par ailleurs, la quantité de produit injecté est limitée; la réinjection et l'effet obtenu ne sont pas uniformes.

D'autre part, en ce qui concerne les agents expérimentaux, très peu d'études *in vivo* et *in vitro* utilisant de nouveaux agents expérimentaux de thérapie génique tel que les ribosymes et les antisenses se retrouvent dans la littérature (Lyngstadaas et al., 1995; Slavkin, 1995). Des ribosymes synthétiques (pouvant interférer avec la production d'amélogénine) ont été introduites dans la mandibule de rat nouveau-né par des injections locales. Avec ceci, le produit majeur de translation des améloblastes durant le stage initial de la formation de l'émail a été réduit et la formation de l'émail résultant a été perturbée, démontrant le potentiel de ce produit. Cependant, cette technique d'injection locale n'est qu'une autre version d'injection systémique car l'injection se fait dans un muscle (et possiblement dans un vaisseau sanguin), ainsi infecter le reste de l'organisme. Pour ce qui est des antisenses pouvant inhiber l'expression de certains gènes, ces agents sont encore au stade d'étude *in vitro* (Lyngstadaas et al., 1995). En effet, l'application des stratégies d'inhibition par antisense pour étudier la fonction des signaux de transduction médiés par des facteurs de croissance durant les interactions épithéliomésenchymales semble très prometteuse (Slavkin, 1990).

OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Dans notre étude, notre principal objectif a été de développer un modèle expérimental nous permettant d'accéder à tous les tissus cibles de l'organe dentaire (surtout l'émail, mais aussi la dentine et le cément). En plus, ce modèle ne doit pas endommager les tissus cibles mécaniquement. D'autre part, contrairement aux injections systémiques et aux microinjections, notre modèle doit permettre un ciblage local et spécifique de l'organe dentaire et une distribution continue et constante de l'agent expérimental utilisé sur une période de temps prédéterminée.

Ainsi, une technique utilisant une fraise dentaire montée sur un tour lent a été utilisée pour créer la fenêtre chirurgicale dans l'os alvéolaire au niveau de l'apex du rat où l'espace parodontal est plus large agissant comme un coussin biologique contre les dommages possible causés par la fraise. La fenêtre chirurgicale va permettre l'exposition de l'organe de l'émail situé à l'apex de l'organe dentaire à une variété d'agents expérimentaux introduits par une minipompe osmotique. Cette fenêtre nous permet aussi

d'accéder à toutes les autres cellules impliquées dans la formation et le soutien de la dent: les odontoblastes par l'ouverture apicale, les cémentoblastes et les cellules osseuses par les tissus parodontaux. L'avantage principal de ces minipompes est l'introduction continue à un rythme régulier d'un agent expérimental sur une période de temps prédéterminée. Ceci nous permet d'introduire une plus grande quantité de produit sans avoir à rouvrir chirurgicalement l'animal et à le réinjecter.

Afin de valider le modèle proposé, nous avons voulu administré un médicament, une molécule capable de se recirculer naturellement et un traceur particulé. Ainsi, la fétuine-or et l'albumine marquée au DNP sont utilisés comme traceurs introduits dans la fenêtre osseuse via la minipompe. Les études d'injection systémique d'albumine marquée au DNP ont déjà été réalisées par (Nanci et al., 1996a). La distribution de ce traceur a donc été documentée et sera comparée aux résultats de notre étude. Par ailleurs, l'effet du sulfate de vinblastine sur les améloblaste sera aussi étudié avec notre approche expérimentale avec la minipompe. Le sulfate de vinblastine est un agent antimicrotubulaire (Dustin, 1978) et son effet sur les améloblastes est très bien connu et documenté (McKee et Warshawsky, 1984; Miake et al., 1982; Nanci et al., 1987; Moe et Mikkelsen, 1977; Nanci et Warshawsky, 1984). Plusieurs expériences avec des injections systémiques ou avec des techniques de microinjections de vinblastine dans le rat ont démontré son potentiel perturbant sur l'activité sécrétoire de l'améloblaste. Parmi ces effets, on peut mentionner la fragmentation de l'appareil de Golgi, l'accumulation de granules de sécrétion à travers l'améloblaste; une altération de la matrice organique de l'émail.

ORIGINALITÉ DE L'ÉTUDE

Comme mentionné précédemment, peu de tentatives de manipulation expérimentale de l'organe de l'émail ont été réalisées dans le but de mieux comprendre le fonctionnement et le rôle de ses composants. Cependant, toutes ces tentatives comportent des difficultés d'effets secondaires non localisés (pour les injections systémiques), de manipulation, d'accès, de traumatismes, etc. (pour les microinjections). En plus, il n'existe pas de système fiable de culture cellulaire d'améloblastes. Notre étude

a donc été entreprise dans le but d'élaborer un modèle chirurgical faisable et reproductible d'accéder une région de l'organe dentaire situé à l'apex de l'incisive inférieur de rat à travers l'os alvéolaire et d'y introduire différents agents pour mieux comprendre le rôle des composants de cet organe. Notre modèle ne cause donc aucun dommage ou très peu à l'organe dentaire sous jacent, permet un effet local et sélectif de tout produit administré, permet aussi l'administration de divers agents toxiques et nous ouvre une porte à des approches de thérapie génique *in vivo*.

CHAPITRE 2
ARTICLE SCIENTIFIQUE

JHCLE

Vivo Model for the Experimental Manipulation of Calcified Tissues: A Surgical Approach for Accessing the Odontogenic Organ and Associated Tissues of the Rat Incisor

D. Vu, N.G. Daniel, and A. Nanci

Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada

MARY The tooth organ is extensively used in developmental biology to investigate ontogeny and cell differentiation. It also represents an advantageous system for the study of the various cellular and extracellular matrix events that regulate the formation of both collagenous and noncollagenous calcified tissues. This article describes an in vivo surgical approach to access and experimentally manipulate the tooth organ and supporting tissues of the rat incisor. By use of a dental drill, a "window" was created through the alveolar bone on the buccal aspect of the hemimandible at the apical end of the incisor. It is at this site that epithelial and mesenchymal precursors are situated and undergo cellular differentiation to give rise to cells of the odontogenic organ. Active bone remodeling is also observed in this area to accommodate posterior growth of the tooth. An osmotic minipump connected to the bony window through an outlet catheter was used for controlled continuous administration of experimental agents over a predetermined period of 4 weeks. To validate the model, vinblastine sulfate, fetuin-gold, and dinitrophenylated albumin were thus infused. The animals were then sacrificed and the hemimandibles were prepared for histological and immunocytochemical analyses. The effects of the drug and the localization of tracers were restricted to the treated hemimandible and were found in the odontogenic organ and pulp, as well as in the tooth supporting tissues. Cellular changes typically associated with the administration of vinblastine were obtained, and tracers were localized both in the extracellular milieu and within the endosomal/lysosomal elements of cells. These results suggest that this new surgical approach could serve as an advantageous in vivo model in which various chemical agents, therapeutic drugs, molecular probes are administered to study the molecular events that regulate calcified tissue formation.

(*J Histochem Cytochem* 47:323–336, 1999)

KEY WORDS

osmotic minipump
experimental manipulation
tracers
vinblastine sulfate
calcified tissues
odontogenic organ
incisor
rat

TOOTH DEVELOPMENT is mediated by reciprocal inductive interactions between neural crest-derived ectomesenchyme cells and the oral epithelium (reviewed in Nanci 1990; Ruch et al. 1995; Thesleff et al. 1996). Cells of epithelial origin differentiate into ameloblasts which synthesize and secrete the noncollagenous matrix of enamel, and ectomesenchymal cells give rise to odontoblasts, which produce the collagen-containing

dentin matrix. Epithelial and/or ectomesenchymal cells may also differentiate into cementoblasts, which deposit cementum, a tissue that comprises both noncollagenous and collagenous proteins (reviewed in Bosshardt and Nanci 1998). Furthermore, the eruption and growth of the tooth involve the participation of surrounding/supporting bone and periodontal tissues. More specifically, alveolar bone remodeling occurs around the apical portion of the rat incisor, allowing posterior growth of the tooth (Marks and Schroeder 1996). Formation and mineralization of all the above calcified tissues results from a tightly regulated series of cellular events and interactions between the organic and inorganic phases of the extracellular matrix (reviewed in

Correspondence to: Dr. Antonio Nanci, Lab. for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7.
Received for publication August 19, 1998; accepted October 13, 1998 (8A4758).

re precursor cells located at the apical end of the h, where inductive molecular events take place, were therefore restricted to specific developmental es of the enamel organ. Most importantly, because amel forms in a secluded environment regulated and retained, at least in part, by ameloblasts, any interion in the integrity of the enamel organ inevitably s to an alteration in the physiological parameters amel.

1 this study we investigated whether the rat mandular incisor could be exploited as an experimental el for local and selective targeting of the odontoc organ and its associated periodontal tissues. A ical technique was developed to create a “win-” in the alveolar bone overlying the apex of the ncisor, and an osmotic minipump was utilized to ver specific experimental agents. Vinblastine sul-and two tracer molecules, fetuin-gold and albu-tagged with dinitrophenol, were utilized to vali-the efficiency of the surgical approach in targeting

cells of the tooth organ. Minipumps have previously been used in dogs to deliver bafilomycin A₁, an inhibitor of vacuolar H⁺-ATPases in osteoclasts, to block alveolar bone resorption and tooth eruption (Sundquist and Marks 1994; Marks and Sundquist 1995). They are advantageous compared to microinjection because they can deliver, in a controlled and continuous manner, relatively large amounts of experimental agents through a bony window. This *in vivo* experimental model may prove advantageous for future experiments in which various drugs and molecular probes are applied to elucidate the cellular and biochemical events that regulate calcified tissue formation.

Materials and Methods

Surgical Procedure

Male Wistar rats weighing 100 ± 10 g (Charles River Canada; St-Constant, QC, Canada) were anesthetized with an IP injection of 0.06 ml Somnotol (sodium pentobarbital; MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada). The vestibular

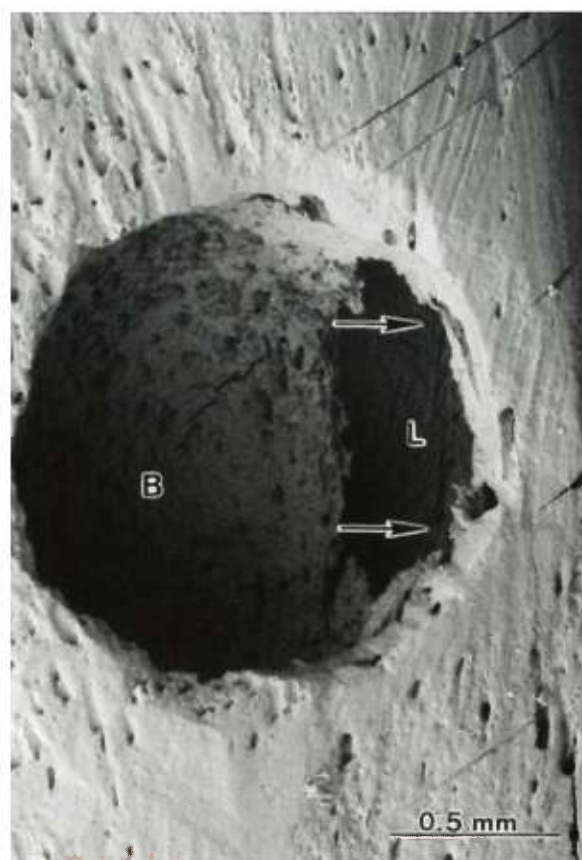


Figure 2 Scanning electron microscopic image of the hole drilled through the mandibular bone. The hemimandible was fixed, dried with sodium hypochlorite, and examined in the humid state with a variable pressure instrument. The buccal (B) wall of the mandible is partially removed, revealing the opposing lingual wall. Material infused into the hole diffuses along the perialveolar space towards (arrows) the apical end of the incisor.

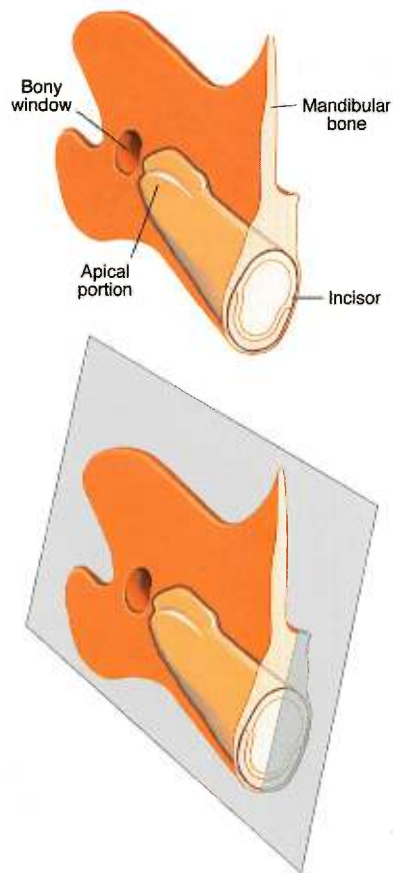


Figure 3 Schematic illustrations of the posterior aspect of the hemimandible showing the relationship of the apical end of the incisor to the bony window (top) and the plane of section, passing along the longitudinal axis of the tooth and across the window (bottom), used to obtain Figures 4 and 5.

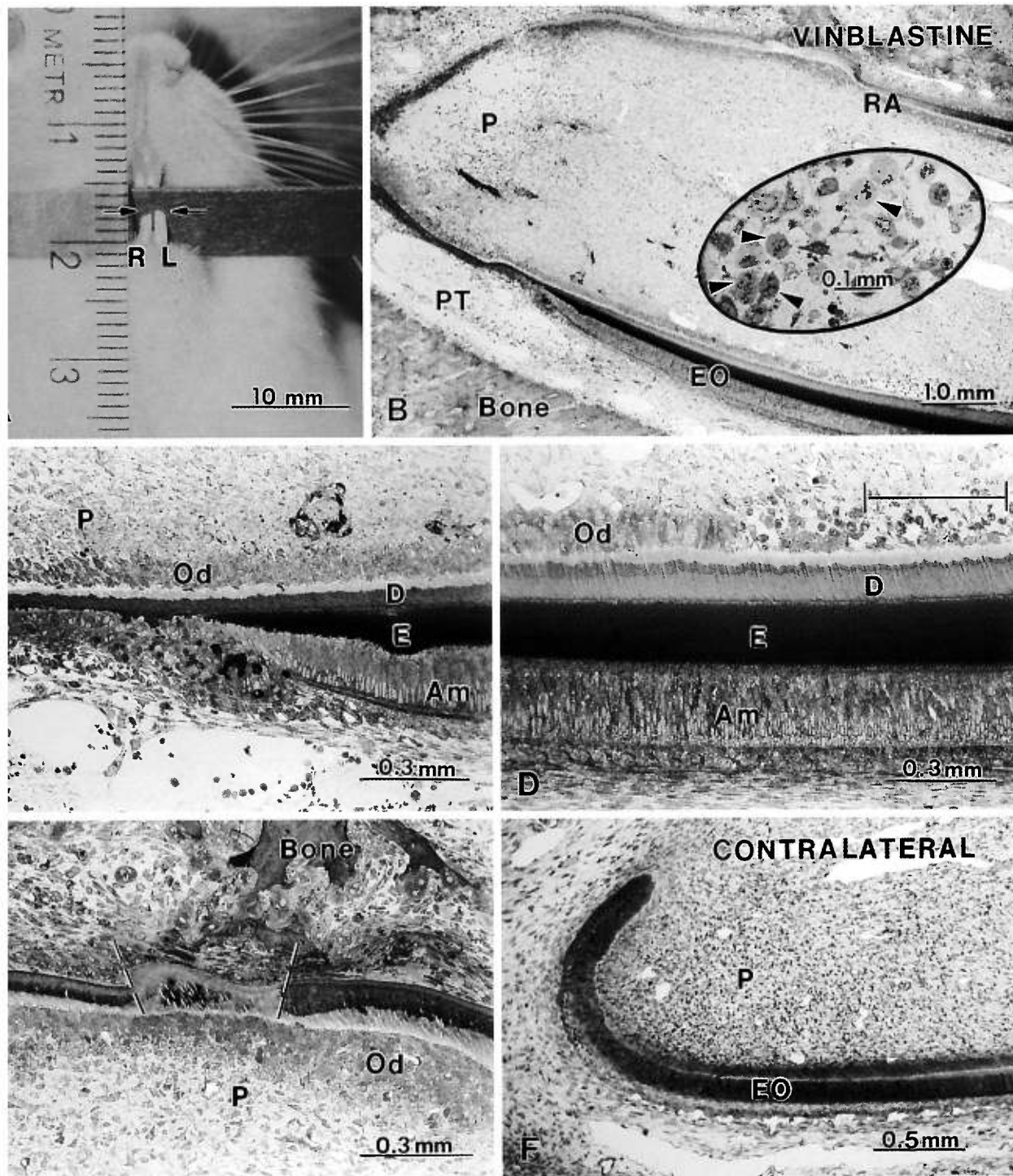


Figure 5 Micrographs illustrating the alterations induced by infusion of vinblastine sulfate for 3 days. (A) The incisor on the treated side (R) is shorter than the contralateral (L) tooth. (B) The drug has diffused throughout the tooth, affecting the enamel organ (EO), the pulp (P), the root analogue surface (RA). (Inset) Many mitotic figures (arrowheads) are present in the pulp. (C) The organization of the enamel (E) and the production of enamel matrix (E) by ameloblasts (Am) are affected in the early part of amelogenesis (compare C and D). (D) Odontoblasts that differentiated before administration of the drug show a normal organization. However, groups of odontoblasts (Od) appear to have degenerated (bracket). (E) A focal alteration of dentin (D) production and mineralization (dashed lines) is sometimes observed on the root analogue surface. (F) No structural changes were observed on the contralateral tooth. PT, periodontal tissue.

ed in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 0.05% H_2O_2 , pH 7.3, and decalcified in 4.13% EDTA for 14 days (solution was changed every 2 days) (Warshawsky and Ore 1967). The hemimandibles were subdivided into segments and washed again in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Some of the segments were postfixated with 2% potassium ferri-ferrocyanide-reduced osmium tetroxide for 2 hr at 4°C (Neiss and Ore 1967). All segments (osmicated and nonosmicated) were dehydrated in a graded alcohol series and embedded in LR White resin (Marivac) or dehydrated in a graded acetone series and embedded in Taab epoxy resin (Marivac). Liver, spleen, lung, kidney, and parotid gland were also harvested and processed for embedding in LR White or epoxy resin. Each tooth segment was oriented for sectioning along its longitudinal axis (see schematic illustration in Fig. 3). One-thick sections were cut with glass knives on a Reichert-Ultracut E ultramicrotome and stained with toluidine blue. Thin sections were cut with a diamond knife and mounted on 200-mesh nickel grids having a carbon-coated copper support film. Selected sections were processed for postembedding colloidal gold immunocytochemistry (reviewed in Bendayan 1995) for detection of enamel proteins (amelogenin; Nanci et al. 1996b) or DNP-tagged albumin, whereas silver-gold was directly observed. All grids were stained with uranyl acetate and lead citrate for examination in a

JEOL JEM-1200EX-II transmission electron microscope operated at 60 kV.

Immunolocalization of Dinitrophenol-tagged Albumin and Amelogenin

Sections from osmicated samples were first treated with sodium metaperiodate (Bendayan and Zollinger 1983) for 30 min (LR White) or 1 hour (epoxy resin) and rinsed with distilled water. All sections were floated for 15 min onto a drop of 0.01 M PBS containing 1% ovalbumin (Oval). They were transferred onto a drop of rabbit anti-DNP antibody diluted 1:150 (Dako; Carpinteria, CA) or recombinant M179 mouse amelogenin antibody diluted 1:300 for 1 hr, washed with PBS, and refloat on PBS-Oval for 15 min. Antibody binding sites were then revealed by incubating the tissue sections with protein A-gold complex for 30 min. The protein A-gold was prepared as described by Bendayan (1995) using colloidal gold particles of 8 or 14 nm (Frens 1973). For detection of enamel proteins, a chicken egg yolk antibody to rat 24-kD amelogenin was also used, as previously described (Nanci et al. 1996b). Briefly, the sections were floated on a drop of a blocking solution [0.5% BSA (Sigma), 0.1% gelatin (Merck; Darmstadt, Germany), 0.005% Tween-20 (Bio-Rad; Richmond, CA) and 0.5 M NaCl (BDH; Poole, UK)]

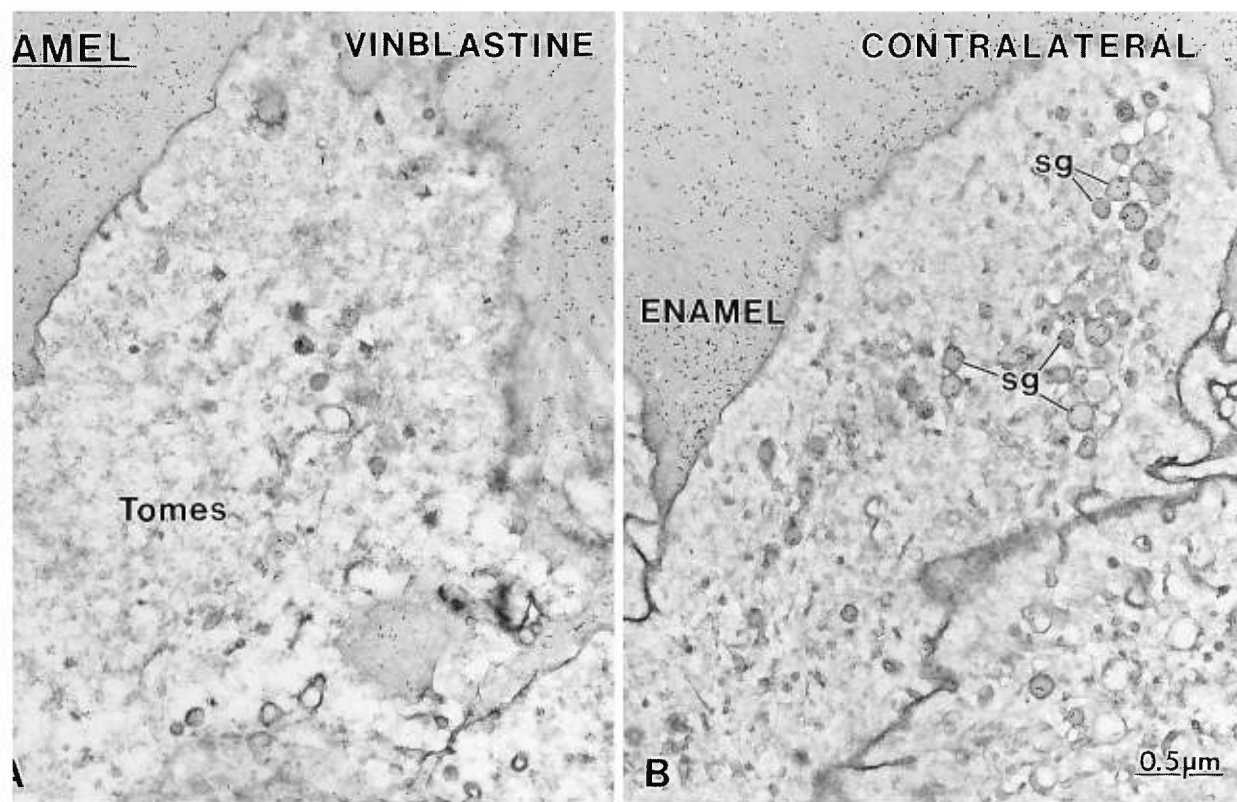


Figure 7 Comparative immunocytochemical preparations with anti-amelogenin (AMEL) antibody, showing the apical portion of secretory ameloblasts from (A) the vinblastine-treated and (B) the untreated contralateral incisor. As expected, vinblastine results in the loss of secretory granules (sg) from Tome's processes (Tomes) only on the treated side, demonstrating the localized action obtained by infusing vinblastine through the bony window. Secretory granules and the enamel matrix are immunoreactive for amelogenin.

by tissue debris and blood clotting. The reference points allowed proper positioning of the bony window and no damage to the enamel organ (Figures 2, 3, and B) in eight of 10 animals used to validate the surgical procedure before the present drug and tracer study. Inaccurate anterior positioning resulted either in compression by bone debris (Figures 4C and 4D) or in destruction (Figure 4E) of the enamel organ, or complete perforation of the thin alveolar bony window occurred posteriorly. Inflammatory cells infiltrated the damaged enamel organ and a cementum-like substance was deposited in the forming extracellular matrix (Figure 4E, inset) (Bosshardt and Nanci 1988). Surprisingly, the enamel organ surrounding the site of tissue damage appeared to develop normally.

Morphological Alterations Induced by Vinblastine Sulfate

Continuous exposure of the dental organ to vinblastine sulfate for 3 days affected tooth eruption such

that the treated incisor was about 1 mm shorter than the contralateral tooth (Figure 5A). It is noteworthy that none of the rats used in initial studies aimed at validating the surgical procedure (no minipumps placed), as well as those used for tracer studies, showed a difference in length between the treated and the contralateral untreated incisor. Cell organization and function were also altered (Figures 5B–5E). The Golgi apparatus of secretory stage ameloblasts was fragmented, clusters of secretory granules were found throughout the cell body (Figure 6A), and endosomal/lysosomal elements were abundant (Figure 6B). These cell compartments were all immunoreactive for amelogenin (Figure 6). Tomes' processes showed very few or no secretion granules (Figure 7). These were abundant and intensely immunoreactive for amelogenin in contralateral incisor ameloblasts (Figure 7B). The organization and shape of early secretory stage ameloblasts were disrupted and there was ectopic release of enamel proteins along their basolateral surfaces (Figure 6A). Groups of odontoblasts showed signs of degeneration, even though the

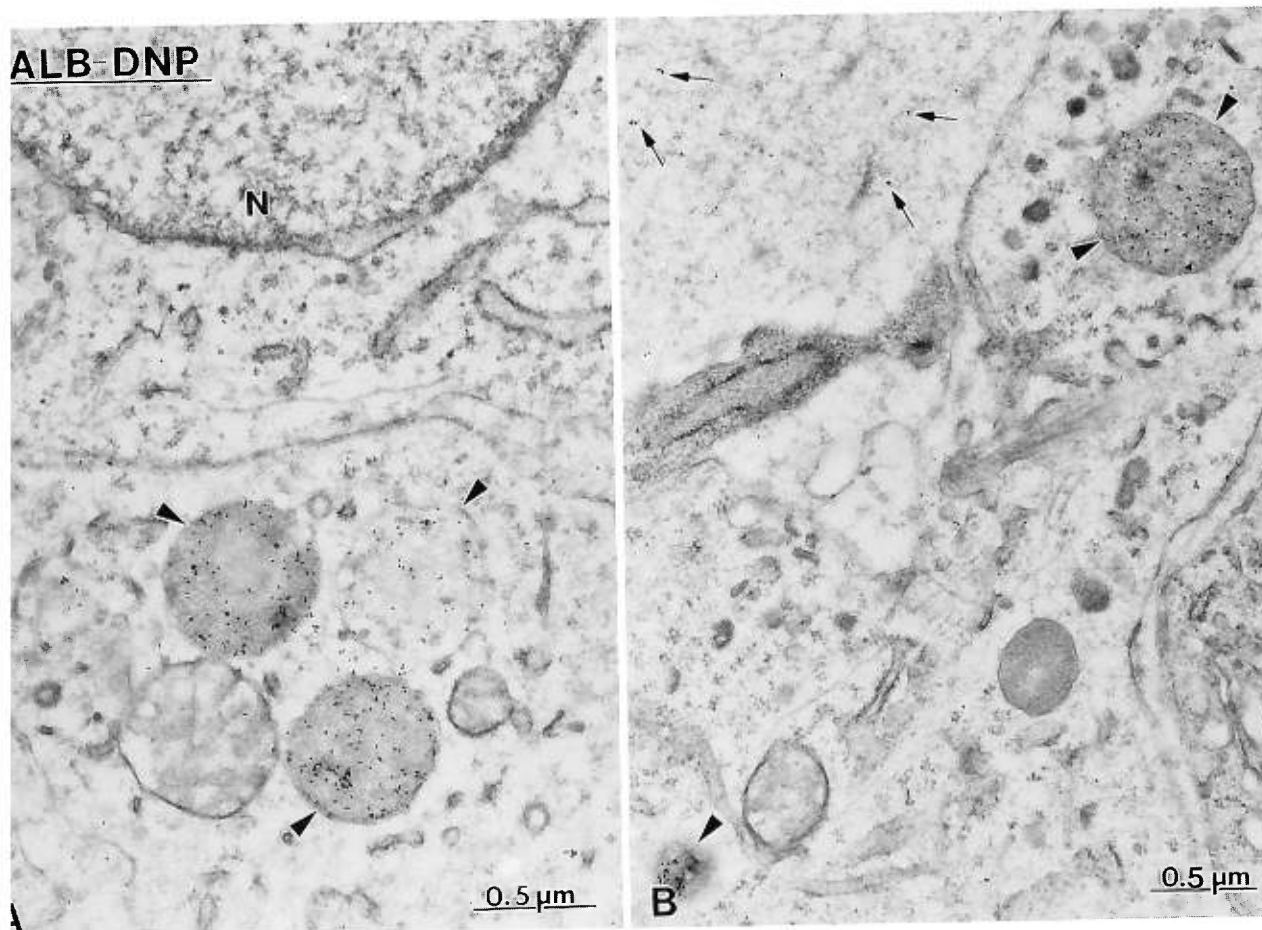


Figure 9 Some of the infused albumin–dinitrophenol (ALB–DNP) tracer diffuses through the apical foramen of the incisor into the pulp chamber, where it is taken up into endosomal/lysosomal elements (arrowheads) of (A) odontoblasts and (B) resident mesenchymal cells. Some tracer is also immunodetected extracellularly (arrows) among the pulp cells. N, nucleus.

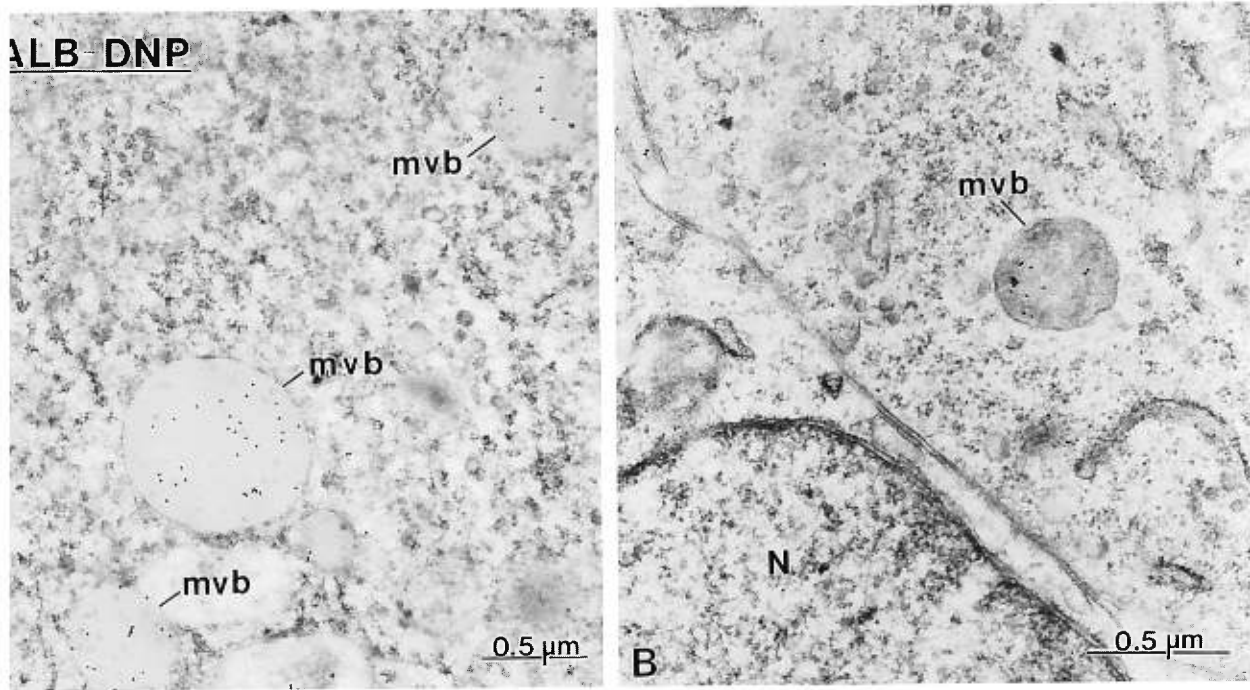


Figure 11 (A,B) Immunocytochemical preparations illustrating the presence of albumin-dinitrophenol (ALB-DNP) tracer in multivesicular bodies (mvb) of early secretory stage ameloblasts. Because these cells are separated from the pulp by mineralized layers of dentin and enamel, the endocytosed molecules must have diffused through the multiple cell layers of the enamel organ in order to reach the ameloblasts. (A) Nonosmicated; (B) osmicated. N, nucleus.

to reach to experimentally access and manipulate the odontogenic organ of the rat incisor and its associated periodontal tissues. This tooth was chosen because it offers the possibility to investigate developmental processes and the deposition of both collagenous and noncollagenous mineralized matrices in a well-defined porospacial sequence. An osmotic minipump, connected to a bony window in the alveolar bone overlying the apical end of the tooth, allowed controlled and continuous administration of experimental agents to the tooth organ and its surrounding tissues.

To avoid complications associated with previous experimental approaches for accessing the tooth organ (see Introduction), we positioned our surgical access on the buccal side of the alveolar bone, overlying the periodontal tissue just posterior to the apical end of the mandibular incisor. This site allows access to both the tooth organ and a zone of active bone remodeling along the posterior wall of the hemimandible. From this site, the experimental agents can diffuse to the enamel organ and its adjacent structures via the periodontal space separating the alveolar bone and the tooth. Damage to the odontogenic organ was observed in very few cases of operated animals and was, in general, due to anatomic variability. Most of the damage was confined to the apical end of the tooth and did not appear to significantly alter tooth forma-

tion and/or eruption. Damage to the enamel organ in some cases resulted in the production of a matrix resembling that found at the enamel-free area on the cusp tips of rodent molars, an observation relevant to the proposed epitheliomesenchymal transformation of enamel organ cells during odontogenesis (Bosshardt and Nanci 1998).

In contrast to systemic injection or local microinjection, with minipumps it is possible to deliver relatively large volumes of an experimental agent over a precise period of time. Vinblastine sulfate was infused over a 3-day period to obtain local tissue alterations without any systemic effects. The changes obtained in the enamel organ are consistent with previously published data using local or systemic injection of vinblastine (Moe and Mikkelsen 1977; Miake et al. 1982; McKee and Warshawsky 1984; Nanci and Warshawsky 1984; Nanci et al. 1987). In addition, alterations induced in the pulp, dentin, cementum, and periodontal tissue indicate that the drug diffuses locally and demonstrate the efficacy of our approach in targeting all the tissues of the tooth organ. Most importantly, the contralateral untreated tooth and distant tissues, such as duodenum, showed no sign of being affected by the drug, thereby confirming that restricted and localized effects can be obtained. Indeed, the treated incisor was ~1 mm shorter than the contralateral tooth, an amount

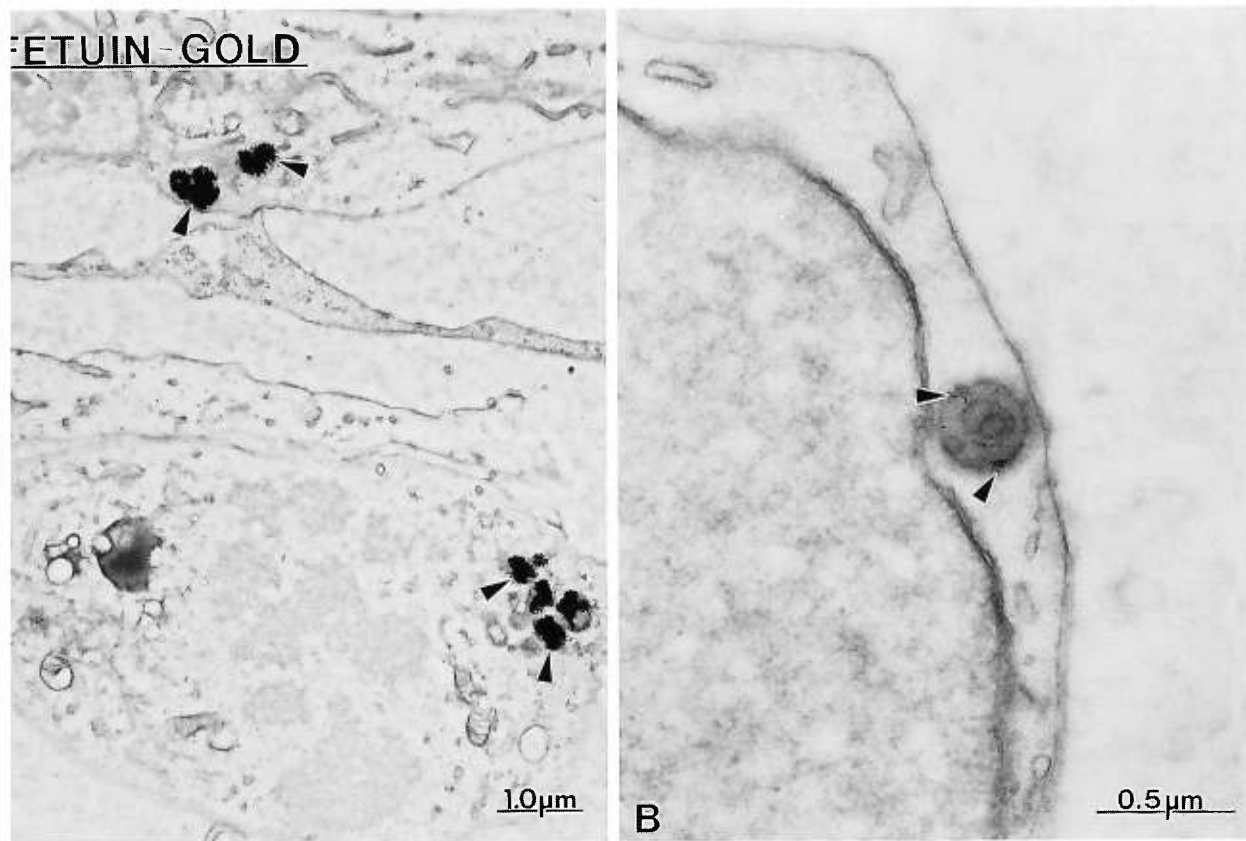


Figure 13 Despite their relatively large size, fetuin-gold complexes can be found (A) along the enamel organ and (B) in the pulp, where they are endocytosed and directed to endosomal/lysosomal elements (arrowheads) of connective tissue cells.

ents, the complex cellular and extracellular matrix components involved in the formation of both collagenous and noncollagenous calcified tissues. The ability to interfere with the genes responsible for the production of target proteins of the odontogenic organ and associated tissues may help advance our understanding of enamel formation and pathological alterations. Application of molecular probes through the enamel window offers the possibility to activate/inactivate gene products locally and selectively for studies of enamel formation. Such an approach is potentially less time consuming and costly than the genetic engineering of knockout or transgenic animals, and may be particularly valuable in cases where genetic alterations result in a lethal phenotype. Enamel molecular probes have already been used in vitro (anti-sense; Slavkin 1995) and in vivo by gross local injection (ribozymes; Lynglaas et al. 1995) but these have not yet been extensively tested, in part due to their toxicity or general effects when injected systemically.

Acknowledgments

Supported by a grant from the Medical Research Council of Canada to AN. We are grateful to M. Fortin for excellent

technical assistance, Dr L. Ghitescu for preparing and donating the dinitrophenylated albumin, and Nissei Sangyo Canada for use of the variable-pressure scanning electron microscope.

Literature Cited

- Alberts B, Lewis J, Roberts K, Bray D, Raff M, Watson JD (1994) Vesicular traffic in the secretory and endocytic pathway. In Alberts B, Lewis J, Roberts K, Bray D, Raff M, Watson JD, eds. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland, 600-651
- Bendayan M (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-163
- Bendayan M, Zollinger M (1983) Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem* 31:101-109
- Berkovitz BKB (1971a) The effect of root transection and partial root resection on the unimpeded eruption rate of the rat incisor. *Arch Oral Biol* 16:1033-1043
- Berkovitz BKB (1971b) The healing process in the incisor tooth socket of the rat following root resection and exfoliation. *Arch Oral Biol* 16:1045-1054
- Berkovitz BKB, Thomas NR (1969) Unimpeded eruption in the root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. *Arch Oral Biol* 14:771-780
- Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A (1998) Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 250:1-21

CHAPITRE 3
DISCUSSION

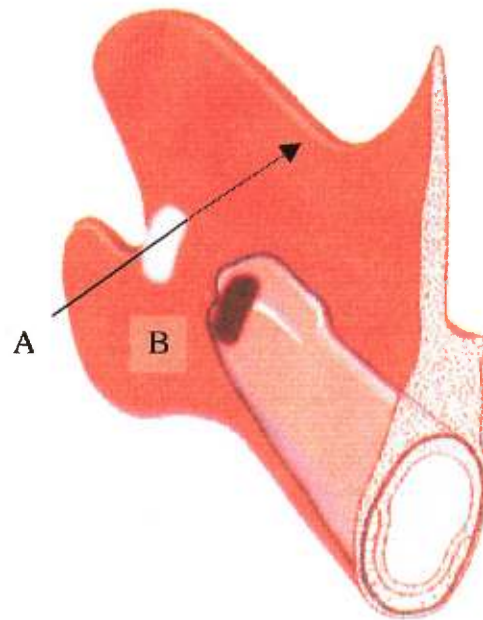
DISCUSSION

PRÉPARATION DE LA FENÊTRE OSSEUSE

Nous avons proposé de cibler l'apex de l'incisive inférieure du rat car nous savons que l'organe dentaire de cette dent est situé à cet endroit précis et que cette structure est entourée par un espace parodontal relativement large. Au début de notre étude, nous avons entrepris plusieurs expériences pilotes de fraisage sans mettre la minipompe dans le but d'établir la position optimale pour la préparation de la fenêtre osseuse. Nous avons déterminé qu'une fois la surface osseuse du ramus proprement exposée, deux points de repère très important doivent être localisés. Ces points sont le rebord postérieur du ramus et l'élévation osseuse correspondant à l'apex de l'incisive. La position exacte où la fenêtre osseuse doit être située est à environ 2mm du rebord postérieur du ramus et légèrement supérieure à l'élévation osseuse. Ces expériences nous ont démontré que très peu de dommage à l'organe dentaire sous jacent a lieu lors du fraisage de l'os alvéolaire au niveau de l'apex de l'incisive inférieure du rat lorsque les points de repères sont respectés. Les coupes histologiques confirment effectivement que l'organe dentaire est très bien protégé par un espace parodontal relativement plus large comparativement à d'autre endroit de la dent. Histologiquement entre 24 heures et 72 heures, le site de fraisage consistait en une fenêtre osseuse remplie partiellement d'un caillot sanguin, de débris d'os et des cellules inflammatoires. La réparation ainsi que le remodelage actifs de l'os étaient indiqués par le processus normal de guérison (McKee et Nanci, 1996; Johnson, 1962; Huebsch et al, 1952; Frandsen et Becks, 1962; Pietrokovski et Massler, 1967; Todo, 1968; Green, Gong, Neiders, 1969).

L'emplacement de la fenêtre osseuse est donc très important puisque si on fraise un peu trop antérieur à l'élévation osseuse/apex de la dent, l'organe dentaire sous jacent serait inévitablement endommagé. Postérieur, l'os alvéolaire est très mince et fraiser à cet endroit va perforer le ramus et tout produit administré serait diffusé systématiquement (**figure 15**). Dans quelques cas (moins que 10% du temps), l'organe dentaire a été touché et endommagé par le fraisage dû à la variabilité anatomique de chaque animal. Dans ces circonstances, l'organe de l'émail était comprimé et quelques fois interrompu. Quelques

Figure 15. Différentes positions de la fenêtre osseuse et leurs conséquences sur notre approche.



A : une fenêtre trop postérieure au site proposé ira percer le ramus

B : une fenêtre trop antérieure au site proposé va endommager l'organe dentaire

Figure 15

cellules inflammatoires ont été observées entre les cellules de l'organe de l'émail. Des sécrétions ectopiques de substances ressemblant au ciment sont notées à certains sites. Par conséquent, la formation normale de l'émail à cet endroit endommagé a été perturbée. Des analyses histologiques ont cependant révélé que les dommages étaient focaux et affectaient seulement la portion touchée de l'organe dentaire par la fraise. Avec le temps, les tissus endommagés ont migré incisivement du site chirurgical grâce à l'éruption continue de la dent. Ainsi, l'organe de l'émail apical et autour du tissu blessé semble se développer normalement. Donc, la dent est une structure assez résiliente. Malgré le fait qu'on ne souhaite aucun dommage à l'organe dentaire, certaines caractéristiques de ces dommages peuvent éventuellement être très utiles pour des études des mécanismes de réparation des tissus en général.

INSTALLATION DE LA MINIPOMPE

Quatre méthodes pour le placement de la minipompe ont été utilisées afin de déterminer la meilleure façon d'implanter la minipompe ainsi que son cathéter d'une manière fixe et fiable (**figures 16a, b, c**). Les étapes pour effectuer la fenêtration osseuse (décrite ci-haut et dans l'article) ont été les mêmes pour les quatre méthodes mais seulement la façon d'insérer le cathéter diffère.

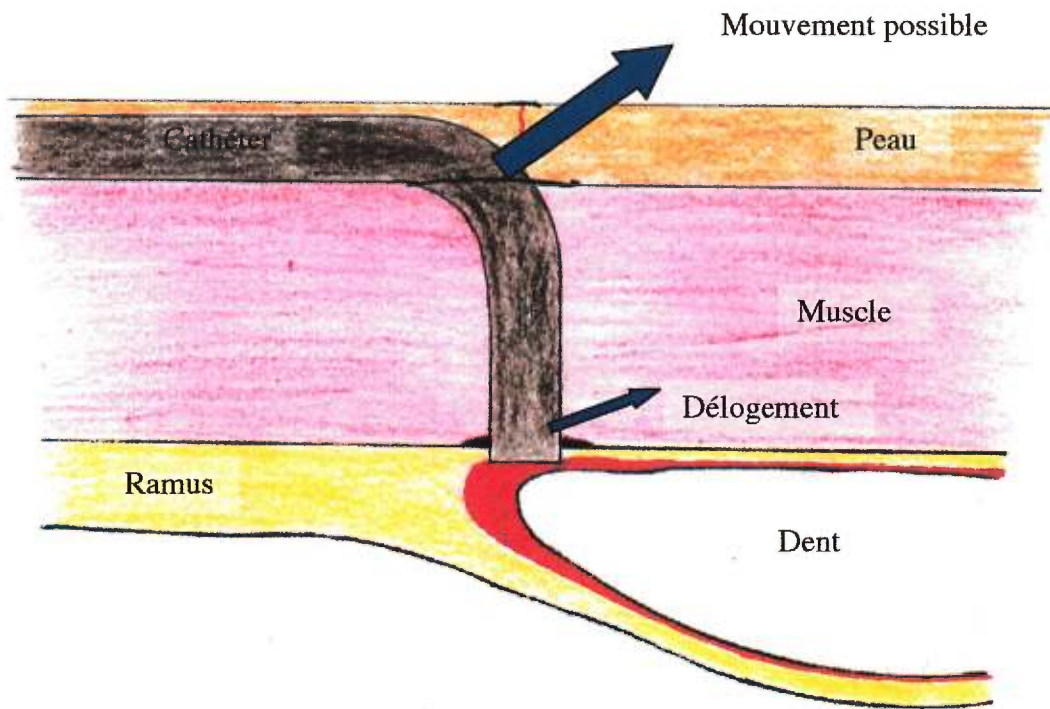
Avec la première méthode, un cathéter en «L» fabriqué à partir d'une aiguille 20G1 de Becton-Dickinson (Rutherford, N.J.) est attaché au tube relié à la minipompe. Les tissus conjonctifs sous cutanés sont dégagés de la peau à partir de la première incision cutanée pour créer une poche sous cutanée dans le dos permettant l'insertion de la minipompe. La minipompe est insérée dans le dos et le cathéter est stabilisé dans la fenêtration osseuse à l'aide d'histoacryl pour chirurgie parodontal. Le masséter est suturé autour du cathéter tout en laissant ce dernier courber au-dessus du muscle. La peau est finalement suturée au-dessus du tout. Cependant, avec cette méthode, on a remarqué que le cathéter a été délogé à mainte reprise par l'action du muscle masséter lors des activités journalières de l'animal et presque aucun cathéter a été retenu en place après plus de 24 heures.

Pour pallier les problèmes d'adhésion et de rétention connus avec la méthode précédente, on a ensuite introduit une base en plastique ou en métal collée à l'extrémité du même cathéter fabriqué selon la première méthode pour augmenter la surface de contact, donc la surface d'adhésion de l'histoacryl à l'os. Cependant, ces techniques sont devenues trop encombrantes. Malgré le fait qu'environ 50% des cathéters ne se sont pas décollés, plusieurs cathéters ont été collés au mauvais endroit dû à la vision et l'accès limités (environ la moitié des cathéters collés sont placés au mauvais endroit).

Finalement, avec les problèmes de rétention connus avec la première méthode à cause de l'activité du masséter en concomitant avec la longueur du cathéter et avec les problèmes de visibilité avec les deux autres méthodes, on a décidé de passer le cathéter sous le masséter en le rendant plus court (en forme de L). Ainsi, on a augmenté la stabilité du cathéter en l'accotant sur le ramus. L'accès et la visibilité étaient excellents. Le cathéter est ensuite collé et cimenté avec de l'histoacryl et du ciment à os. Il n'y aurait donc pas de force possible pour déloger le cathéter lors de la mastication et au contraire, le masséter semble appliquer une force favorable aidant à maintenir le cathéter sur la surface osseuse. En plus, le système est moins encombrant pour l'animal. Par conséquent, sur un groupe de 10 animaux traités selon cette dernière méthode, tous les cathéters cimentés ont été trouvés retenus dans la fenêtre osseuse lors du sacrifice. Ceci a été confirmé à l'aide de radiographie dentaire et à l'examen visuel lors de la dissection. La force d'attache du cathéter à la fenêtre osseuse a été vérifiée au sondage lors de la dissection des tissus pour la préparation histologique. Grâce à sa stabilité, sa fiabilité, et sa reproductibilité, cette dernière méthode a donc été choisie pour tester les différents agents expérimentaux. Histologiquement, quand un cathéter a été placé dans la fenêtre osseuse, le processus de guérison ainsi que le remodelage osseux ont eu lieu pareillement mais seulement autour du cathéter. Donc, aucun caillot n'a été retrouvé au centre de la fenêtre où se situait le cathéter éliminant ainsi toute possibilité d'obstruction du cathéter.

En utilisant la dernière méthode décrite précédemment, nous avons été capable d'administrer du sulfate de vinblastine ainsi que des traceurs à l'organe de la dent et d'observer leurs effets et diffusions respectifs (voir article). En plus, la mise en place de

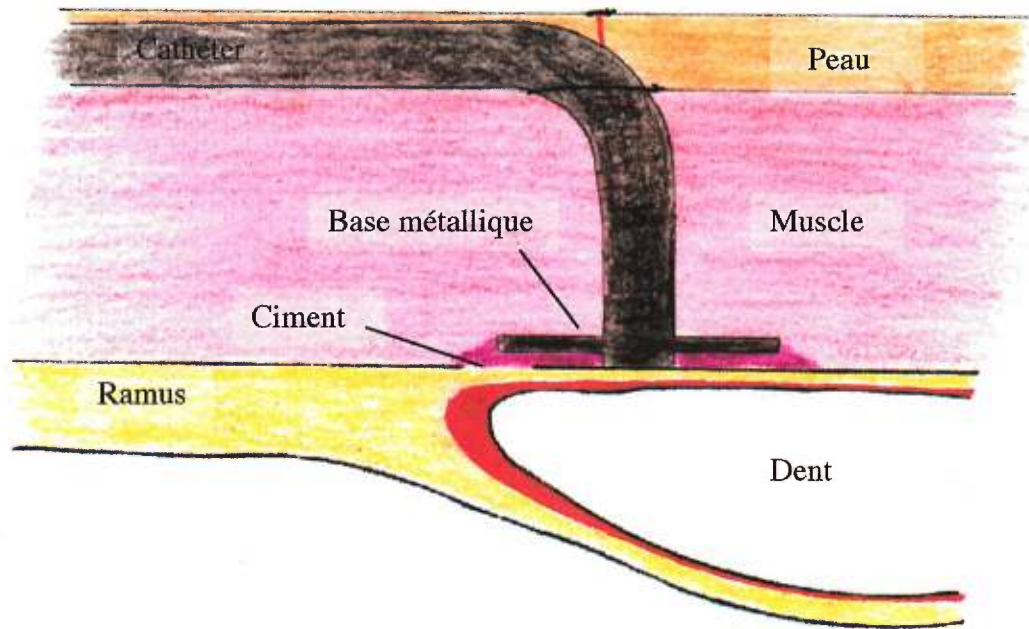
Figure 16. Description des 3 méthodes utilisées pour raccorder et stabiliser le cathéter à la fenêtre osseuse.



Première méthode

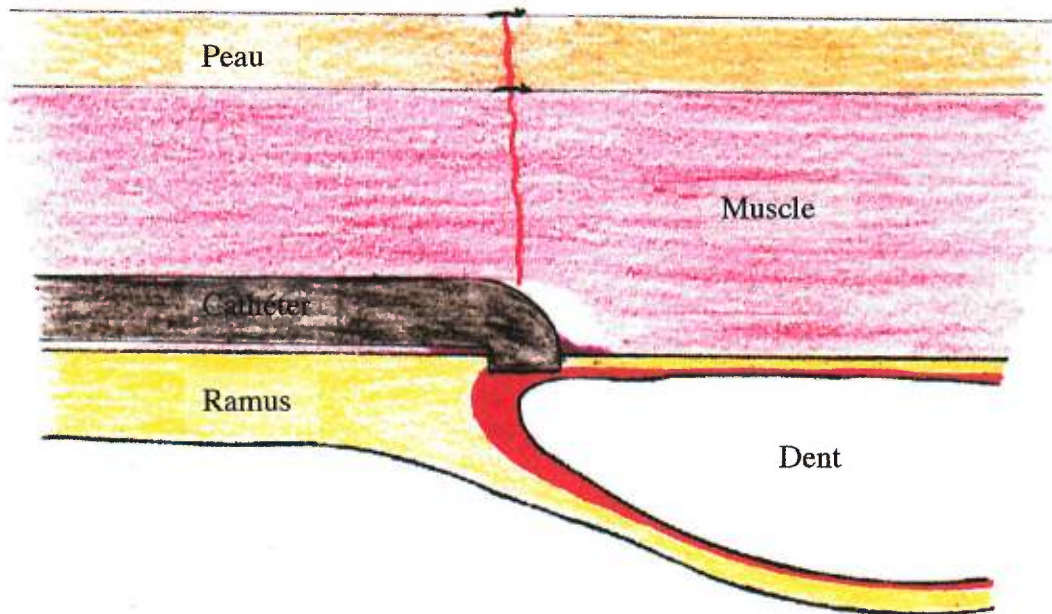
Délogement possible du cathéter par l'action musculaire du rat

Figure 16a



Méthodes alternatives à l'aide d'une base (en métal ou en plastique)
Augmentation de l'adhésion et de la rétention du cathéter
cependant la visibilité est limitée lors de l'approche
donc le cathéter est cimenté souvent au mauvais endroit

Figure 16b



Dernière méthode
diminution d'une extrémité du cathéter
le muscle du masséter est suturé par dessus le cathéter
le cathéter est stabilisé sur le ramus

Figure 16c

la pompe et du cathéter ne semble pas avoir affecté l'alimentation des animaux. Ils ont tous démontré un gain de poids dans la normalité d'environ 5g par jour). Dès leur réveil, les animaux reprennent leurs activités habituelles.

ÉTUDES ANTÉRIEURES

Les études antérieures réalisées par Berkovitz (1971a et 1971b; 1969, 1978) et Redondo (1995) ont été très invasives dans le sens qu'il leur fallait une assez grande ostéotomie ou amputer une partie de la dent pour analyser la régénération osseuse ou pour comprendre l'effet de l'ablation d'une partie apicale de la dent. Les études de Berkovitz ont effectivement démontré qu'une résection partielle de l'organe dentaire n'a que ralenti l'éruption continue de l'incisive sans affecter les tissus environnants. Cependant, ces approches semblent assez traumatisant pour l'animal. Malgré que plusieurs questions concernant la régénération osseuse et l'implication de certaines parties de l'organe dentaire ainsi que le ligament parodontal sur le phénomène de l'éruption dentaire ont été répondues avec ces expériences, peu de données ont été obtenues sur la biologie moléculaire impliquée dans ces processus.

D'autre part, on peut voir que la technique de la fenêtre chirurgicale permet l'introduction de différents agents sur l'organe de l'émail ainsi que l'organe dentaire sans l'effet secondaire des complications systémiques résultant de certaines substances toxiques et sans amputation extensive. Cependant, l'emplacement des fenêtres comme décrit par (McKee et Warshawsky, 1984) ainsi que par (Eisenmann et al., 1989) était limité à cibler un stade de l'améloblaste, provoquait beaucoup de dommages à l'organe de l'émail sous jacent et interférait avec le microenvironnement isolé formé par l'organe de l'émail. Ainsi, nous avons supposé que l'emplacement d'une fenêtre à une position où toutes les cellules souches de l'organe dentaire se retrouvent et où l'organe de l'émail est protégé par tissu parodontal plus épais serait meilleur. En plus, l'utilisation d'une minipompe permettant une infusion continue d'une quantité prédéterminée d'agent sur une période de temps précis et éliminant ainsi toute imprécision et traumatismes d'une deuxième injection serait plus avantageuse que la technique de microinjection.

OBJECTIFS ATTEINTS

Ainsi, nous avons développé un modèle expérimental pouvant nous offrir la possibilité de réaliser des expériences visant à étudier la réparation/régénération osseuse ou la formation et l'éruption dentaire avec des produits chimiques sans avoir à amputer quoique ce soit. Donc, avec cette approche, nous avons bel et bien atteint nos principaux buts qui sont : (1) de mettre au point une approche chirurgicale pour accéder et pouvoir manipuler l'organe dentaire de l'incisive, (2) de développer un système d'infusion pour l'administration localisée d'agents expérimentaux à cet organe et aux tissus avoisinants et (3) de valider l'effet local des agents.

Par ailleurs, avec notre technique nous avons observé que la fétuine-or pouvait se rendre aussi loin que 5mm du site chirurgical. Nous avons ainsi fait l'hypothèse qu'on pouvait non seulement manipuler l'organe de l'émail au stade de présécrétion et au stade de sécrétion mais aussi affecter les événements impliqués dans le stade de maturation tel que l'action des protéases ou d'autres enzymes de dégradation des protéines de l'émail (sérine, métalloprotéases). Donc, nous avons déjà initié de nouvelles expériences impliquant l'utilisation des bloqueurs d'enzymes tel que le péfabloc (Pentapharm AG, Basel, Switzerland) et le mini-complete (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Ces substances sont extrêmement toxiques et une injection systémique de ces produits chez le rat peut tuer le rat en très peu de temps (d'après discussion avec Dr Charles E. Smith). Selon les résultats préliminaires avec notre approche, les animaux demeurent encore en vie et il semble que l'on ait affecté le processus de dégradation extracellulaire des protéines de l'émail.

D'autre part, comme mentionné dans l'article, on peut non seulement cibler l'organe de l'émail avec notre approche mais aussi tout autre tissu dentaire ainsi que les tissus supportant la dent tel que le tissu osseux. Des études antérieures réalisées par (McKee et Nanci, 1996a; McKee et Nanci, 1996b) ont démontré que plusieurs protéines matricielles non-collagéniques seraient impliquées dans la formation ainsi que la réparation du tissu osseux. Parmi ces protéines, on peut mentionner l'OPN et le BSP. Il serait donc très intéressant de voir l'effet d'une administration de ces protéines, de leurs anticorps ou

de sondes moléculaires pouvant inhiber ou augmenter leur expression sur la guérison de la fenêtre osseuse. Ainsi plusieurs produits (OPN, BSP, facteurs de croissance, certains anticorps) pourraient être administrés dans l'ultime but de mieux comprendre le processus de formation/remodelage et guérison des tissus calcifiés.

Malgré qu'une certaine diffusion de l'agent expérimental dans le système circulatoire soit inévitable, le fait qu'on utilise une quantité minimale avec notre technique réduit considérablement tout effet systémique. En effet, nous avons prouvé qu'avec l'albumine marquée au DNP (une molécule capable de se recirculer systématiquement), on a rarement retrouvé le traceur dans la dent contralatérale non traitée ni dans les autres organes systémiques. Même avec le sulfate de vinblastine (un médicament hydrosoluble), on a démontré l'effet local du médicament avec notre système sans effet systémique à une dose précise.

BUT À LONG TERME

Pour pleinement comprendre la formation, la nature et la fonction des tissus calcifiés ainsi que leurs composants, on doit comprendre leurs activités cellulaires ainsi que les interactions complexes entre les divers composants organiques et inorganiques de la matrice extracellulaire. On peut alors mieux définir le rôle spécifique de chaque élément en interférant avec chacun (par inactivation locale et sélective). Par exemple, on peut sélectivement inactiver la production d'une amélogénine (comme une étude antérieure avec un ribosymes d'amélogénine), étudier les résultats et essayer de comprendre sa fonction dans le processus de l'amélogénèse. Avec l'avancement de la technologie biomédicale, il existe aussi présentement des liposomes (Zhu et al., 1996), des virus contenant des vecteurs génétiques (Lalwani et al., 1998) pouvant introduire du matériel génétique dans les cellules d'un individu sans potentiel infectieux mortel (utilisé surtout en thérapie génique). Avec de tel produit on pourrait modifier à notre guise la production de certaines protéines localement et très sélectivement. Donc, dans le but d'optimiser l'utilisation de notre technique, on peut proposer l'infusion de médicaments complexes, d'oligonucléotides antisense, de ribosymes ou même de virus (adéno et/ou rétro) capable d'interférer avec le/les gènes responsables de la production de la protéine

ciblée. En effet, certains de ces produits ont déjà été testés mais seulement *in vitro* (antisense; Lyngstadaas et al., 1995) ou par injection locale (ribosymes; Slavkin, 1995). Par ailleurs, d'autres agents sont particulièrement toxiques lorsque injectés systémiquement et quelques uns (tel que les sondes moléculaires) ne peuvent simplement pas être administrés systémiquement. Donc, la combinaison de notre technique à l'utilisation de ces agents peut grandement contribuer à l'avancement de la compréhension du développement des tissus calcifiés.

D'autre part, ce modèle peut aussi servir à des applications en toxicologie pour déterminer le dosage d'antibiotique à utiliser et pour évaluer l'effet du fluor, de certains médicaments tératogènes ou d'ions toxiques.

CHAPITRE 4
CONCLUSION

CONCLUSION

En conclusion, l'organe dentaire de l'incisive inférieure du rat ainsi que les tissus environnants représentent un excellent modèle pour l'étude des divers événements cellulaires et extracellulaires impliqués dans la formation des tissus calcifiés. Malgré les grandes connaissances disponibles sur le rôle régulateur de certaines molécules matricielles et des facteurs de croissance, il reste encore plusieurs questions concernant le mécanisme moléculaire impliqué dans la formation des tissus dentaires calcifiés. Les données présentées dans ce travail nous ont donc permis de valider notre approche expérimentale et de suggérer que cette nouvelle technique puisse être utilisée avantageusement pour la manipulation *in vivo* des événements impliqués dans la formation des tissus dentaires.

La disponibilité de médicaments avancés, d'antisense, de ribosymes ainsi que de virus adéno/rétro capables d'interférer avec les gènes responsables pour la production des protéines ciblées va grandement contribuer à l'avancement de notre technique et de nos connaissances sur la formation des tissus calcifiés et des altérations pathologiques.

Ainsi, ceci nous offre la possibilité d'activer ou d'inactiver localement et sélectivement certaines protéines pour étudier leur fonction. De telles approches sont moins coûteuses et plus rapides que la production génétique d'animaux transgéniques ou knock-out et sont particulièrement utiles dans des cas où certaines altérations génétiques résulteraient en un phénotype mortel. En plus, puisque notre approche est effectuée sur de jeunes animaux adultes, ceci réduit au minimum tout mécanisme compensatoire durant le développement embryonique pouvant mener à des animaux de phénotype normal.

CHAPITRE 5
REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Antonio Nanci, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa grande patience et sa précieuse guidance au cours de ma maîtrise.

J'aimerais également remercier les personnes suivantes:

-Monsieur Nachaat Daniel pour sa précieuse contribution au projet et ses conseils lors de la rédaction de ce mémoire;

-Dr Vincent Everts et Dr Marc D. McKee pour leurs discussions sur la technique de la fenêtre osseuse;

-Madame Michéline Fortin ses conseils techniques et pour m'avoir montré la coupe histologique et les techniques de préparation des tissus;

-Madame Sylvia Zalzal pour ses conseils techniques et pour m'avoir montré les techniques de marquage immunocytochimiques et l'analyse en microscopie électronique;

Mais plus important, j'aimerais remercier ma famille, tout particulièrement mes parents, et mes amis qui m'ont supporté tout au long de mes études.

CHAPITRE 6
BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Berkovitz BKB. The healing process in the incisor tooth socket of the rat following root resection and exfoliation. *Arch Oral Biol* 1971a; 16:1045-1054.

Berkovitz BKB. The effect of root transection and partial root resection on the unimpeded eruption rate of the rat incisor. *Arch Oral Biol* 1971b; 16:1033-1043.

Berkovitz BKB, Shore RC. The ultrastructure of the enamel aspect of the rat incisor periodontium in normal and root-resected teeth. *Arch Oral Biol* 1978a; 23:681-689.

Berkovitz BKB, Shore RC. High mitochondrial density within peripheral nerve fibers of the periodontal ligament of the rat incisor. *Arch Oral Biol* 1978b; 23:207-213.

Berkovitz BKB, Thomas NR. Unimpeded eruption in the root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. *Arch Oral Biol* 1969; 14:771-780.

Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 1998; 250:13-33.

Butler WT. Dentin matrix proteins and dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 1995; 33:59-65.

Butler WT. Dentin matrix proteins. *Eur J Oral Sci* 1998; 106:204-210.

Christoffersen J, Landis WJ. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat Rec* 1991; 230:435-450.

Deutsch D. Structure and function of enamel gene products. *Anat Rec* 1989; 224:189-210.

Deutsch D, Catalano-Sherman J, Dafni L, David S, Palmon A. Enamel matrix proteins and ameloblast biology. *Connect Tissue Res* 1995a; 32:97-107.

Deutsch D, Palmon A, Dafni L, Catalano-Sherman J, Young MF, Fisher LW. The enamelin (tuftelin) gene. *Int J Dev Biol* 1995b; 39:135-143.

Deutsch D, Palmon A, Fisher LW, Kolodny N, Termine JD, Young MF. Sequencing of bovine enamelin ("tuftelin") a novel acidic enamel protein. *J Biol Chem* 1991; 266:16021-16028.

Dustin P. Microtubule Poisons. In: *Microtubules*. Springer-Verlag.

Eanes ED. Dynamics of calcium phosphate precipitation. In: Bonucci E, ed. *Calcification in Biological Systems*. Boca Raton, CRC Press, 1992:1-18.

Eastoe JE. Enamel protein chemistry. Past, present and future. *J Dent Res* 1979; 58:753-763.

Eisenmann DR, Chen J, Lehman G, El-Moneim Zaki A. Studies on the influx of [³H]-histidine and ⁴⁵Ca through a surgical opening to rat incisor ameloblasts and adjacent enamel. *Arch Oral Biol* 1989; 34:93-102.

Fearnhead RW. Mineralization of rat enamel. *Nature* 1960; 188:509-510.

Fearnhead RW. Electron microscopy of forming enamel. *Arch Oral Biol* 1961; 4:24-28.

Frandsen AM, Becks H. The effects of hypovitaminosis A on bone healing and endochondral ossification in rats. *Oral Surg* 1962; 15:474-487.

Freemont AJ. Basic bone cell biology. *Int J Exp Pathol* 1993; 74:411-416.

Fukae M, Tanabe T, Murakami C, Dohi N, Uchida T, Shimizu M. Primary structure of the porcine 89-kDa enamelin. *Adv Dent Res* 1996; 10:111-118.

Gehron Robey P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. San Diego, Academic Press, 1996:155-165.

Goldberg M, Septier D, Lecolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, Gafni G, Dillouya D, Vermelin L, Thonemann B, Schmalz G, Bissila-Mapahou P, Carreau JP. Dental mineralization. *Int J Dev Biol* 1995; 39:93-110.

Green LJ, Gong JK, Neiders ME. Relationship between ⁸⁵Sr uptake and histological changes during healing in dental extraction wounds in rats. *Archs Oral Biol* 1969; 14:865-872.

Huebsch RF, Coleman RD, Frandsen AM, Becks H. The healing process following molar extraction. 1. Normal male rats (Long Evans strain). *Oral Surg* 1952; 5:864-876.

Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996; 317:59-64.

Kallenbach E. The fine structure of Tomes' process of rat incisor ameloblasts and its relationship to the elaboration of enamel. *Tissue Cell* 1973; 5:501-524.

Kallenbach E, Sandborn E, Warshawsky H. The Golgi apparatus of the ameloblast of the rat at the stage of enamel matrix formation. *J Cell Biol* 1963; 16:629-632.

Kalnins VI, Berzins-Raimonds A. Changes in tooth and bone tissue produced by placing caps upon the incisors of rodents. *Am J Orthod* 1949; 35:219-233.

Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin: a novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 1996; 271:4431-4435.

Lalwani AK, Walsh BJ, Reilly PG, Muzyczka N, Mhatre AN. Development of *in vivo* gene therapy for hearing disorder: introduction of adeno-associated virus into the cochlea of the guinea pig. *Gene Therapy* 1998; 3:588-592.

Landis WJ. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone* 1995; 16:533-544.

Leblond CP, Warshawsky H. Dynamics of enamel formation in the rat incisor tooth. *J Dent Res* 1979; 58B:950-975.

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

Lyngstadaas SP, Risnes S, Sproat BS, Thrane PS, Prydz HP. A synthetic, chemically modified ribozyme eliminates amelogenin, the major translation product in developing mouse enamel *in vivo*. *EMBO J* 1995; 14:5224-5229.

Marks SCJ, Schroeder HE. Tooth eruption: Theories and facts. *Anat Rec* 1996; 245:374-393.

McKee MD, Nanci A. Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: A potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec* 1996; 245:394-409.

McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair. *Microsc Res Tech* 1996; 33:141-164.

McKee MD, Warshawsky H. In vivo experimentation on rat incisor enamel organs through a surgical window. *Anat Rec* 1984; 210:693-705.

Miake Y, Yanagisawa T, Takuma S. Electron microscopic study on the effects of vinblastine on young odontoblasts in rat incisor. *J Biol Buccale* 1982; 10:319-330.

Moe H, Mikkelsen H. Light microscopical and ultrastructural observations on the effect of vinblastine on ameloblasts of rat incisors *in vivo*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1977; 85:73-88.

Nanci A, Bitton GM, Ahluwalia JP, Smith CE. Degradation of newly formed enamel proteins in relation to the secretory activity of ameloblasts. In: Fearnhead RW, ed. *Tooth Enamel V*. Yokohama, Florence Publishers, 1989:69-73.

Nanci A, Fortin M, Ghitescu L. Endocytotic functions of ameloblasts and odontoblasts: Immunocytochemical and tracer studies on the uptake of plasma proteins. *Anat Rec* 1996; 245:219-234.

Nanci A, Hashimoto J, Zalzal S, Smith CE. Transient accumulation of proteins at interrod and rod enamel growth sites. *Adv Dent Res* 1996; 10:135-149.

Nanci A, Smith CE. Development and calcification of enamel. In: Bonucci E, ed. *Calcification in Biological Systems*. Boca Raton, CRC Press, Inc. 1992:313-343.

Nanci A, Uchida T, Warshawsky H. The effects of vinblastine on the secretory ameloblasts: An ultrastructural, cytochemical, and immunocytochemical study in the rat incisor. *Anat Rec* 1987; 219:113-126.

Nanci A, Warshawsky H. Characterization of putative secretory sites on ameloblasts of the rat incisor. *Am J Anat* 1984; 171:163-189.

Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W-Y, Krebsbach PH, Yamada Y,

Hammarström L, Simmer JP, Fincham AG, Snead ML, Smith CE. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 1998; (In Press)

Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. *Collagen Rel Res* 1983; 3:33-64.

Pietrokovski J, Massler M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent Res* 1967; 46:222-231.

Redondo LM, Cantera JMG, Hernandez AV, Puerta CV. Effect of particulate porous hydroxyapatite on osteoinduction of demineralized bone autografts in experimental reconstruction of the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1995; 24:445-448.

Ritchie HH, Ritchie DG, Wang LH. Six decades of dentinogenesis research - Historical and prospective views on phosphophoryn and dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci* 1998; 106:211-220.

Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: Structure and function. *Connect Tissue Res* 1996; 34-5:185-190.

Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 1998; 106:282-291.

Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Bonass WA, Shore RC. The chemistry of enamel development. *Int J Dev Biol* 1995; 39:145-152.

Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39:51-68.

Sawada T, Nanci A. Spatial distribution of enamel proteins and fibronectin at early

stages of rat incisor tooth formation. *Arch Oral Biol* 1995; 40:1029-1038.

Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1995; 6:84-108.

Slavkin HC. Molecular determinants of tooth development: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990; 1:1-16.

Slavkin HC. Antisense oligonucleotides: an experimental strategy to advance a causal analysis of development. *Int J Dev Biol* 1995; 39:123-126.

Smith CE. Ameloblasts: Secretory and resorptive functions. *J Dent Res* 1979; 58(B):695-706.

Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;

Smith CE, Chen W-Y, Issid M, Fazel A. Enamel matrix protein turnover during amelogenesis: Basic biochemical properties of short-lived sulfated enamel proteins. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:133-144.

Smith CE, Nanci A. A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection. *Anat Rec* 1989; 225:257-266.

Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol* 1995; 39:153-161.

Smith CE, Nanci A. The protein dynamics of amelogenesis. *Anat Rec* 1996; 245:219-234.

Smith CE, Warshawsky H. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast

layer of the rat incisor as followed by radioautography using ^3H -thymidine. *Anat Rec* 1975; 183:523-562.

Smith CE, Warshawsky H. Histological and three dimensional organization of the odontogenic organ in the lower incisor of 100 gram rats. *Am J Anat* 1975; 142:403-430.

Thesleff I, Jernvall J. The enamel knot: A putative signaling center regulating tooth development. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1997; 62:257-267.

Thesleff I, Vaahtokari A, Vainio S, Jowett A. Molecular mechanisms of cell and tissue interactions during early tooth development. *Anat Rec* 1996; 245:151-161.

Triffitt JT, Joyner CJ, Oreffo ROC, Virdi AS. Osteogenesis: bone development from primitive progenitors. *Biochem Soc Trans* 1998; 26:21-27.

Warshawsky H. The fine structure of secretory ameloblasts in rat incisors. *Anat Rec* 1968; 161:211-230.

Warshawsky H. A light and electron microscopic study of the nearly mature enamel of rat incisors. *Anat Rec* 1971; 169:559-584.

Warshawsky H. A freeze-fracture study of the topographic relationship between inner enamel-secretory ameloblasts in the rat incisor. *Am J Anat* 1978; 152:153-207.

Warshawsky H. Radioautographic studies on amelogenesis. *J Biol Buccale* 1979; 7:105-126.

Warshawsky H, Josephsen K, Thylstrup A, Fejerskov O. The development of enamel structure in rat incisors as compared to the teeth of monkey and man. *Anat Rec* 1981; 200:371-399.

Warshawsky H, Smith CE. A three-dimensional reconstruction of the rods in rat maxillary incisor enamel. *Anat Rec* 1971; 169:585-592.

Warshawsky H, Smith CE. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat Rec* 1974; 179:423-446.

Warshawsky H, Vugman I. A comparison of the protein synthetic activity of presecretory and secretory ameloblasts in rat incisors. *Anat Rec* 1977; 188:143-172.

Watson ML. The extracellular nature of enamel in the rat. *J Biophys Biochem Cytol*, 1960; 7:489-492.

Weiner S. Organization of extracellularly mineralized tissues: A comparative study of biological crystal growth. *CRC Press, Inc* 1986; 20:365-408.

Weinstock A, Leblond CP. Elaboration of the matrix glycoprotein of enamel by the secretory ameloblasts of the rat incisor as revealed by radioautography after galactose-3H injection. *J Cell Biol* 1971; 51:26-51.

Young WG. Growth hormone and insulin-like growth factor-I in odontogenesis. *Int J Dev Biol* 1995; 39:263-272.

Zeichner-David M, Diekwisch TGH, Fincham AG, Lau EC, MacDougall M, Moradian-Oldak J, Simmer JP, Snead ML, Slavkin HC. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995; 39:69-72.

Zhu J, Zhang L, Hanisch UK, Felgner PL, Reska R. A continuous intracerebral gene delivery system for *in vivo* liposome-mediated gene therapy. *Gene Therapy* 1996; 3:472-476.