

Université de Montréal

Étude du rôle de la membrane basale spécialisée dans la maturation de l'émail

par Luiz Claudio Viegas Costa

Département de stomatologie

Faculté de médecine dentaire

et

Vice-Décanat des sciences fondamentales et études supérieures

Faculté de médecine

Université de Montréal

Mémoire présenté

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc.)

en Sciences biomédicales – Option Médecine expérimentale

Mai 2016

© Luiz Claudio Viegas Costa, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures
Ce mémoire intitulé :

Étude du rôle de la membrane basale spécialisée dans la maturation de l'émail

Présenté par :
Luiz Claudio Viegas Costa

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Louis Gaboury, président-rapporteur

Dr Antonio Nanci, directeur de recherche

Dre Florina Moldovan, membre du jury

Mémoire accepté le

Résumé

Les cellules épithéliales qui produisent l'émail, les améloblastes, sont séparées de l'émail au niveau de la zone de maturation par une membrane basale spécialisée (MBS) enrichie en laminine 332 (LM-332). Cette protéine hétérotrimérique (composée des chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$) assure l'intégrité structurelle des membranes basales (MB) et influence divers processus cellulaires épithéliaux tels que l'adhésion et la différenciation cellulaire.

Des modèles de souris « *knockout* » (KO), où les gènes codant pour LM-332 ont été supprimés, meurent peu après la naissance. Néanmoins, ce phénotype létal peut être contourné en substituant chez la souris le gène produisant la chaîne $\gamma 2$ de la laminine (LAMC2) par sa forme humaine, sous le contrôle de l'expression du promoteur-rtTA, de la cytokératine 14, inducible par la prise de doxycycline (Dox) - (Tet-on).

Le but de ce projet est d'examiner si l'utilisation de cette protéine humaine chez la souris a un effet sur la structuration de la MBS ainsi que sur la maturation de l'émail.

La phase de maturation de l'organe de l'émail chez la souris transgénique a été sévèrement altérée par rapport à une souris normale (WT). La MBS n'est plus visible, une matrice dystrophique s'est formée dans la couche d'émail dans la phase de maturation, et la présence d'une matrice résiduelle de l'émail est observée durant la phase tardive de maturation. Des micro-analyses tomographiques ont révélé une usure excessive des surfaces occlusales des molaires, un écroulement de l'émail sur les pointes des incisives et une hypominéralisation de l'émail.

Cependant, aucune altération structurale due à cette recombinaison transgénique n'a été observée dans d'autres sites épithéliaux, tels que la peau, le palais et la langue.

Ces résultats indiquent que, bien que ce modèle de souris humanisée soit capable de rétablir ses fonctions dans divers tissus épithéliaux, il est incapable de soutenir la structuration d'une MBS à l'interface entre les améloblastes et l'émail en maturation. Cet échec peut être lié à la composition spécifique de la MBS dans la phase de maturation et supporte l'hypothèse que la MBS est essentielle pour la maturation adéquate de l'émail.

Mots-clés : Amélogénèse, Membrane basale spécialisée, Maturation de l'émail, Souris humanisées, Laminine γ 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.

Keywords : Amelogenesis, Basement membrane, Enamel maturation, Humanized mouse model, Laminin $\gamma 2$.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures	viii
Liste des figures complémentaires.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
Chapitre 1 - Introduction.....	14
Chapitre 2 – État des connaissances et mise en contexte.....	18
2.1 - Tissus épithéliaux et la membrane basale.....	18
2.1.1 – Amélogénèse et la membrane basale spécialisée.....	18
2.1.2 - Laminine-332 :	19
2.2 – Modèles expérimentaux transgéniques – un aperçu	23
2.2.1 – Modèles humanisés : avantages et limites	23
Chapitre 3 – Matériel et méthodes	25
3.1 – Génération et génotypage des souris <i>LAMC2</i> -dox.....	25
3.2 – Préparation des tissus pour la microscopie optique, microscopie électronique et microtomographie	26
3.3 – Immunohistochimie	27
Chapitre 4 – Article.....	29
4.1 – Résultats publiés et contribution à la recherche.....	29
4.2 – Transfert de connaissance et vulgarisation de la recherche	30
Chapitre 5 – Discussion	32

Conclusion	40
Bibliographie.....	41
Annexe 1 - Demande d'autorisation d'utiliser des animaux – Transgéniques	50
Annexe 2 - Demande d'autorisation d'utiliser des animaux – Sauvages (WT).....	51
Annexe 3 – Figures complémentaires.....	52

Liste des figures

Fig. 1 - Image histologique de la formation de la dent et ses structures Page 16

Fig. 2 – Image schématique de la structure de la **LM-332**..... Page 20

Fig. 3 - Schéma de la construction du transgène de la souris **LAMC2-Dox**..... Page 22

Liste des figures complémentaires

Fig. 4 - Vue clinique des incisives chez les souris **WT** et **LAMC2-Dox** Page 53

Fig. 5 - Microscopie électronique à balayage (MEB) et micro-tomographie (micro-CT scan) des molaires chez des souris **WT** et **LAMC2-Dox** Page 54

Fig. 6 - Epithélium de jonction de l'incisive des souris **LAMC2-Off-Dox** – HE..... Page 55

Fig. 7 - Incisive inférieure des souris **LAMC2-Off-Dox**, avec les insertions des zones de sécrétion et de maturation de l'émail (Bleu de toluidine) Page 56

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AI :	Amelogenesis Imperfecta
AMTN :	Amelotine
Ca ²⁺ :	Ion calcium
CT-Scan :	Tomodensitométrie – tomographie
Dox :	Doxycycline
EDTA :	Éthylènediamine disodium tétra-acétique
JEB :	Épidermolyse jonctionnelle bulleuse
KO :	« <i>Knockout</i> » - (anglais) invalidation génique
<i>LAMA3</i> :	Gènes codants de la chaîne $\alpha 3$, de la Laminine 332 humaine
<i>LAMB3</i> :	Gènes codants de la chaîne $\beta 3$, de la Laminine 332 humaine
<i>LAMC2</i> :	Gènes codants de la chaîne $\gamma 2$, de la Laminine 332 humaine
LAMC2 :	Laminine $\gamma 2$ (protéine)
<i>Lamc2</i> :	Laminine $\gamma 2$ murine (gène)
<i>LAMC2</i> -Dox:	Souris transgénique exprimant la chaîne $\gamma 2$ de la Laminine humaine lors de la consommation de doxycycline
<i>Lamc2</i> -KO :	Génotype knockout de la chaîne $\gamma 2$, de la Laminine 332
<i>LAMC2</i> -Off-Dox:	Souris transgénique pour la chaîne $\gamma 2$ de la Laminine humaine, qui ne reçoit pas de doxycycline, donc sans l'expression de cette chaîne.
LM-332 :	Laminine 332
MB :	Membrane basale
MBS :	Membrane basale spécialisée
MEB :	Microscopie électronique à balayage

MET : Microscope électronique à transmission

ODAM : Odontogenic Ameloblast-associated

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PO₄⁻ : Ion phosphate

rtTA : Transactivateur inverse (reverse) du promoteur régulable à la tétracycline

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

Tet-on : Activation transcriptionnelle contrôlée par la tétracycline

WT : « *Wild-type* » - (anglais) génotype sauvage.

*Às pessoas que representam tudo na minha vida:
meu Pai, minha Mãe e meu filho, Thales.*

Amo vocês de coração e alma!

*Ao meu Mestre e Senhor, Luz que guia meus
passos nesta jornada chamada Vida!*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Dr Antonio Nanci, mon directeur de recherche, qui m'a accueilli dans son laboratoire lorsque j'étais dans un moment délicat de mon parcours aux cycles supérieurs à l'UdeM. Vous avez su m'aider et me soutenir, ainsi que m'encourager à mieux connaître le monde de la recherche scientifique. Grâce à vos enseignements et conseils, j'ai pu repousser mes limites et découvrir de nouveaux horizons. Votre souci du détail, de l'intégrité, de l'esprit analytique et de la cohérence m'ont grandement influencé pendant tout ce temps. Ma vision de ce qu'on appelle « Science » a changé après cette remarquable expérience de vie.

Je voudrais remercier les membres de mon jury, Dr Louis Gaboury et Dre Florina Moldovan, pour avoir gentiment accepté d'évaluer mon mémoire.

Je pourrais écrire un chapitre pour remercier mes collègues de travail. Vous m'avez toujours appuyé et motivé à poursuivre mon chemin pendant mes études. L'ambiance du laboratoire n'aurait pas été aussi agréable et joyeuse sans vous tous. Aurélien, tu as toujours été là, dès le début, pour aider gentiment et ta bonne humeur est incroyablement contagieuse. Alejandra et Dainelys, vous avez fortement contribué à la chaleur et l'amitié pendant chaque instant de notre quotidien. Mon cher Renan, j'apprécie ton esprit taquin et ton sens de l'humour, ainsi que nos bonnes et sérieuses conversations. Ta présence au labo m'a beaucoup soulagé, merci !

Ma chérie amie Clarice, tu m'as donné les bons mots aux moments les plus difficiles. Tu es une personne merveilleuse ! Merci pour tes bons conseils et pour ton amitié !

À toi aussi, Rima, merci beaucoup ! Poursuivre le projet que tu avais entamé a été un honneur et une grande responsabilité. Tes enseignements et ton soutien m'ont énormément aidé.

Katia, il n'existe pas de façon juste et suffisante pour te remercier. Tu es une personne gentille, solidaire, sensible et généreuse ! Tu es une professionnelle sérieuse, méticuleuse et responsable, un exemple pour nous tous ! Pour ton soutien et l'aide apportée, merci infiniment !

En remerciant Svetlana, Faheem, André, Amal et Daiane, je remercie tous mes collègues du cinquième étage. Vous m'avez aidé avec les bonnes conversations et l'amitié.

En remerciant Mr Mourad Benmiloud, je remercie tous les professionnels qui font de l'Université de Montréal une référence de l'apprentissage et de la recherche mondiale !

Je remercie Dr Emami d'avoir ouvert les portes de l'UdeM pour moi. Certainement sans votre confiance je n'aurais pas pu suivre mes études dans cette excellente université !

Je remercie de tout mon cœur ma famille. Vous avez été là pour moi et pour Thales dans tous les moments. Vous me soutenez depuis toujours. Merci pour tout !

Finalement, en remerciant Dr Roy et Dr Kauzman, je remercie tous ceux qui, directement ou indirectement m'ont influencé positivement pendant tout le chemin parcouru !

Chapitre 1 - Introduction

Les améloblastes sont les cellules d'origine épithéliale responsables de l'amélogénèse ; ce processus permet la formation de l'émail en trois étapes fonctionnelles majeures qui sont la pré-sécrétion, la sécrétion et la maturation. Au cours de la pré-sécrétion, une membrane basale (MB) sépare les cellules épithéliales de la matrice de pré-dentine récemment formée et associée aux odontoblastes (1). À ce moment, les améloblastes en voie de différenciation acquièrent leur phénotype, changent de polarité, développent un vaste appareil de synthèse protéique et se préparent à sécréter la matrice organique de l'émail. Juste avant la phase de sécrétion, cette MB disparaît. Pendant la phase de sécrétion, les améloblastes élaborent et organisent l'émail pour qu'elles atteignent son épaisseur définitive. Plus tard, au début de l'étape de maturation, lorsque la matrice organique disparaît et qu'il y a une accumulation importante de minéraux et la croissance des cristaux, les améloblastes reforment une MB à l'interface entre les cellules et l'émail (1, 2). Une figure montrant les différentes structures de la dent montre la formation de l'émail, une partie déjà maturée, avec l'espace de émail qui a été déminéralisé, et une partie en maturation, où la matrice organique est encore présente (FIG 1) (1). La MB à l'interface améloblastes-émail est dite spécialisée (MBS) de part sa composition atypique puisqu'elle ne contient pas de collagènes de types IV et VII (3-5) mais est enrichie en LM-332 (6, 7) et d'autres part car elles possèdent des fonctions spécifiques, en comparaison aux MB typiques.

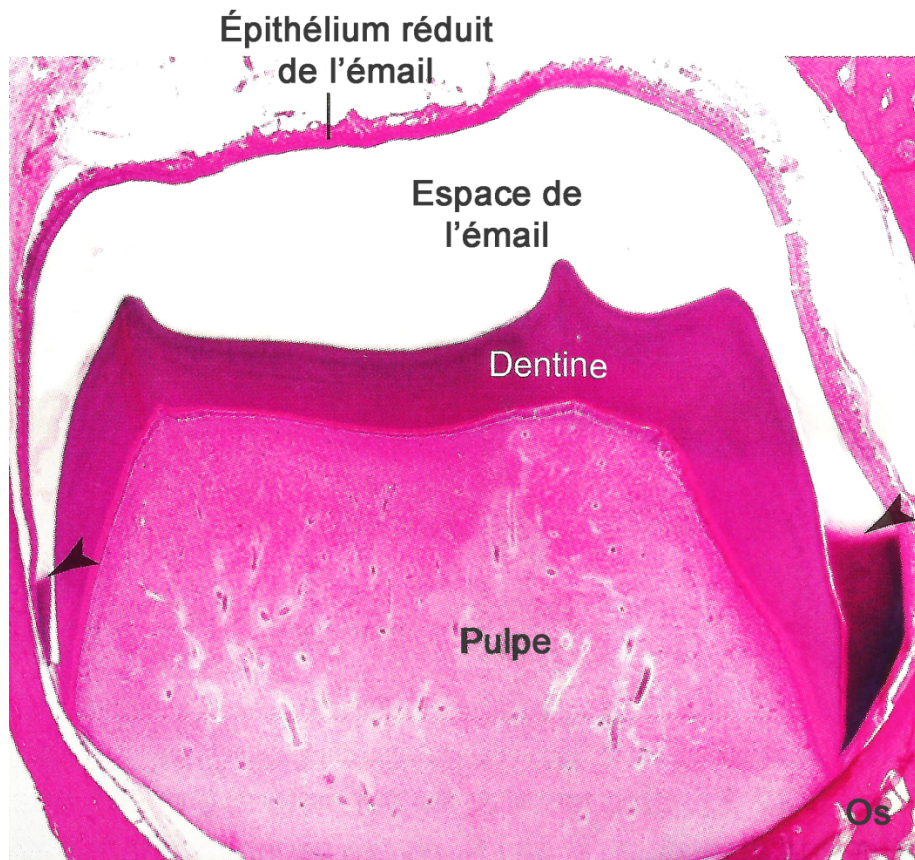


Fig. 1. Image histologique de la dent et ses structures en formation. L'émail présente deux phases de formation : on observe l'espace de l'émail formé et déminéralisé pour des fins histologiques et la partie en maturation, où la matrice organique peut être visualisée (flèches) (1). Coloration : HE

La grande famille des Laminines est formée par des glycoprotéines composées des chaînes α , β et γ qui jouent chacune un rôle essentiel dans l'intégrité structurale de la MB (8, 9). La LM-332 est un hétérotrimère en forme de croix, composé des chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$ (8, 9), qui sont codées, respectivement par les gènes *LAMA3*, *LAMB3* et *LAMC2*. (9). La perte d'une seule de ces chaînes mène à de graves défauts du développement et entraîne la létalité précoce des souris, ce qui gêne l'étude des fonctions de chacune de ses chaînes par l'utilisation de modèle « KO » (10, 11).

Pour empêcher cette létalité prématurée, un modèle transgénique utilisant la laminine $\gamma 2$ humaine (*LAMC2*) dans un modèle de souris *Lamc2*-KO, a été mis au point (12). Ces animaux produisent la chaîne $\gamma 2$ humaine sous le contrôle de la doxycycline (Dox) en utilisant le

promoteur de la CK-14, sous le contrôle d'un transactivateur inverse (reverse) du promoteur régulable à la tétracycline (rtTA) - *LAMC2*-Dox (12). Dans ce modèle, les animaux qui reçoivent la Doxycycline expriment la *LAMC2* humaine au lieu de celle de souris. L'isoforme humaine a été choisie car on peut suivre son expression, sa localisation et son renouvellement sans réactivité croisée avec la *LAMC2* endogène de la souris. Des études antérieures ont montré que les animaux qui reçoivent la Dox ne montrent pas d'atteinte des tissus mous épithéliaux; cependant, l'interruption de l'antibiotique mène à des altérations tissulaires graves en environ trois semaines et aux décès ultérieures des animaux (12, 13). Pourtant, l'effet sur les tissus durs, tels que les dents, n'a pas encore été examiné chez ce modèle transgénique. Ces souris représentent ainsi un bon modèle pour l'étude du rôle de LM-332 dans la formation de la dent, en particulier durant la phase de maturation de l'émail.

Il est connu que la LM-332 est impliquée dans la différenciation terminale des améloblastes au cours de la phase de pré-sécrétion (14), mais on ne connaît pas son rôle lors de la maturation de l'émail.

Curieusement, alors que les animaux *LAMC2*-Dox ne montrent pas d'altération macroscopique ou histologique des tissus mous (12), l'émail de la portion de l'incisive qui a fait éruption semble atteint. La présente étude vise à explorer ce modèle transgénique conditionnel de la *LAMC2* afin d'élucider le rôle de LM-332 dans la structuration et le fonctionnement de la MB spécialisée, qui se forme durant la phase de maturation de l'émail.

L'objectif de cette recherche est donc de caractériser et d'élucider le phénotype dentaire dans la zone de maturation chez les souris transgéniques, qui expriment la *LAMC2* humaine.

Chapitre 2 – État de connaissances et Mise en contexte

2.1 - Tissus épithéliaux et la membrane basale

Les épithéliums sont séparés du tissu conjonctif adjacent par une matrice extracellulaire spécialisée appelée membrane basale (MB). Les membranes basales qui délimitent les tissus ont une épaisseur variant entre 40-120 nm. Elles servent à stabiliser la structure cellulaire, à définir la polarité et à établir des barrières physiques. (15, 16). Leur composition contrôle des processus cellulaires tels que la propagation, la migration et l'adhérence. Généralement les MBs sont composées de collagène de types IV, VII et XVIII, des protéoglycans et glycoprotéines, telles que le nidogène et les laminines (3-5, 16).

Les laminines sont considérées comme des constituants majeurs de la MB où elles jouent un rôle très important (8, 16). Ce sont des glycoprotéines de grande taille composées de trois chaînes (α , β et γ) qui participent à plusieurs fonctions de la MB. Elles laminines sont impliquées tant dans le développement physiologique, que dans les maladies (3, 5, 12, 17-19).

2.1.1 – Amélogénèse et la membrane basale spécialisée

Tout au long de l'amélogénèse, les améloblastes subissent des changements morphologiques et produisent d'importantes molécules (20, 21). Les multiples activités observées durant le cycle de vie des améloblastes peuvent s'autoréguler en fonction du stade de développement de l'email (1). Toutefois, il importe de bien comprendre la régulation du développement de l'email en raison des défauts observés lors de troubles génétiques spécifiques. Plusieurs facteurs contribuent à une malformation de l'email : altérations de voies de signalisation ou des facteurs transcriptionnels, atteinte des récepteurs ou de leurs ligands, autant de facteurs qualitatifs ou quantitatifs capables de perturber la formation de l'email (22, 23).

Les stades observés au cours de l'amélogénèse illustrent différents aspects de l'interface améloblaste-dent. Tout d'abord, la phase de pré-sécrétion est associée à une MB typique (20). Puis, durant la phase de sécrétion cette MB disparaît et les améloblastes produisent des

protéines qui participent de la minéralisation partielle de l'émail, qui aura son épaisseur définitive au bout de cette phase. Lors de la transition vers la phase de maturation, les améloblastes subissent des changements majeurs au niveau de leur taille et de leur architecture pour entamer la phase de maturation (23). Enfin, une structure analogue à la MB, nommée MB spécialisée (MBS), appelée aussi MB atypique, est formée pendant la phase de maturation, permettant de fixer les améloblastes à la surface minéralisée de l'émail (20, 24-26). Pendant cette étape, les améloblastes vont retirer la matrice organique et promouvoir la croissance des cristaux (23).

Récemment, des approches génomiques ont permis d'identifier les protéines produites par les améloblastes et de mieux caractériser la composition de la MBS présente à l'interface organe de l'émail-dent. Ces études ont identifié des composants spécifiques, tels que les protéines « *Odontogenic Ameloblast-associated* » (ODAM), « *Amelotin* » (AMTN) et « *Secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1* » (SCPPPQ1) (27, 28).

Ces protéines sont produites aussi par les cellules de l'épithélium de jonction (EJ). Ce dernier consiste en une couche de cellules incomplètement différenciées, qui est formée lors de la fusion entre l'épithélium de la muqueuse buccale et l'organe de l'émail au cours de l'éruption de la dent. (29). De ce fait, la MBS est ainsi la matrice extracellulaire associée à l'EJ permettant de fixer les tissus gingivaux à l'émail dentaire. Cette jonction forme la première ligne de défense contre les maladies parodontales (27, 28, 30).

Les études ont révélé que la MBS se distingue en composition des MBs typiques ; elle est enrichie en LM-332, mais ne contiennent ni de laminines contenant la chaîne $\gamma 1$, ni de collagène de types IV et VII (8, 31-34). Des mutations dans les gènes LM-332 sont impliquées dans la pathogenèse de l'hypoplasie de l'émail (1, 6).

2.1.2 - Laminine-332 :

Parmi les divers types de Laminines, la Laminine-332 (LM-332) est l'isoforme constituée par les chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$, codées respectivement par les gènes *LAMA3*, *LAMB3* et *LAMC2*. Cet hétérotrimère en forme de croix (voir Figure 2), sécrété par les cellules épithéliales est indispensable pour l'intégrité structurale et la fonction de la MB (9). LM-332 est un composant

adhésif majeur de la MB de l'épiderme et possède une structure distincte des autres laminines puisque ses bras sont courts, et que certains domaines sont absents de ses chaînes. Elle présente aussi des fonctions uniques, telles que la migration des cellules de l'épithélium de jonction durant son renouvellement, et aussi l'attachement de ces cellules à la dent via les hémidesmosomes (32, 35).

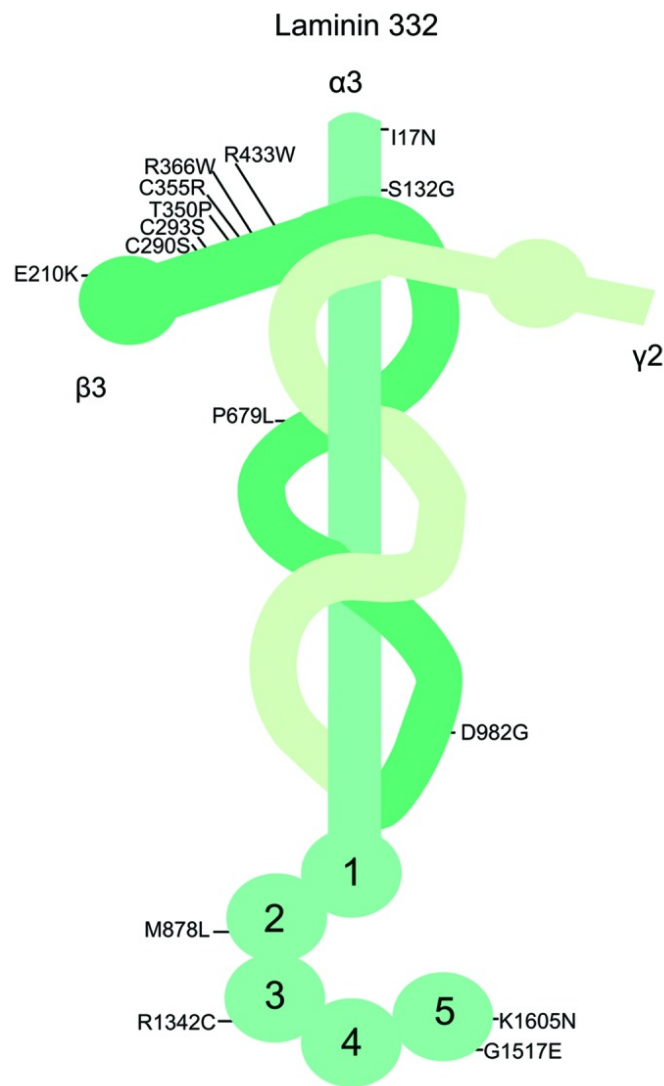


Fig. 2. Structure de la LM-332. Plusieurs sites sont ciblés pour les mutations menant à une fonction anormale de la LM-332 et causant des maladies, comme la JEB (19).

L'absence ou les anomalies d'expression de LM-332 chez la souris engendrent des défauts graves du développement, similaires à ceux observés dans l'Épidermolyse Bulleuse

Jonctionnelle humaine (JEB) (17). La JEB est définie comme un groupe de maladies, cliniquement et génétiquement hétérogènes, qui se caractérise par le détachement de l'épiderme, des blessures et bulles ou vésicules chroniques de la peau et ses annexes, ainsi que des muqueuses, induites mécaniquement à l'occasion d'un traumatisme mineur; on observe aussi une malformation dentaire chez les personnes atteintes de la JEB. Ce groupe de maladies est causé par des défauts dans la structure et l'expression des protéines de la MB, ainsi que de certaines protéines intra-épidermiques (19, 36).

Chez la souris, ces défauts provoquent une létalité précoce (17, 19, 36). Une suppression ciblée d'une des chaînes de la LM-332 entrave l'étude à long terme de ses fonctions, puisqu'elle entraîne la létalité de l'animal (10, 11).

Récemment, un modèle de souris transgénique qui exprime la LM-332 contenant une chaîne $\gamma 2$ humaine a été développé (FIG 2). Il permet d'éviter la létalité des souris *Lamc2*-KO et restaure les fonctions de la MB épidermique (12). Ces animaux ne présentent pas de lésions au niveau de la peau ou des muqueuses, ni dans d'autres organes épithéliaux, comme c'est le cas chez les souris déficientes en LM-332 (12, 17). Malgré l'apparente normalité et la survie de ces animaux, le retrait de l'antibiotique engendre de graves lésions tissulaires après les trois premières semaines et le décès à environ 3 mois d'âge (12, 13). Cependant, l'effet de la LM-332 humanisée sur les tissus durs, y compris les dents, n'a pas encore été examiné chez ces souris.

Les animaux *LAMC2*-Dox constituent un modèle de choix pour l'étude du rôle de la LM-332 dans la zone de maturation de l'émail dentaire où l'on retrouve une MB enrichie de LAMC2.

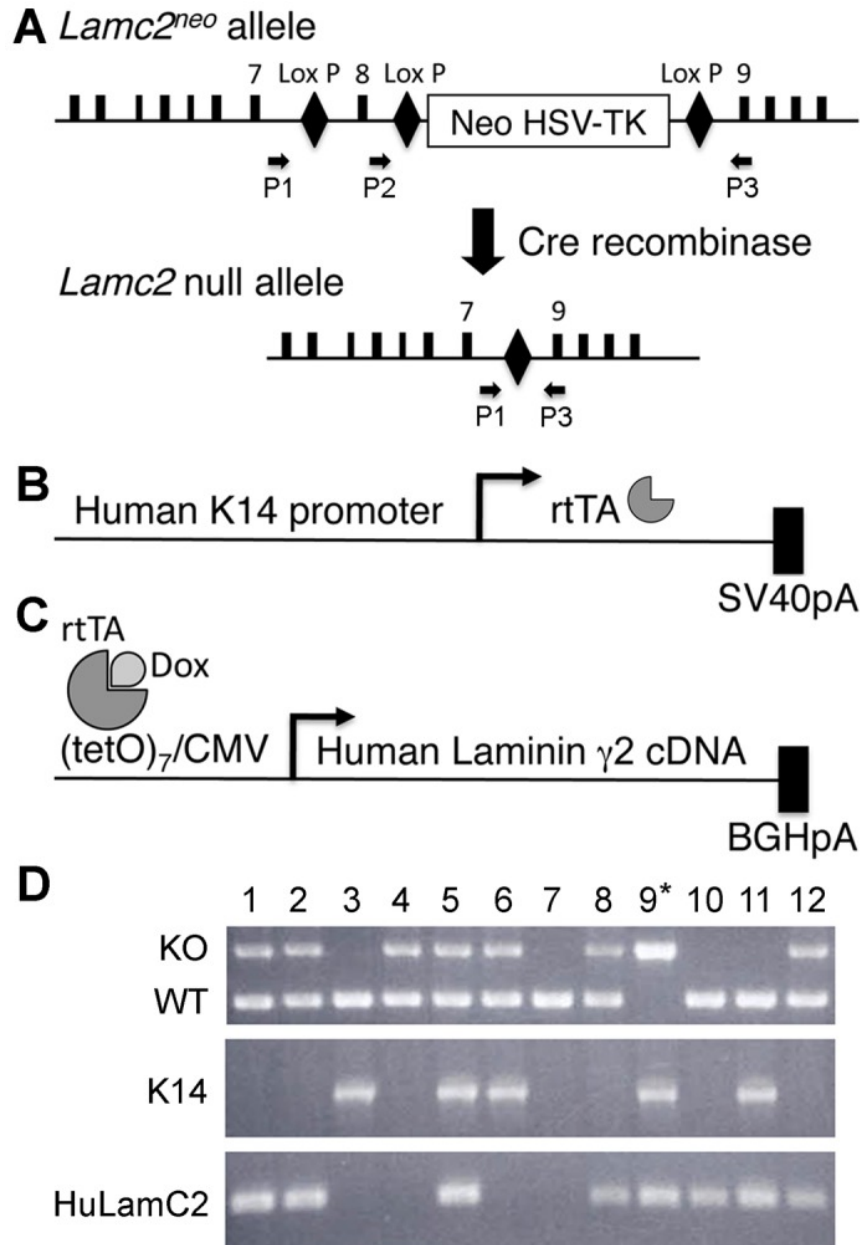


Fig. 3. Schéma de la construction du transgène de la souris *LAMC2-dox*. Après la création d'un allèle nul pour le *Lamc2* et l'insertion du promoteur CK-14 et du cDNA de la chaîne γ 2 humaine, la liaison de la Dox au rtTA permet l'expression de la LAMC2 humaine. L'analyse par PCR confirme que chez ce transgène conditionnel, il est possible de réprimer ou entraîner son expression sous l'effet de la Dox (12).

2.2 – Modèles expérimentaux transgéniques – un aperçu

L'étude des maladies humaines est souvent limitée par l'absence de modèles animaux robustes, efficaces et capables de reproduire leurs caractéristiques. Pour bien adresser cette problématique, un animal doit avoir une progéniture abondante, une taille réduite, un développement rapide et un entretien facile (37, 38). La souris (*Mus musculus*) présente de telles caractéristiques et représente un modèle de choix pour reproduire les changements génétiques à l'origine des maladies humaines. Les études chez la souris ont fourni de précieuses informations scientifiques au cours des dernières décennies (37, 39, 40).

La souris est devenue l'organisme modèle le plus fréquemment utilisé pour l'étude de la physiologie et de la pathologie humaines. La génétique moléculaire de la souris a été raffinée pour permettre la production d'une gamme de mutants utiles en recherche. Ceux-ci comprennent des additifs transgéniques, des souris « *knock-in* » et « *knock-out* » (avec des mutations conditionnelles ou inductibles), ces réarrangements ou suppressions génétiques permettant des conditions d'étude analogues aux conditions chez l'humain (39).

En effet, les modèles de souris knockout (celles qui n'expriment pas une protéine donnée), les modèles transgéniques (qui sur-expriment une certaine protéine de type sauvage ou mutée) et des mutants (exprimant une protéine modifiée) ont apporté des informations inestimables pour comprendre le métabolisme de l'améloblaste et ses effets sur l'amélogénèse (1). Des études chez la souris ont apporté d'importantes avancées liées à la pathogénèse de différents types de malformations de l'émail, par exemple lors du développement de l'Amélogénèse Imparfait (AI) humaine (41). Une autre étude avec des souris KO d'ODAM a montré son rôle dans le maintien de l'intégrité de l'attache épithéliale autour de la dent (30).

2.2.1 – Modèles humanisés : avantages et limites

Plusieurs lignées de souris transgéniques humanisées bien caractérisées ont été établies. Comme les protéines ayant une séquence humaine d'acides-aminés peuvent présenter les caractéristiques biochimiques de leurs homologues de la souris, des animaux transgéniques sont construits avec des séquences codantes de gènes humains, introduites dans le génome la souris. Par contre,

l'humanisation comporte toujours des risques, puisque même avec une approche précise du profil d'expression du transgène humain, son fonctionnement dans le contexte de la souris ne peut pas toujours être assuré (38, 39).

Développer de nouvelles approches pour l'humanisation génomique est un défi mais de nouvelles technologies semblent prometteuses. Une question clé sur les souris humanisées concerne l'efficacité de la machinerie transcriptionnelle de la souris pour la lecture de la séquence d'ADN humain. Quand un chromosome humain est intégré au génome de la souris, la séquence d'ADN humain est associée à des modifications qui peuvent influencer les fonctions physiologiques de la protéine produite (39).

Par conséquent, des expériences effectuées uniquement chez la souris ne peuvent pas toujours reproduire avec précision les résultats obtenus chez l'homme. Bien que les modèles de souris génétiquement humanisées aient un grand potentiel, il faut apprécier les limites et les contraintes du modèle. Il est important de se rappeler qu'un modèle de souris génétiquement humanisée concerne l'étude d'une protéine chez une souris et non chez un être humain (38, 40). Quoiqu'il en soit et malgré les limites décrites ci-dessus, les modèles de souris génétiquement humanisés engendrent un intérêt évident et un énorme potentiel pour approfondir notre compréhension des maladies humaines et développer de nouvelles approches pour la prévention, le dépistage et le traitement de ces maladies (38).

Chapitre 3 – Matériel et méthodes

Toutes les procédures concernant les manipulations des souris ont été approuvées par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal. (ANNEXES 1 et 2)

3.1 – Génération et génotypage des souris *LAMC2-Dox*

Un modèle de souris déficiente en *LAMC2* a été développé par nos collaborateurs (12) afin d'étudier le rôle de cette protéine dans la MB. Les animaux *Lamc2*-KO ont été secourus par l'ajout d'un transgène *LAMC2* humain et son expression, inductible par l'absorption de doxycycline (*LAMC2-Dox*) sous le contrôle du promoteur CK-14, a permis d'utiliser ce modèle (12).

Les souris *LAMC2-Dox* ont reçu de façon continue la doxycycline (Dox) lors de leur abreuvement (1 mg / ml avec 5% de saccharose, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) ou lors de leur alimentation (3,5-4,4 mg par jour, Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) afin d'induire l'expression de la protéine *LAMC2* humaine. Deux groupes contrôles ont été établis avec les souris C57BL/6 (Charles Rivers Canada ; St-Constant, QC, Canada) utilisées pour le développement d'animaux transgéniques et congéniques. Le premier groupe était composé de deux portées de deux souris sauvages (WT) - femelles en gestation (jour 14) qui ont reçu le même régime Dox. Au moment du sacrifice, ce groupe consistait de douze souris traitées à la Dox durant une période de 8 semaines. Le second groupe contrôle comprenaient également des souris C57BL/6, ayant reçu une alimentation régulière, sans ajout de Dox. Les souris ont été logées dans une installation stérile adaptée, dans des cages ventilées où l'eau, la nourriture et la literie ont toujours été autoclavées.

Le génotypage a été effectué par analyse PCR de l'ADN génomique extrait de la queue de la souris, en utilisant les amorces suivantes :

- allèle *Lamc2* de souris (5'AGCTAATACGGGTTTCAGCC3 '(sens) et 5'
TGTAACCAGAAGCACATTCC3 '(anti-sens)) ;

- allèle *LAMC2* humaine (5 'AGGCTGTCCAACGAAATGGG3' (sens) et 5'GGAGCTGTGATCCGTACACCA3 '(anti-sens)) ;

- et allèle cytokératine 14 - gène rtTA (5 'GTCCGATGGGAAAGTGTAGCCTG3' (sens) et 5'TTTCTTCTTTAGCGACTTGATGC3 '(anti-sens)).

3.2 – Préparation des tissus pour la microscopie optique, microscopie électronique et micro-tomographie

Des souris de 8 à 16 semaines d'âge ont été anesthésiées avec une solution 20% de hydrate de chloral (0,4 mg/g de poids corporel ; Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada). Elles ont été sacrifiées par perfusion à travers le ventricule gauche avec du lactate de Ringer (Abbott Laboratories, Montréal, QC, Canada) pendant 30 secondes, puis par une solution de fixation constituée de 4% de paraformaldehyde (BDH, Toronto, ON, Canada) et 0,1% de glutaraldéhyde (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) dans un tampon phosphate 0,1M (PB, pH 7,2) pendant 10 min. Les mandibules et maxillaires des animaux sauvages et *LAMC2*-Dox ont été disséqués puis immergés dans la même solution de fixation pendant 3h. Les échantillons ont été rincés dans le PBS pendant une nuit à 4°C. Les tissus mous des animaux WT et *LAMC2*-Dox, tels que la langue, le palais et la peau, ont été soumis à la même préparation que les mâchoires pour l'histologie et microscopie optique.

Une partie des échantillons des tissus durs a été décalcifiée avec 4,13% EDTA (éthylènediamine disodium tétra-acétique, Fisher Scientific), solution aqueuse, tel que précédemment décrit par Wazen *et al*, 2015 (42).

Certains spécimens décalcifiés ont été traités pour l'enrobage dans la paraffine. Des coupes de 5 micromètres (μm) d'épaisseur ont été préparés avec un microtome Leica RM 2155 (Leica Microsystems Canada, Richmond Hill, ON, Canada) et montés sur les lames SuperFrost® / Plus (Fisher Scientific). Ces coupes ont été colorées à l'hématoxyline (Ricca Chemical Company) et l'éosine (Sigma Chemical Company) pour les analyses morphologiques, ou préparées pour la coloration et incubation avec l'immuno-peroxydase (Dako Corporation, Carpinteria, CA) et pour l'immunofluorescence.

D'autres échantillons ont été traités pour l'enrobage dans la résine LR-White (London Life, Compagnie résine ; Berkshire, Royaume-Uni), ainsi que dans la résine Époxy (Electron Microscopy Sciences) tel que précédemment décrit par Wazen *et al*, 2015 (42). Ces échantillons ont été coupés en coupes semi-minces d'1µm, à l'aide d'un ultra-microtome (Reichert Jung Ultracut-E) avant d'être colorées avec le bleu de toluidine. Des coupes ultraminces, de 80-100 nanomètres (nm) ont été transférées sur des grilles de nickel de 200 mailles. Ces grilles ont été précédemment revêtues d'un film de Formvar® (vinyle formate) puis colorées avec une solution 4% uranyl acétate pendant 8 min et avec une solution de citrate de plomb pendant 2 min. Les grilles ont été examinées au microscope électronique à transmission (MET) FEI Tecnai 12 (FEI, Eindhoven, Pays-Bas), à 80 kV.

3.3 – Immunohistochimie

L'immunohistochimie a été réalisée sur les coupes de 5µm à température pièce. Brièvement, les coupes déparaffinées ont été bloquées 20 min avec une solution constituée de tampon phosphate 0,01 M (PBS, pH 7,2) et 5% de lait en poudre (Carnation, Nestlé, Don Mills, ON, Canada), suivi d'un traitement avec la trousse peroxydase Dako EnVision +™, (Dako Corporation, Carpinteria, CA) selon les recommandations du fabricant. Les coupes ont subi une incubation de 3h avec l'anticorps primaire : - (ODAM lapin anti-rat (1: 10000) (Moffatt et al., 2008); - AMTN lapin anti-rat (1: 2000) (Moffatt et al., 2006b); - SCPPPQ1 lapin anti-rat (1: 2000) (Moffatt et al., 2014); - Albumine lapin anti-rat (1: 2000, ICN Pharmaceutical, Aurora, OH); ou LM-332 lapin anti-humain (1: 100, Abcam, Toronto, ON, Canada). Les anticorps primaires ont été rincés avec une solution constituée de 0,01 M de PBS, pH 7,2, contenant 0,05% de Tween 20 (Fisher Scientific) (0,01 M PBS - Tween 20) pendant 20 minutes (2X 5 minutes et 1X 10 minutes). L'incubation avec les anticorps secondaires a été faite avec la solution 2 de la trousse Dako EnVision +™, (Dako Corporation, Carpinteria, CA) selon les recommandations du fabricant. Les anticorps secondaires ont été lavés avec une solution constituée de 0,01 M de PBS, pH 7,2, contenant 0,05% de Tween 20 (Fisher Scientific) (0,01 M PBS - Tween 20) pendant 20 minutes (2X 5 minutes et 1X 10 minutes). La réaction a été révélée avec la 3,3'-diaminobenzidine et

contre-colorées avec le vert de méthyle (Dako Corporation, Carpinteria, CA). Les coupes ont été examinées au microscope AxioImager M2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

D'autres coupes ont été traitées pour l'immunofluorescence. Les coupes ont été bloquées pendant 1h dans du PBS contenant 5% de lait en poudre suivi d'une incubation de 3h avec les anticorps primaires (anti-AMTN, ODAM et/ou SCPPPQ1), et par la suite, de l'incubation dans le noir des anticorps secondaires chèvre-anti-lapin Alexa Fluor 488 et/ou 594 (1:500, 1h, Life Technologies TM, Mississauga, ON, Canada). Entre chaque étape, les lames ont été lavées trois fois pendant 10 minutes avec du PBS-Tween (0,05% (v/v)). Les coupes ont finalement été montées avec une solution de montage contenant du DAPI (ProLong Gold antifade reagent - Life Technologies TM) pour colorer les noyaux. Les contrôles négatifs comprenaient une omission de l'anticorps primaire et l'incubation avec le sérum pré-immunisé. Les coupes ont été examinées au microscope AxioImager M2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) en fluorescence, ainsi qu'au microscope Elyra PS1 avec l'option « *Structured Illumination Microscopy* » (SIM) (Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

Chapitre 4 – Article

4.1 – Résultats publiés et contribution à la recherche

Le modèle animal *LAMC2*-Dox a été établi à l'Université de Montréal par Dre. Rima Wazen, assistante de recherche du Dr Antonio Nanci, qui a exécuté les études pilotes nécessaires à mon projet.

J'ai par la suite participé aux différentes étapes de l'étude menant à la publication de l'article, comprenant :

- 1 - l'entretien dans l'animalerie et l'euthanasie des animaux, incluant la perfusion intracardiaque, la dissection et la préparation des tissus à utiliser ;
- 2 - la préparation des solutions et d'échantillons, pour l'enrobage en paraffine, en résine LR-White et en résine Époxy ;
- 3 - les coupes en paraffine et ouverture des blocs pour les coupes semifines ;
- 4 - les colorations en HE, ainsi que l'immunohistochimie utilisée pour les expériences ;
- 5 - l'analyse et prise d'images en microscopie optique, en fluorescence et électronique ;
- 6 - la préparation de figures et la rédaction de la première version de l'article.

Pour ma formation et l'exécution de mon travail j'ai bénéficié de la supervision directe de Dre Rima Wazen et du Dr Antonio Nanci.

Le projet a aussi compté sur l'aide et la collaboration d'autres membres du laboratoire, ainsi que d'autres chercheurs de différentes institutions, au Canada et aux États-Unis.

Par rapport à l'article, ma contribution a été considérée égale à celle de deux autres premiers auteurs.

Wazen RM, Viegas-Costa LC, Fouillen A, Moffatt P, Adair-Kirk TL, Senior RM, Nanci, A. Laminin gamma2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel

maturation defects. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology. 2016.

[Matrix Biol.](#) 2016 Mar 5. pii: S0945-053X(16)30025-7. doi: 10.1016/j.matbio.2016.03.002.

4.2 – Transfert de connaissance et vulgarisation de la recherche

Présentation par affiche

Viegas-Costa LC, Wazen RM, Fouillen A, Moffatt P, Adair-Kirk TL, Senior RM, Nanci, A. Laminin gamma2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects.

J'ai présenté mes résultats de recherche pendant la Journée scientifique 2016 du RSBO, le 11 mars à l'Hôpital Shriners pour enfants, à Montréal. Le travail a été présenté aussi dans les « Journées dentaires internationales du Québec » qui ont eu lieu au Palais des congrès de Montréal les 30 et 31 mai 2016.



Journées dentaires
internationales
du Québec

CONGRÈS ANNUEL
DE L'ORDRE DES DENTISTES
DE QUÉBEC

Le 29 avril 2016

M. Luiz Claudio Viegas Costa



Cher monsieur Viegas Costa,

La présente confirme l'acceptation de votre présentation affichée lors des Journées dentaires internationales du Québec qui auront lieu au Palais des congrès de Montréal les 30 et 31 mai 2016.

Le titre de votre affiche :

Laminin Y2 knockout mice rescued with the human protein exhibit enamel maturation defects

L'installation des affiches scientifiques se fera dimanche le 29 mai entre 13 h et 17 h. Vous pourrez vous présenter à madame Marie Tétreault au comptoir d'inscription situé dans le hall Viger et elle vous indiquera l'endroit où sera présentée votre affiche qui porte le numéro 1, et vous remettra le matériel pour l'installation de l'affiche.

Espérant le tout à votre convenance, je vous prie de recevoir l'expression de mes sentiments les meilleurs.



Denis Forest, DDS, MSD
Directeur JDIQ


LE DENTISTE.
LE DOCTEUR QUI VEILLE
SUR VOTRE BOUCHE



Laminin $\gamma 2$ 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. [REDACTED]

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

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.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

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 shows 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 struc-

turing of the atypical BM during the maturation stage, and that this interfacial structure is essential for enamel maturation.

Results

Visual and micro-computed tomographic analyses

As compared to age-matched WT mice (Fig. 1A, 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. 1E, F). Comparative sagittal and coronal tomographic views revealed that the enamel is also severely abraded indicating that the enamel was softer (Fig. 1C vs 1G, 1D vs 1H). There was an increase in periodontal space between the labial aspect of the incisor and alveolar bone (Fig. 1G, 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).

Histological and structural changes in amelogenesis in *LAMC2*-Dox mice

Major defects in amelogenesis were observed in both maxillary and mandibular incisors of *LAMC2*-

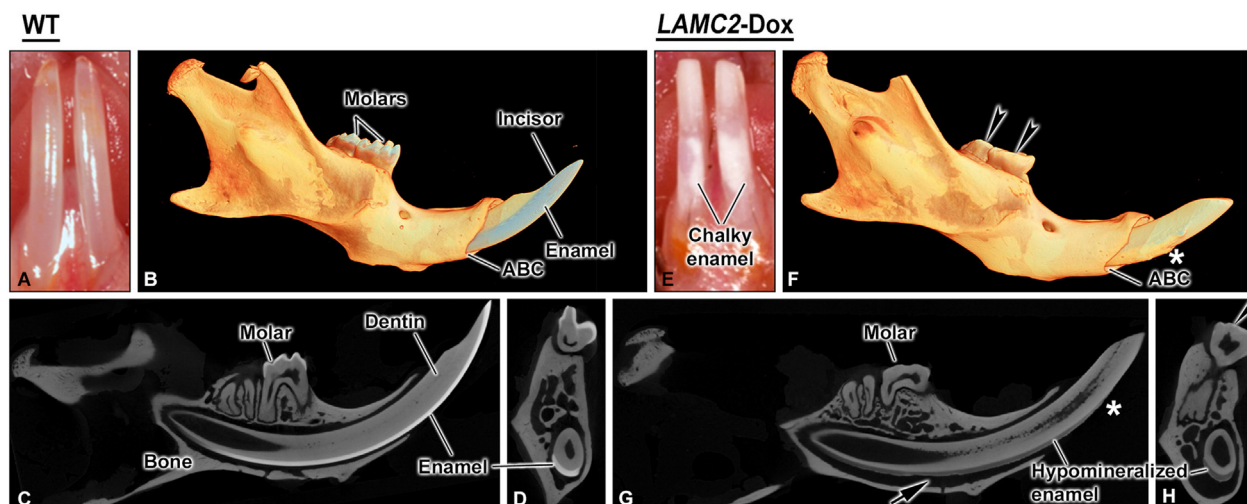


Fig. 1. Comparative micro-CT views of hemimandibles from wild type (WT, A-D) and human *LAMC2*-rescued transgenic mice (*LAMC2*-Dox) (E-H) mice. B, F tomographic reconstructions; C, G, sagittal sections; D, H, cross-sectional views taken at matching physical locations. Visual inspection (A, E) in live mice reveals the presence of chalky enamel patches on the erupted portion of incisors in *LAMC2*-Dox mice (E). Molars from these mice are excessively abraded and cuspal surfaces (arrowheads) are flattened (F, H). Enamel in *LAMC2*-Dox mice is hypomineralized (G, H) and frequently flakes off (*) at incisor tips (G). Note the augmented periodontal space (arrows) on the labial aspect of the incisor. ABC, Alveolar bone crest.

Dox mice (Fig. 2C, D) as compared to normal WT amelogenesis (Fig. 2A, B). In *LAMC2*-Dox mice, there were no obvious histological changes in amelogenesis during the pre-secretory stage and mantle dentin formation (Fig. 2A vs 2C). However, organization of the maturation stage ameloblasts and of the other associated enamel organ cells was severely altered (Figs. 2D, 3) as compared to WT mice (Fig. 2A-B). The disruption in cellular organization and ameloblasts polarity (Figs. 2D, 3A-C), the presence of dystrophic matrix among cells of the enamel organ and in the enamel layer (Fig. 3C), and the persistence of enamel matrix up to the gingival margin (Fig. 3D) 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. 1), residual enamel matrix extended beyond the alveolar bony

crest, and in some cases up to the gingival margin (Fig. 3D).

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

Immunohistochemistry

Incubations intended to map the localization of *LAMC2* in the maturation stage of amelogenesis in

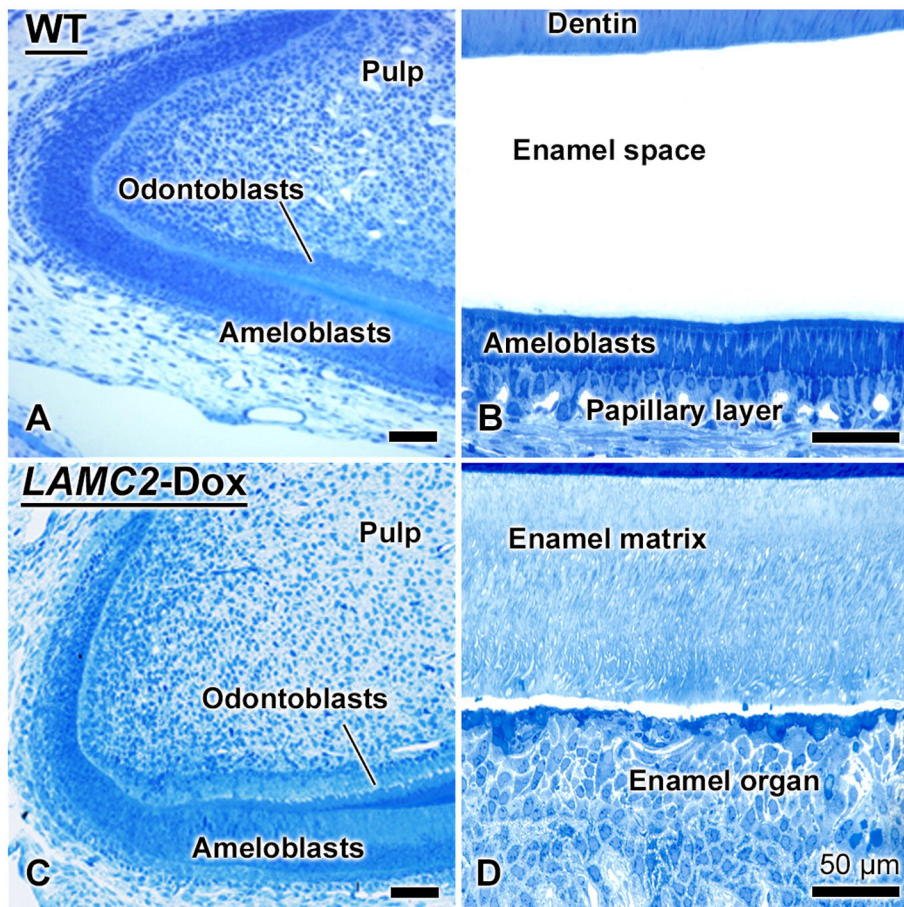


Fig. 2. During amelogenesis, there is a typical basement membrane along the apical surface of differentiating ameloblasts while during the maturation stage an atypical one is recreated at the interface between ameloblasts and enamel. There is no difference in the pre-secretory histology between wild 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.

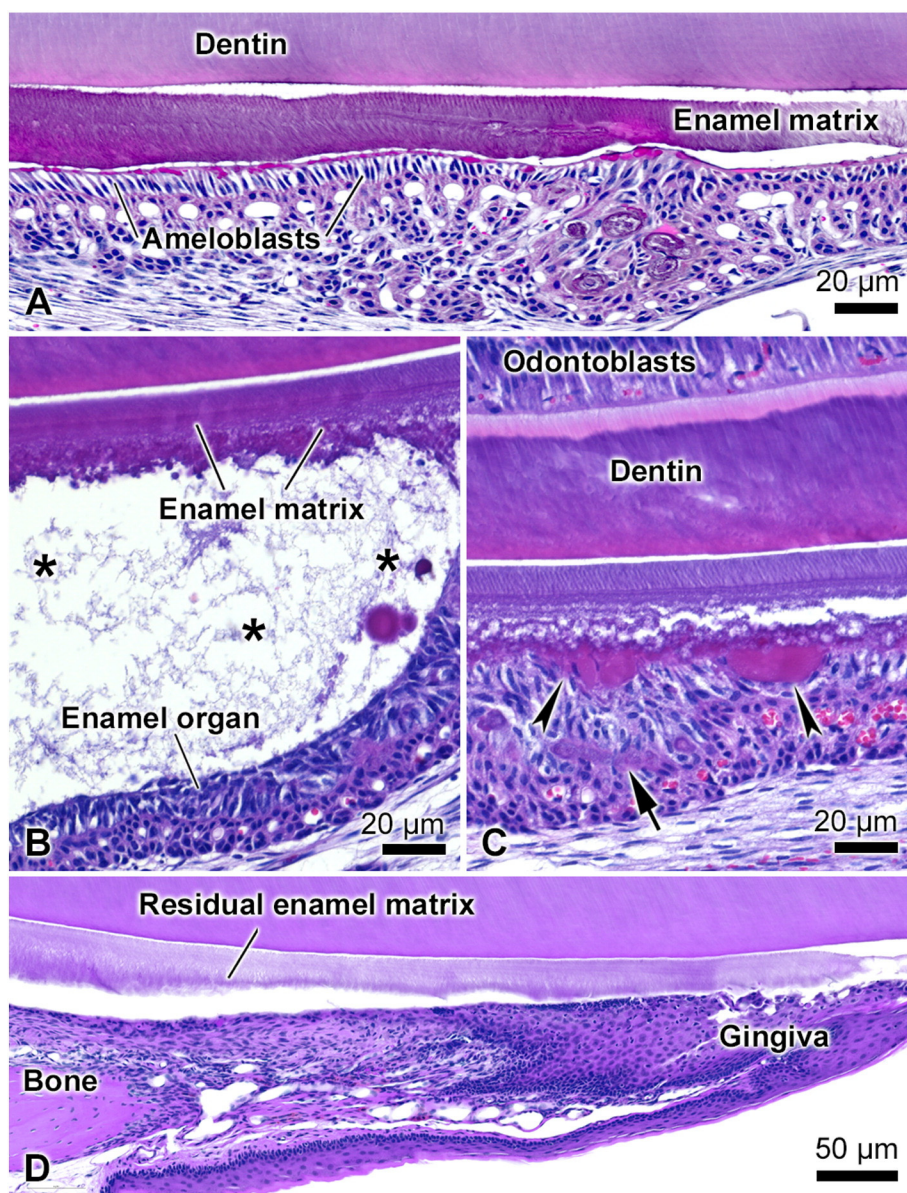


Fig. 3. Photomicrographs from hematoxylin and eosin stained histological sections of *LAMC2*-Dox mice incisors. Entering the maturation stage, ameloblasts gradually lose their columnar appearance, the enamel organ becomes disorganized and its individual cell layers are eventually no longer discernable (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).

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. 5A). However, in *LAMC2*-Dox mice, even though there were groups of enamel organ cells immunoreactive for LAMC2, there generally was no such accumulation (Fig. 5B). Some staining, above background, was also seen over enamel matrix (Fig. 5B). In soft epithelial tissues, the typical BM region separating epithelial

cells and the underlying connective tissue was conspicuously labeled (Fig. 5C).

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. 6A, B) and *LAMC2*-Dox mice (Fig. 6C, D). Distinctively from WT mice (Fig. 6A, B), albumin was found in maturing

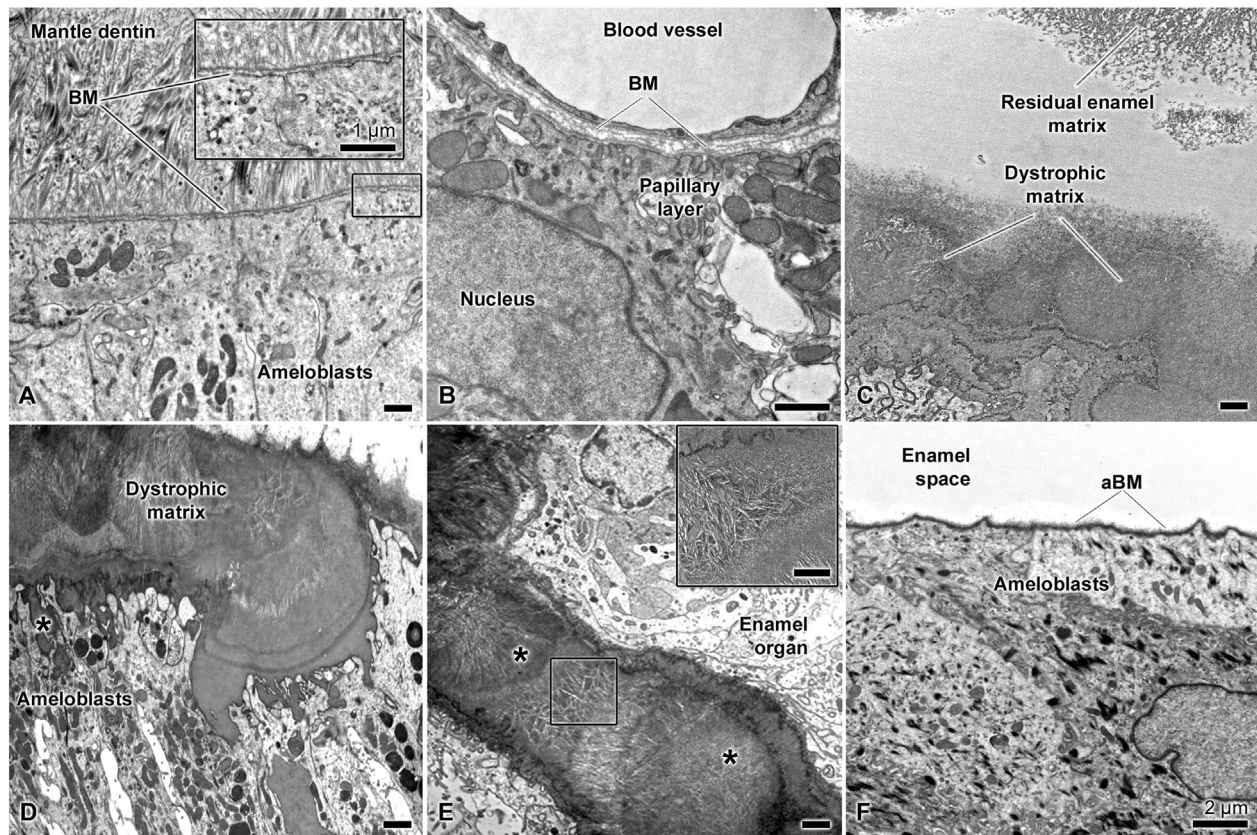


Fig. 4. Transmission electron micrographs of *LAMC2*-Dox mice incisors. In these human *LAMC2* rescued mice, the typical basal membrane (BM) separating differentiating ameloblasts from the forming mantle dentin during the pre-secretory stage (**A**, inset), and that associated with blood vessels and 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 (aBM) structure can be identified during the maturation stage in these *LAMC2*-Dox mice.

enamel matrix of *LAMC2*-Dox mice (Fig. 6C, 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. 7), the staining patterns for AMTN (Fig. 7A, B), ODAM (Fig. 7C, D) and SCPPPQ1 (Fig. 7E, 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.

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

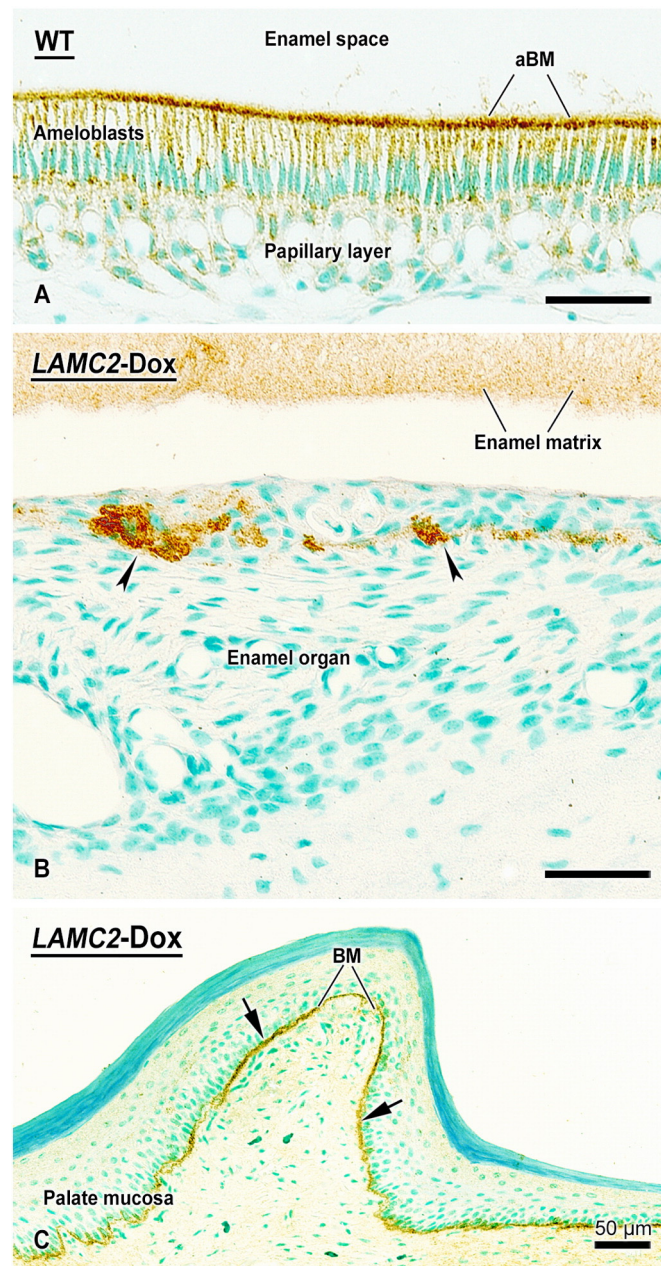


Fig. 5. Immunolocalization of laminin-332. In wild type mice (WT), a discrete immunolabeling is present along the apical surface of ameloblasts where an atypical basement membrane (aBM) is found (**A**). In human *LAMC2*-rescued transgenic (*LAMC2*-Dox) mice, the organization of the enamel organ is severely 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.

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 cal-

cifies 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

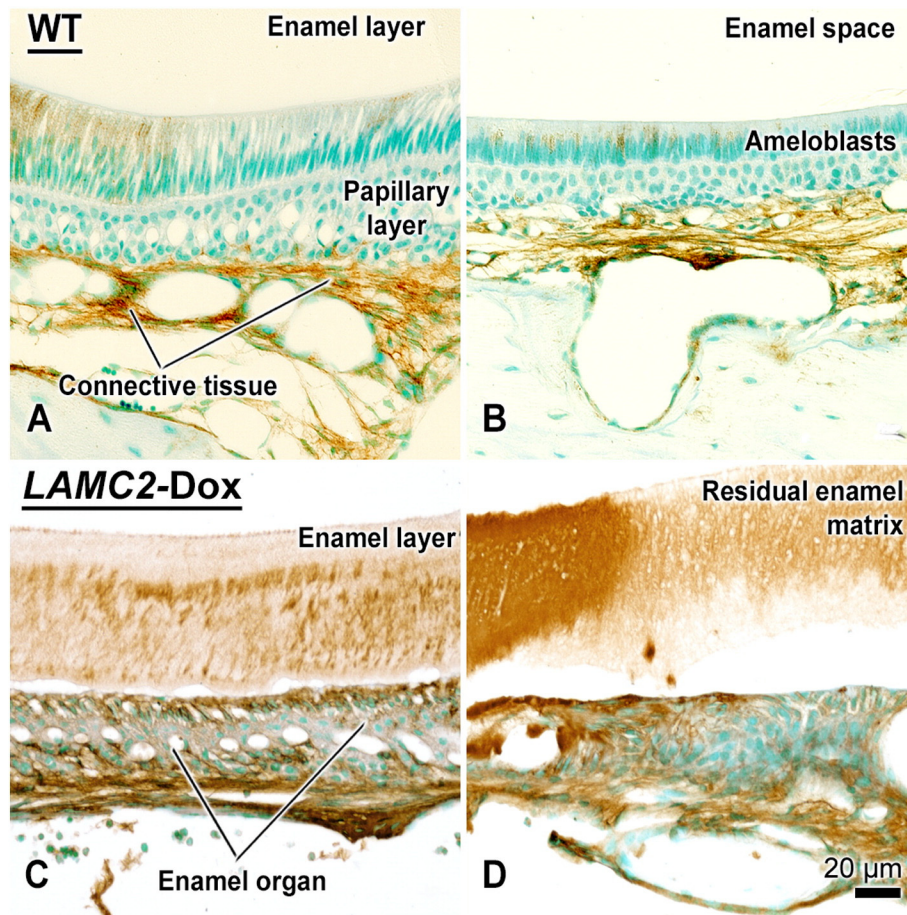


Fig. 6. Immunolocalization of albumin in wild type (WT, **A-B**) and human *LAMC2*-rescued transgenic (*LAMC2*-Dox) mice (**C-D**). In both cases, albumin was found among the cells of the enamel organ and in cells of the papillary layer. No significant staining for albumin is normally seen in maturing enamel of WT mice (**A, B**) but it is detected in the enamel matrix of *LAMC2*-Dox mice (**C, D**). Counterstain is methyl green.

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

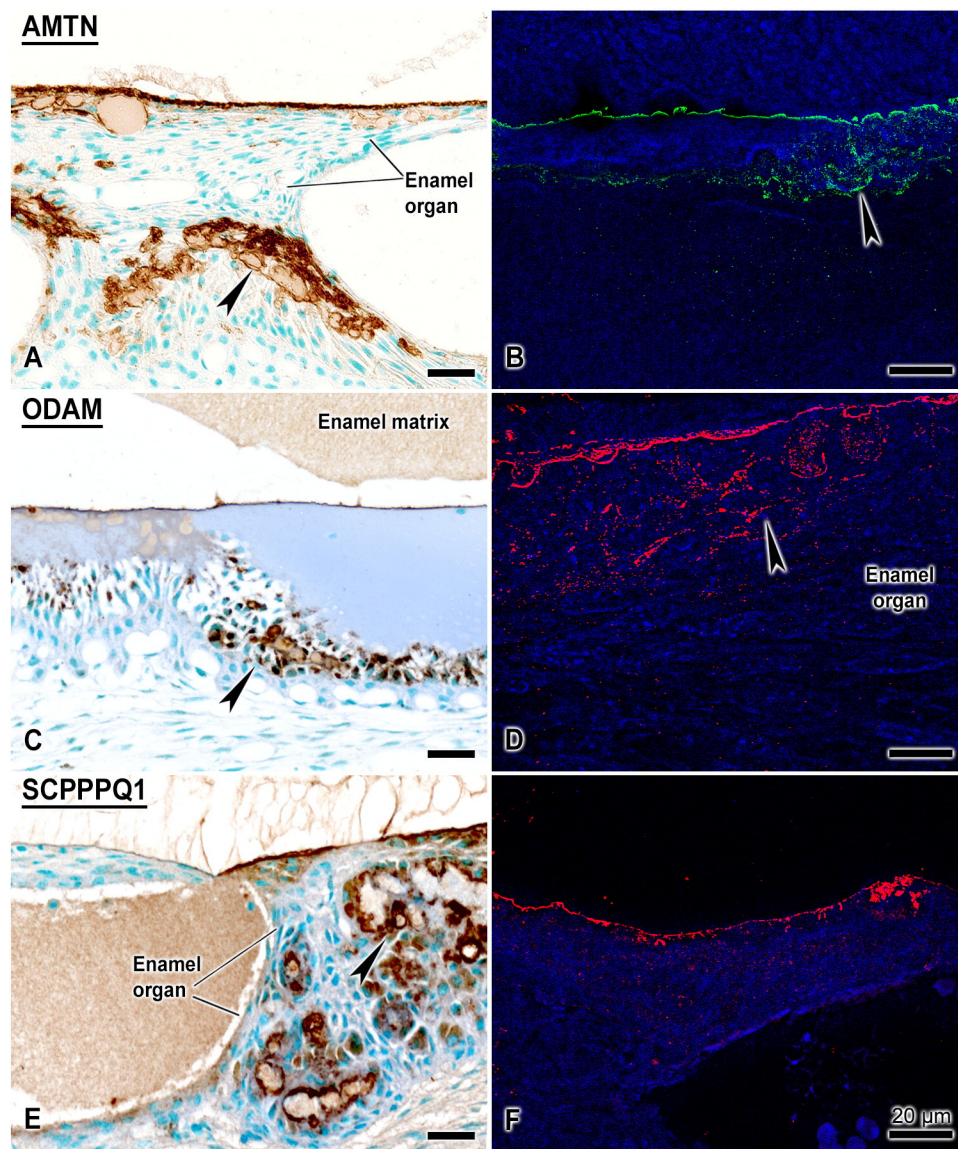


Fig. 7. Immunohistochemical preparations for amelotin (AMTN, **A-B**), odontogenic ameloblast-associated (ODAM, **C-D**) and secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1 (SCPPPQ1, **E-F**) during maturation in *LAMC2*-Dox mice incisors. All three proteins are present at the interface 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**.

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, ODA, 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].

Materials and methods

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

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]. *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.

Genotyping was done by PCR analysis of genomic DNA extracted from mouse tail clips, using the following primers: mouse *LAMC2* allele (5'AGCTAA-TACGGGTTTCAGCC3' (forward) and 5' TGTAACCA-GAAGCACATTCC3' (reverse)); human *LAMC2* allele (5' AGGCTGTCCAACGAAATGGG3' (forward) and 5'GGAGCTGTGATCCGTACACCA3' (reverse)); and cytokeratin 14- rTA gene (5' GTCCGATGG-GAAAGTGTAGCCTG3' (forward) and 5'TTCTTCTTTAGCGACTTGATGC3' (reverse)).

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

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 SkyScan) was used for the creation of 3D models.

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, contain-

ing 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 Axiolmager 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).

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.

Received 5 January 2016;

Received in revised form 3 March 2016;

Accepted 3 March 2016

Available online xxxx

Keywords:

Amelogenesis;
Basement membrane;
Enamel maturation;
Humanized mouse model;
Laminin γ 2

These authors contributed equally to the work.

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 immunohistochemical 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. Hrcic, 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. Invest.* 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. Loidice, 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.

Chapitre 5 – Discussion

Cette étude a exploité un modèle de souris transgénique exprimant la LAMC2 humaine sous le contrôle de la doxycycline (Dox) afin d'étudier le rôle de la LM-332 sur la structuration de la MBS présente à l'interface entre l'organe de l'émail et l'émail en maturation.

Nos résultats montrent qu'en absence d'atteinte de la peau et des muqueuses, les souris *LAMC2-Dox* présentent des altérations dentaires similaires à celles retrouvées chez les souris et les humains affectés par des mutations de la LM-332 (FIGs 4 et 5 – ANNEXE 3), par exemple dans l'Amélogénèse Imparfaite (*Amelogenesis Imperfecta* – AI) (19, 43, 44). Les malformations dentaires observées chez les souris *LAMC2-Dox* sont cohérentes avec la littérature au sujet de la JEB (FIGs 4 et 5 – ANNEXE 3).

La signalisation cellulaire médiée par la LM-332 joue un rôle essentiel pour l'adhérence, la survie et la migration cellulaire, ainsi que la régénération épithéliale. À travers des interactions spécifiques avec les intégrines $\alpha 6\beta 4$ et $\alpha 3\beta 1$, aux hémidesmosomes et aux surfaces des kératinocytes, respectivement, LM-332 participe du mécanisme d'ancrage de la MB présente à l'interface derme-épiderme. En addition à ce rôle structurel, ces interactions modulent aussi le métabolisme épithélial par la transmission de l'information aux kératinocytes (« *outside-in signaling* ») (19).

Un schéma montrant les positions où éventuellement les mutations peuvent avoir lieu, et qui changent la fonctionnalité de la LM-332 dans l'occurrence de la JEB, est illustré dans la FIG 2 (19). Par conséquent, des anomalies dans l'un ou l'autre des processus mentionnés en dessus font partie de la pathogénèse de la JEB (19). Les dents des patients atteints de cette maladie possèdent moins de minéraux, une surface poreuse, et une tendance à l'attrition et à la dissolution lorsqu'elles sont à l'exposition à l'environnement buccale (45, 46).

Chez les souris transgéniques de ce modèle, l'expression conditionnelle de la LAMC2 humaine permet de contourner la létalité précoce, qui est associée aux mutations de l'une ou l'autre des chaînes de la LM-332 (19). La recomposition de la membrane basale (MB) entre les tissus épithéliaux et les tissus conjonctifs sous-jacents permet de rétablir l'homéostasie de ces tissus, comme en témoigne leur apparente normalité.

Néanmoins, la formation dentaire a été perturbée, en particulier lors de la phase de maturation de l'émail. Cette dernière se caractérise par l'élimination presque complète de l'eau et des protéines, suivie d'une déposition accrue de minéraux et d'une expansion du volume des cristaux survenant lors de la phase de sécrétion (47). Au début de la maturation, les améloblastes changent de forme, cessent graduellement de produire les protéines de l'émail et débutent la sécrétion des enzymes responsables du retrait de la matrice organique de l'émail (47, 48). À ce moment, une nouvelle MB est structurée à l'interface entre les améloblastes et l'émail, et porte le nom de Membrane Basale Spécialisée (MBS) (12). Dès lors, les améloblastes subissent une réorganisation et une alternance morphologique, connue comme modulation, ainsi qu'un contrôle du pH du système. Cela se fait de façon à permettre le retrait de l'eau et de la matrice organique, ainsi que l'introduction de matériel inorganique additionnel, menant au durcissement de l'émail (1, 47, 48). La MBS néoformée se distingue de la MB typique par l'absence de collagène IV et VII ; elle se compose plutôt de LM-332, AMTN, ODAM et SCPPPQ1. Ces trois dernières protéines sont de nouvelles composantes de la MBS et appartiennent au groupe de gènes SCPP. Ce groupe contient un certain nombre de gènes codants pour des protéines qui stabilisent les ions Ca^{2+} et PO_4^- dans les fluides corporels et/ou guident l'accumulation de sels minéraux dans les matrices extracellulaires propices, comme les tissus calcifiés (49-51). En outre, l'expression d'AMTN, ODAM et SCPPPQ1 est liée au fait que la MBS s'attache au tissu minéralisé, plutôt qu'au conjonctif (27, 28, 30). Ceci se traduit par des différences fondamentales entre la MB, observée dans la phase de pré-sécrétion à l'interface entre les pré-odontoblastes et les pré-améloblastes donc dépourvue de minéraux, et la MBS, au stade de maturation et par la suite, quand l'émail est déjà présent à la surface de la dent (20, 25, 26).

En effet, le rôle de la LM-332 durant l'amélogénèse n'est pas encore tout-à-fait clair. Dans la zone de pré-sécrétion, la LM-332 présente dans la MB jouerait un rôle dans la différenciation cellulaire (14).

En plus de valider ce rôle, le modèle permet de vérifier l'hypothèse que la LM-332 et ses produits secondaires soient considérés comme des composants importants pour la formation de l'émail, même en absence d'une MB pendant la sécrétion (25, 26, 45, 52). Cette hypothèse pourra être vérifiée lors de l'analyse des animaux *LAMC2-Dox*, cependant en absence de la diète avec la doxycycline, l'équivalent à des animaux *Lamc2-KO* (*LAMC2-Off-Dox*). Par la suite,

durant la maturation, les interactions entre les améloblastes et la surface de l'émail en maturation sont régulées par les améloblastes eux-mêmes, ainsi que par un assemblage protéique dynamique et structuré, ou bien la MBS. En somme, il y a tout un ensemble de facteurs capable de maintenir la différenciation et la fonction de façon unique, dont la LM-332 semble un composant majeur à cet égard (26). Par conséquent, des mutations dans les gènes de la LM-332 ont été liées à la pathogénèse de la malformation de l'émail, via plusieurs mécanismes (1).

Nos résultats démontrent que l'expression de la chaîne LAMC2 humaine chez la souris exerce peu d'influence sur les événements associés à la MB « typique » de la dent, notamment durant la phase de pré-sécrétion. Cela confirme ce qui a été rapporté pour les autres épithéliums des tissus mous (12, 13), puisque la peau, le palais et la langue sont normaux chez nos animaux transgéniques. Toutefois, ce changement altère considérablement la maturation de l'émail. L'organisation de l'organe de l'émail est profusément altérée, entraînant une matrice organique dystrophique dans la couche d'émail et entre les cellules de l'organe de l'émail. Parfois, la matrice dystrophique s'accumule selon un patron concentrique, semblable à la substance amyloïde retrouvé dans les tumeurs épithéliales odontogéniques calcifiées (CEOT). Néanmoins, il faut être prudent dans le cas d'une telle analogie, parce que le CEOT possède une présentation histopathologique variable et que le stroma est généralement fibreux, ce que nous ne voyons pas chez nos animaux. Pourtant, ces caractéristiques méritent d'être considérées, considérant que l'amyloïde est un agrégat de protéines, insolubles, formées par l'interaction inadéquate entre les différents composants et produits cellulaires (53-56)

Chez les souris *LAMC2-Dox* le processus de maturation, qui consiste finalement à éliminer la matrice organique et introduire les ions calcium et phosphate dans l'émail pour permettre la croissance des cristaux, est incomplet. Ceci conduit à une hypominéralisation de l'émail, qui est mou et se dégrade facilement. Cette matrice résiduelle affecte également la structuration fonctionnelle de la MBS, entraînant un métabolisme distinct, par rapport aux animaux WT. La distribution d'AMTN, ODAM et SCPPPQ1 est aussi inégale à celle observée chez les animaux sains. En effet, ces molécules s'accumulent tantôt le long de la surface apicale des améloblastes modifiés, tantôt diffusent loin de la surface. Elles s'accumulent aussi parmi les cellules de l'organe de l'émail. Nos résultats indiquent que la substitution de la LAMC2 de souris par sa forme humaine n'a pas d'impact significatif sur la MB, mais entrave la structuration adéquate et

le fonctionnement de la MBS associée à la maturation de l'émail (57, 58). Elle s'accompagne aussi de l'entrée des molécules exogènes, telles que l'albumine, dans l'émail. Il est clair que la MBS à l'interface entre améloblastes et l'émail dans la phase de maturation est un frein à la perméabilité des protéines vers l'émail. Normalement, l'albumine ne pénètre pas dans l'émail (59). Sa présence inattendue dans l'émail pendant la maturation des souris *LAMC2-Dox* indique une dysfonction de la MBS.

Comme la maturation de l'émail est un processus hautement régulé, l'addition de substances organiques exogènes dans la couche d'émail contribue au phénotype hypominéralisé observé. Bien qu'il est généralement accepté que l'albumine est absente dans la phase de sécrétion de l'émail, des recherches soutiennent que l'albumine peut se retrouver dans cette zone, et que sa disparition pendant la maturation est une étape nécessaire à la minéralisation adéquate (60). Dans la phase de maturation, on observe une perméabilité sélective de l'organe de l'émail et une porosité de l'émail en maturation. À l'interface cellules-émail, il y a un échange de composants de la matrice dégradée pour des fluides, et finalement pour les minéraux afin de promouvoir la croissance des cristaux (63). Cela peut permettre l'accès de matériel étranger et l'incorporation des éléments, soit les indésirables ou ces qui sont nécessaires en quantités débalancées, pourrait affecter la minéralisation de l'émail (61, 62).

D'autre part, à titre d'hypothèse dans notre modèle, nous soulevons la possibilité que l'albumine puisse être incorporée à la matrice dystrophique intercellulaire, avant que celle-ci ne se dépose dans la couche d'émail en maturation. Ensuite, la déposition de cette matrice dystrophique riche en albumine à l'interface organe de l'émail-émail pourrait contribuer à l'hypominéralisation de l'émail chez les souris *LAMC2-Dox*. On ne peut pas exclure la possibilité que l'albumine anormalement détectée chez les souris *LAMC2-Dox* résulte d'un tel mécanisme. Cette situation a été déjà rapportée chez les souris transgéniques pour d'autres protéines qui participent de l'amélogénèse, où l'on a observé un défaut d'intégrité de l'émail (63-65). De plus, il a été rapporté que, dans certaines conditions pathologiques (45, 61, 66), il pourrait y avoir rétention anormale d'albumine durant la phase de maturation, et une conséquente inhibition de la croissance des cristaux (67).

Les résultats présentés indiquent que l'expression de la *LAMC2* humaine protège pleinement la souris de la létalité observée en absence de *LAMC2* et qu'elle prévient les complications

épithéliales. Toutefois, la maturation de l'émail est perturbée chez ces souris transgéniques. Plusieurs possibilités peuvent expliquer l'absence de la fonction de compensation par la LAMC2 humaine.

La première s'appuie sur des études qui montrent que les modifications extracellulaires des chaînes $\alpha 3$ et $\gamma 2$ sont essentielles pour l'intégration et la fonction de la LM-332 dans la MB « typique ». Ces étapes du « *processing* » des chaînes α et γ conduisent à formes moléculaires secondaires, dues à l'action des protéases, et leurs interactions à autres protéines lors de l'assemblage de la MB. C'est le cas notamment pour la chaîne $\gamma 2$, où une modification anormale conduit à un défaut d'interaction avec ses ligands dans la MB, et un ancrage incomplet des fibrilles. Dès lors, le métabolisme de la MB est altéré et cause des anomalies organisationnelles et fonctionnelles de la MB entre les épithéliums et les tissus adjacents (p. ex : la peau), pouvant mener au détachement de ces structures l'une de l'autre (68). Si cela se produit dans la MBS, on pourrait aussi envisager que les souris *LAMC2-Dox* sont incapable de transformer adéquatement la LAMC2 humaine. Toutefois, la MB dans la phase de pré-sécrétion de la dent et celles associés à la couche papillaire au cours de la maturation, donc aux vaisseaux sanguins, apparaissent bien structurées chez les souris *LAMC2-Dox*. Ces données, liées à l'apparente normalité structurelle des tissus mous (12, 13), nous conduisent à regretter cette hypothèse. Une telle situation ne pourrait donc se produire que s'il y avait un mécanisme de modification et transformation protéique distinct dans la composition de la MBS. Des études complémentaires sont nécessaires pour en faire la preuve.

Bien que l'homologie entre les LAMC2 de l'homme et celle des souris soit considérable (~ 85%) (69, 70), on ne peut exclure qu'une différence si mineure puisse affecter la structure, les caractéristiques biochimiques ou les interactions de la protéine humaine au sein de la MBS chez la souris (71). Rappelons que les molécules présentes dans la MBS se distinguent de celles retrouvées dans la MB typique. En effet, ODAM, AMTN et SCPPPQ1 sont détectées au cours de la maturation dentaire des souris *LAMC2-Dox*, mais leur présence et leur distribution sont imparfaites, irrégulières et ne sont pas limitées à l'interface cellules-émail. Une possibilité demeure de cette composition unique de la MBS et d'éventuelles interactions inefficaces avec AMTN, ODAM et SCPPPQ1, sachant que les protéines humaines et de souris diffèrent aussi. En conséquence, les constituants présents chez cet animal transgénique pourraient ne pas

constituer l'assemblage macromoléculaire nécessaire à l'ordonnement correct de la MBS, et donc conduire à une distribution aléatoire et à un clivage de sa structure. Aussi, des études complémentaires doivent être menées pour étudier la distribution ultrastructurale de ces protéines dans la MBS chez la souris *LAMC2-Dox*.

Un autre point qui mérite encore d'être exploré est l'effet de la LM-332 dans la MBS présente à surface apicale des cellules de l'épithélium de jonction (EJ). Cette structure dérive de la MBS présente à la maturation et permet l'attachement des cellules épithéliales à la surface des dents. L'épithélium de jonction - EJ représente la première ligne de défense contre les maladies parodontales et est considéré comme un épithélium partiellement différencié capable de produire les constituants nécessaires à l'attachement à la dent (29). La façon dont la MBS se fixe à l'émail formé et le type d'influence qu'elle exerce sur les cellules de l'EJ ne sont pas encore connus. Toutefois, grâce à son potentiel prolifératif, l'EJ est capable de se reconstituer lui-même, soit dans les petits traumatismes quotidiens, soit suite à une chirurgie. Dans ce cas, l'EJ se reforme à partir des cellules basales de l'épithélium gingival (30, 72). L'étude des mécanismes qui régissent l'attachement de l'EJ à la surface de la dent, la participation de la LM-332, et ses interactions avec les autres protéines de la MBS constitue un défi stimulant, ayant un impact clinique majeur. Il semble que la cohésion entre l'EJ et la dent se fait via MBS, avec la participation des hémidesmosomes, la LM-332, et les protéines AMTN, ODAM et SCPPPQ1 (30, 73, 74). D'autres travaux en cours dans notre laboratoire pourront nous apporter des informations sur la structure de ces protéines et la nature de leurs interactions et conséquences pour l'amélogénèse et la santé parodontale.

En ce qui concerne les aspects parodontaux observés chez les animaux *LAMC2-Dox*, les résultats initiaux montrent que l'attache de l'EJ ne se fait pas correctement pour les incisives (FIG 6 – ANNEXE 3). Il y a une inflammation du tissu gingival, avec vacuolisation et un infiltrat inflammatoire mixte, de l'épithélium, lequel devient éventuellement atrophique ou parfois hyperplasique. Ces aspects typiques d'une poche parodontale, associée au détachement épithélial et à la résorption osseuse donnent l'impression d'une maladie parodontale active.

En parallèle avec ce qui est observé dans la phase de maturation, les défauts potentiels d'interaction entre la LAMC2 humaine et les autres protéines de la MBS peuvent se traduire par une MBS qui n'est plus fonctionnelle au niveau de l'EJ. Cela pourrait interférer avec l'adhérence

entre EJ et la surface de la dent, ayant un émail hypominéralisé. Ceci pourrait contribuer à une attache épithéliale déficiente, prédisposant à l'infection et à l'inflammation, la perte de l'os alvéolaire et les autres problèmes parodontaux associés (75). Des résultats préliminaires indiquent que le retrait de la diète avec doxycycline des animaux *LAMC2-Dox* (*LAMC2-Off-Dox*), pendant trois semaines et plus, entraîne des effets plus graves et plus complexes (FIGs 6-8 – ANNEXE 3), qui s'observe dès la zone de sécrétion. Des défauts d'attachements plus graves et des régions de dégénérescence apparaissent de la sécrétion jusqu'à l'EJ.

En outre, on pourrait envisager que les effets dramatiques décrits pour les animaux *LAMC2-Dox* sont liés, au moins partiellement, aux souris recevant Dox pendant des périodes prolongées, dû au fait que les tetracyclines, en général, affectent la formation dentaire (76-78). Pour exclure cette possibilité, nous avons inclus un groupe contrôle de souris WT qui a été exposée à Dox depuis la gestation, jusqu'à l'euthanasie. La dentition de ces souris n'a montré aucune des altérations observées chez les souris *LAMC2-Dox*. Ces résultats s'accordent avec la littérature récente qui indique que la doxycycline dans des modèles animaux contrôlables n'a aucun effet sur la formation dentaire (79). De plus, les altérations dentaires résultant de l'apport thérapeutique de Dox sont rares et généralement négligeables (80-82). Par rapport aux caractéristiques parodontales, il n'y a pas de raison d'attribuer à la doxycycline la cause des effets observés. En effet, la doxycycline est actuellement utilisée dans les traitements parodontaux, puisque cet antibiotique confère un effet protecteur pour le parodonte (83).

De plus, on pourrait prétexter que le promoteur utilisé, la CK-14, ne permet pas de maintenir, pendant la maturation, des niveaux suffisamment élevés de synthèse de LAMC2 nécessaire à l'assemblage stœchiométrique de LM-332. D'autres études sont requises pour quantifier les niveaux d'expression de LAMC2 par rapport au WT. Enfin, l'absence d'une MBS appropriée le long de la surface apicale des améloblastes peut affecter leur polarité et l'orientation de la sécrétion, donc, produire des accumulations intercellulaires.

À titre de perspectives d'avenir, cette étude basée sur ce modèle ouvre encore d'autres possibilités. Il pourrait être exploité, en enlevant la doxycycline pour inhiber complètement l'expression de LAMC2 et étudier l'effet de cette protéine sur l'amélogénèse, au complet. Considérant que la LM-332 peut être impliquée dans toutes les phases de la formation de l'émail, lors de l'inhibition de l'expression de la chaîne gamma2, il est susceptible d'entraîner un

phénotype plus complexe, considérant que toutes les étapes de l'amélogénèse puisse être affectées, soit pour les dents d'éruption continue (incisives) ou celles d'éruption unique (molaires).

Au terme de cette étude, il est évident que l'améloblaste est une cellule unique et sensible à son environnement. L'amélogénèse est donc un processus complexe soumis à des modifications qui peuvent entraîner de graves problèmes, comme l'Amélogénèse Imparfaite (AI) (43). En dépit des systèmes de compensation (et peut-être de redondance) susceptibles de corriger certains défauts de la maturation, il arrive que l'émail soit malformé et défectueux. La compréhension des diverses interactions entre les protéines impliquées dans la formation de la dent aidera à mieux comprendre la pathogénèse des anomalies de l'émail. Une meilleure connaissance de ce modèle permettra peut-être de corriger les anomalies observées. De fait, les retombées cliniques de cette étude sont impressionnantes, et on pourrait envisager de nouvelles façons de prévenir ou traiter l'Amélogénèse Imparfaite.

En outre, la connaissance des processus et molécules impliqués dans la structuration de la MBS présente à l'EJ pourrait mener au développement de thérapies préventive et curative de la maladie parodontale. On sait que, lors de l'inactivation d'ODAM, la dent présente une maturation parfaite de l'émail, peut-être par une compensation. Par contre, cette absence entraîne un défaut d'attachement de l'EJ (42). D'ailleurs, les données liées aux animaux AMTN « *knockout* » mettent en lumière de légers défauts pendant la maturation de l'émail, pourtant sans aucune manifestation majeure sur l'EJ (84). Nos travaux indiquent que la LM-332 participe à l'homéostasie, soit de cette structure de défense parodontale primaire (EJ), soit de la maturation de l'émail. Tout cela peut nous aider à mieux comprendre la dichotomie observée entre le rôle de la MBS dans la phase de maturation et dans l'attache épithéliale. Mieux comprendre les différentes interactions entre ces molécules pourrait changer complètement la façon d'envisager les traitements cliniques pour soigner la maladie parodontale.

Notre modèle est donc une piste prometteuse pour le développement des modèles de plus en plus fiables et reproductibles pour l'étude de l'odontogénèse. Le modèle de souris *LAMC2-Dox* peut fournir une gamme d'informations très utiles et contribuer de façon exemplaire à la recherche en histologie, en embryologie et en pathologie buccodentaires, pour améliorer l'approche clinique.

Conclusion

Notre modèle de souris exprimant la LAMC2 humaine représente un KO fonctionnel restrictif ; puisque la LM-332 n'accomplit pas correctement ses fonctions dans la MBS. Cette étude nous a fourni des informations importantes sur le rôle de la MBS pour la maturation harmonieuse de l'émail. Une atteinte de la MBS, se traduit par un phénotype complexe et des changements secondaires dans les fonctions des améloblastes.

Étant donné que la LM-332 est exprimée pendant la phase de sécrétion et qu'il n'y a pas de changement évident observé durant cette phase, on peut émettre l'hypothèse que la sécrétion de la protéine humaine en quantité anormale entraîne un défaut de formation de l'émail (6). Une évaluation plus précise de l'expression de la LM-332, et de la *LAMC2*, doit donc être établie.

De nouveaux promoteurs des gènes spécifiques de la phase de maturation, comme l'AMTN et/ou ODAM, permettraient d'élucider les mécanismes en cause pour l'assemblage de la MBS. Ces modèles permettraient notamment d'étudier le rôle de l'adhérence de l'épithélium de jonction dans l'apparition de la maladie parodontale, et aiderait à mieux comprendre la physiologie de l'attache épithéliale à la dent (85).

En somme, ce modèle est un outil précieux pour étudier le rôle de LM-332 dans la formation de l'émail et mieux comprendre le rôle de la MBS aux interfaces cellule-émail. Cependant, cette étude attire l'attention sur le fait que les résultats des modèles de souris humanisées doivent être interprétés avec prudence (86, 87), car on ne peut être entièrement certain de la façon dont la machinerie transcriptionnelle de la souris prend en compte l'ADN humain (71).

Bibliographie

1. Nanci A. Enamel: Composition, formation, and structure. In: Nanci A, editor. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. 7. St-Louis: Mosby Elsevier; 2007. p. 141-90.
2. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen WY, Krebsbach PH, et al. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem.* 1998;46(8):911-34.
3. Ekblom M, Falk M, Salmivirta K, Durbeej M, Ekblom P. Laminin isoforms and epithelial development. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1998;857:194-211.
4. McGuire JD, Walker MP, Dusevich V, Wang Y, Gorski JP. Enamel organic matrix: potential structural role in enamel and relationship to residual basement membrane constituents at the dentin enamel junction. *Connective tissue research.* 2014;55 Suppl 1:33-7.
5. Scheele S, Nystrom A, Durbeej M, Talts JF, Ekblom M, Ekblom P. Laminin isoforms in development and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2007;85(8):825-36.
6. Sahlberg C, Hormia M, Airene T, Thesleff I. Laminin gamma2 expression is developmentally regulated during murine tooth morphogenesis and is intense in ameloblasts. *J Dent Res.* 1998;77(8):1589-96.
7. Sawada T. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of ameloblast-enamel adhesion at maturation stage in amelogenesis in *Macaca fuscata* tooth germ. *Histochem Cell Biol.* 2015;144(6):587-96.
8. Hormia M, Sahlberg C, Thesleff I, Airene T. The epithelium-tooth interface--a basal lamina rich in laminin-5 and lacking other known laminin isoforms. *Journal of dental research.* 1998;77(7):1479-85.
9. Walko G, Castanon MJ, Wiche G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and tissue research.* 2015;360(3):529-44.

10. Ryan MC, Lee K, Miyashita Y, Carter WG. 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):1309-23.
11. Meng X, Klement JF, Leperi DA, Birk DE, Sasaki T, Timpl R, et al. Targeted inactivation of murine laminin gamma2-chain gene recapitulates human junctional epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology.* 2003;121(4):720-31.
12. Adair-Kirk TL, Griffin GL, Meyer MJ, Kelley DG, Miner JH, Keene DR, 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):e45546.
13. Kim ST, Adair-Kirk TL, Senior RM, Miner JH. Functional consequences of cell type-restricted expression of laminin alpha5 in mouse placental labyrinth and kidney glomerular capillaries. *PLoS One.* 2012;7(7):e41348.
14. Bei M, Stowell S, Maas R. Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. *Dev Dyn.* 2004;231(4):758-65.
15. Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2010;67(17):2879-95.
16. Alberts B, Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. . Cells in their social context. In: Alberts B, editor. *Molecular Biology of the cell.* 6 ed. New York: Garland Science; 2015. p. 1034-90.
17. Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR, Merlie JP. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature.* 1995;374(6519):258-62.
18. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Seminars in cancer biology.* 2002;12(3):197-207.
19. Kiritsi D, Has C, Bruckner-Tuderman L. Laminin 332 in junctional epidermolysis bullosa. *Cell adhesion & migration.* 2013;7(1):135-41.
20. Nanci A, Zalzal S, Kogaya Y. Cytochemical characterization of basement membranes in the enamel organ of the rat incisor. *Histochemistry.* 1993;99(4):321-31.

21. Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *The International journal of developmental biology*. 1995;39(1):153-61.
22. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, et al. Regulation of dental enamel shape and hardness. *Journal of dental research*. 2010;89(10):1024-38.
23. Simmer JP, Richardson AS, Hu YY, Smith CE, Ching-Chun Hu J. A post-classical theory of enamel biomineralization... and why we need one. *International journal of oral science*. 2012;4(3):129-34.
24. Nanci A, Zalzal S, Smith CE. Application of backscattered electron imaging and lectin-gold cytochemistry to visualize the distribution of glycoconjugates in a basal lamina. *Scanning microscopy*. 1987;1(4):1963-70.
25. Yoshida N, Yoshida K, Aberdam D, Meneguzzi G, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, et al. Expression and localization of laminin-5 subunits in the mouse incisor. *Cell and tissue research*. 1998;292(1):143-9.
26. Fukumoto S, Yamada Y. Review: extracellular matrix regulates tooth morphogenesis. *Connective tissue research*. 2005;46(4-5):220-6.
27. Dos Santos Neves J, Wazen RM, Kuroda S, Francis Zalzal S, Moffatt P, Nanci A. Odontogenic ameloblast-associated and amelotin are novel basal lamina components. *Histochemistry and cell biology*. 2012;137(3):329-38.
28. Moffatt P, Wazen RM, Dos Santos Neves J, Nanci A. Characterisation of secretory calcium-binding phosphoprotein-proline-glutamine-rich 1: a novel basal lamina component expressed at cell-tooth interfaces. *Cell and tissue research*. 2014;358(3):843-55.
29. Shimono M, Ishikawa T, Enokiya Y, Muramatsu T, Matsuzaka K, Inoue T, et al. Biological characteristics of the junctional epithelium. *Journal of electron microscopy*. 2003;52(6):627-39.

30. Nishio C, Wazen R, Moffatt P, Nanci A. Expression of odontogenic ameloblast-associated and amelotin proteins in the junctional epithelium. *Periodontology* 2000. 2013;63(1):59-66.
31. Graner E, Line SR, Jorge Junior J, Lopes MA, Almeida OP. Laminin and collagen IV distribution and ultrastructure of the basement membrane of the gingiva of the rat incisor. *Journal of periodontal research*. 1995;30(5):349-54.
32. Kinumatsu T, Hashimoto S, Muramatsu T, Sasaki H, Jung HS, Yamada S, et al. Involvement of laminin and integrins in adhesion and migration of junctional epithelium cells. *Journal of periodontal research*. 2009;44(1):13-20.
33. Sawada T, Yamazaki T, Shibayama K, Kumazawa K, Yamaguchi Y, Ohshima M. Expression and localization of laminin 5, laminin 10, type IV collagen, and amelotin in adult murine gingiva. *Journal of molecular histology*. 2014;45(3):293-302.
34. Mullen LM, Richards DW, Quaranta V. Evidence that laminin-5 is a component of the tooth surface internal basal lamina, supporting epithelial cell adhesion. *Journal of periodontal research*. 1999;34(1):16-24.
35. Tsuruta D, Kobayashi H, Imanishi H, Sugawara K, Ishii M, Jones JC. Laminin-332-integrin interaction: a target for cancer therapy? *Current medicinal chemistry*. 2008;15(20):1968-75.
36. Bubier JA, Sproule TJ, Alley LM, Webb CM, Fine JD, Roopenian DC, et al. A mouse model of generalized non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2010;130(7):1819-28.
37. Cachat A, Villaudy J, Rigal D, Gazzolo L, Duc Dodon M. [Mice are not Men and yet... how humanized mice inform us about human infectious diseases]. *Medecine sciences : M/S*. 2012;28(1):63-8.
38. Scheer N, Snaith M, Wolf CR, Seibler J. Generation and utility of genetically humanized mouse models. *Drug discovery today*. 2013;18(23-24):1200-11.
39. Devoy A, Bunton-Stasyshyn RK, Tybulewicz VL, Smith AJ, Fisher EM. Genomically humanized mice: technologies and promises. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(1):14-20.

40. Macchiarini F, Manz MG, Palucka AK, Shultz LD. Humanized mice: are we there yet? *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(10):1307-11.
41. Barron MJ, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Hunt C, Mironov A, et al. A mutation in the mouse Amelx tri-tyrosyl domain results in impaired secretion of amelogenin and phenocopies human X-linked amelogenesis imperfecta. *Human molecular genetics*. 2010;19(7):1230-47.
42. Wazen RM, Moffatt P, Ponce KJ, Kuroda S, Nishio C, Nanci A. Inactivation of the Odontogenic ameloblast-associated gene affects the integrity of the junctional epithelium and gingival healing. *European cells & materials*. 2015;30:187-99.
43. Kim JW, Seymen F, Lee KE, Ko J, Yildirim M, Tuna EB, et al. LAMB3 mutations causing autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Journal of dental research*. 2013;92(10):899-904.
44. Wright JT, Johnson LB, Fine JD. Development defects of enamel in humans with hereditary epidermolysis bullosa. *Archives of oral biology*. 1993;38(11):945-55.
45. Kirkham J, Robinson C, Strafford SM, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, et al. The chemical composition of tooth enamel in junctional epidermolysis bullosa. *Archives of oral biology*. 2000;45(5):377-86.
46. Wright JT, Hall KI, Deaton TG, Fine JD. Structural and compositional alteration of tooth enamel in hereditary epidermolysis bullosa. *Connective tissue research*. 1996;34(4):271-9.
47. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1998;9(2):128-61.
48. Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells, tissues, organs*. 2007;186(1):78-85.
49. Huq NL, Cross KJ, Ung M, Reynolds EC. 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):599-609.

50. Kawasaki K, Weiss KM. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(7):4060-5.
51. Kawasaki K, Weiss KM. 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):295-316.
52. Sahlberg C, Hormia M, Airene T, Thesleff I. Laminin gamma2 expression is developmentally regulated during murine tooth morphogenesis and is intense in ameloblasts. *Journal of dental research*. 1998;77(8):1589-96.
53. Miyake M, Nagahata S, Nishihara J, Ohbayashi Y. Combined adenomatoid odontogenic tumor and calcifying epithelial odontogenic tumor: report of case and ultrastructural study. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1996;54(6):788-93.
54. Pindborg JJ, Vedtofte P, Reibel J, Praetorius F. The calcifying epithelial odontogenic tumor. A review of recent literature and report of a case. *APMIS Supplementum*. 1991;23:152-7.
55. Solomon A, Murphy CL, Weaver K, Weiss DT, Hrcic R, Eulitz M, et al. Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2003;142(5):348-55.
56. Piattelli A, Artese L. [The histopathological aspects of the calcifying odontogenic cyst]. *Minerva stomatologica*. 1990;39(11):959-64.
57. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, et al. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *The Journal of cell biology*. 2004;167(5):973-83.
58. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, et al. Laminin alpha2 is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(11):10286-92.

59. Robinson C, Brookes SJ, Kirkham J, Shore RC, Bonass WA. Uptake and metabolism of albumin by rodent incisor enamel *in vivo* and postmortem: Implications for control of mineralization by albumin. *Calcif Tissue Int.* 1994;55:467-72.
60. Robinson C, Brookes SJ, Kirkham J, Bonass WA, Shore RC. Crystal growth in dental enamel: the role of amelogenins and albumin. *Advances in dental research.* 1996;10(2):173-9; discussion 9-80.
61. Robinson C. Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias. *Frontiers in physiology.* 2014;5:388.
62. Tarjan I, Rozsa N, Tanikawa Y, Wakamatsu N, Tanase S. The influx of serum albumin to enamel matrix in rat incisors after trauma. *Calcified tissue international.* 2002;71(4):349-55.
63. Mohazab L, Koivisto L, Jiang G, Kytomaki L, Haapasalo M, Owen GR, et al. Critical role for α v β 6 integrin in enamel biomineralization. *Journal of cell science.* 2013;126(Pt 3):732-44.
64. Hu JC, Hu Y, Lu Y, Smith CE, Lertlam R, Wright JT, et al. Enamelin is critical for ameloblast integrity and enamel ultrastructure formation. *PloS one.* 2014;9(3):e89303.
65. Wazen RM, Moffatt P, Zalzal SF, Yamada Y, Nanci A. A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 2009;28(5):292-303.
66. Jedeon K, De la Dure-Molla M, Brookes SJ, Loiodice S, Marciano C, Kirkham J, et al. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. *The American journal of pathology.* 2013;183(1):108-18.
67. Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC. The role of albumin in developing rodent dental enamel: a possible explanation for white spot hypoplasia. *Journal of dental research.* 1992;71(6):1270-4.
68. Rousselle P, Beck K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell adhesion & migration.* 2013;7(1):122-34.
69. Marinkovich MP, Verrando P, Keene DR, Meneguzzi G, Lunstrum GP, Ortonne JP, et al. Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically

identical. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1993;69(3):295-9.

70. Sugiyama S, Utani A, Yamada S, Kozak CA, Yamada Y. Cloning and expression of the mouse laminin gamma 2 (B2t) chain, a subunit of epithelial cell laminin. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1995;228(1):120-8.

71. Devoy A, Bunton-Stasyshyn RKA, Tybulewicz VLJ, Smith AJH, Fisher EMC. Genomically humanized mice: technologies and promises. *Nat Rev Genet*. 2012;13(1):14-20.

72. Jiang Q, Yu Y, Ruan H, Luo Y, Guo X. Morphological and functional characteristics of human gingival junctional epithelium. *BMC oral health*. 2014;14:30.

73. Nishio C, Wazen R, Kuroda S, Moffatt P, Nanci A. Expression pattern of odontogenic ameloblast-associated and amelotin during formation and regeneration of the junctional epithelium. *European cells & materials*. 2010;20:393-402.

74. Lee HK, Ji S, Park SJ, Choung HW, Choi Y, Lee HJ, 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. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(23):14740-53.

75. Wiebe CB, Larjava HS. Do mutations in the basement membrane zone affect the human periodontium? Review with special reference to epidermolysis bullosa. *The Journal of the Western Society of Periodontology/Periodontal abstracts*. 1998;46(1):5-18.

76. Simmelink JW, Nygaard VK. Disturbances and defects in enamel development. *Journal of dental research*. 1979;58(Spec Issue B):717-24.

77. Skinner HC, Nalbandian J. Tetracyclines and mineralized tissues: review and perspectives. *The Yale journal of biology and medicine*. 1975;48(5):377-97.

78. Tredwin CJ, Scully C, Bagan-Sebastian JV. Drug-induced disorders of teeth. *Journal of dental research*. 2005;84(7):596-602.

79. Parsa S, Kuremoto K, Seidel K, Tabatabai R, Mackenzie B, Yamaza T, et al. Signaling by FGFR2b controls the regenerative capacity of adult mouse incisors. *Development (Cambridge, England)*. 2010;137(22):3743-52.

80. Lochary ME, Lockhart PB, Williams WT, Jr. Doxycycline and staining of permanent teeth. *The Pediatric infectious disease journal*. 1998;17(5):429-31.
81. Todd SR, Dahlgren FS, Traeger MS, Beltran-Aguilar ED, Marianos DW, Hamilton C, et al. No visible dental staining in children treated with doxycycline for suspected Rocky Mountain Spotted Fever. *The Journal of pediatrics*. 2015;166(5):1246-51.
82. Volovitz B, Shkap R, Amir J, Calderon S, Varsano I, Nussinovitch M. Absence of tooth staining with doxycycline treatment in young children. *Clinical pediatrics*. 2007;46(2):121-6.
83. Yagan A, Kesim S, Liman N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontology*. 2014;85(3):478-89.
84. Bartlett JD, Simmer JP. New perspectives on amelotin and amelogenesis. *Journal of dental research*. 2015;94(5):642-4.
85. Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. 2005;84(1):9-20.
86. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3507-12.
87. Warren HS, Tompkins RG, Moldawer LL, Seok J, Xu W, Mindrinos MN, et al. Mice are not men. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(4):E345.

Annexe 1 - Demande d'autorisation d'utiliser des animaux – Transgéniques

Renouvellement long

29 octobre 2015

Protocole 15-129 - Expérimental
Lié au protocole de reproduction 15-130



Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux

CDEA-F1 DEMANDE D'AUTORISATION D'UTILISER DES ANIMAUX

1. IDENTIFICATION DU PROFESSEUR RESPONSABLE

NOM : *Nanci* PRÉNOM : *Antonio*
 DÉPARTEMENT : *Autre, préciser: Stomatologie* TÉLÉPHONE : [REDACTED]
 FACULTÉ : *Médecine dentaire*
 ADRESSE : [REDACTED]
 FONCTION : *Professeur* COURRIEL : [REDACTED]

2. IDENTIFICATION DU PROTOCOLE

TITRE DU PROJET : *Études fonctionnelles et manipulations expérimentales des souris knock-out et transgéniques pour le gène de l'Ameloblastine, de l'Apin, de la follicular dendritic cell-secreted protein et de la Laminine.*
 NOUVELLE DEMANDE RENOUELEMENT, NUMÉRO PRÉCÉDENT : *14-141*
 TYPE DE PROTOCOLE : *Expérimental*
 PROTOCOLE DE REPRODUCTION : UN FORMULAIRE DISTINCT POUR LE PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DOIT ÊTRE SOUMIS EN MÊME TEMPS AFIN DE JUSTIFIER LA PRODUCTION D'ANIMAUX.
 DATE PRÉVUE DU DÉBUT : *2011-04-01* DATE PRÉVUE DE LA FIN : *2016-03-30*
 BUT DE L'UTILISATION DES ANIMAUX (BU)* : *BU 1 Études de nature fondamentale* CATÉGORIE DE TECHNIQUES INVASIVES* : *B - Peu ou pas d'inconfort ou de stress*
 * VOIR ANNEXES I ET II DE CE FORMULAIRE POUR LA DESCRIPTION DES BUTS D'UTILISATION DES ANIMAUX ET DES CATÉGORIES DE TECHNIQUES INVASIVES.

3. FINANCEMENT

ORGANISME SUBVENTIONNAIRE	ACCORDÉE	EN ATTENTE*	COMITÉ DE PAIRS EXTERNE À L'UDEM**	
1. IRSC	<input checked="" type="checkbox"/> N° COMPTE : <i>R0018786</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON
2.	<input type="checkbox"/> N° COMPTE :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON
3.	<input type="checkbox"/> N° COMPTE :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON

* Si les fonds ne sont pas accordés, mais que vous obtenez une cote de 3.5 ou plus, elle équivaut à une évaluation positive du mérite scientifique : svp nous transmettre une copie de la lettre indiquant la cote obtenue. Sinon, vous devez suivre la procédure d'évaluation du mérite scientifique décrite sur le site web du CDEA (www.cdea.umontreal.ca).
 ** Si l'organisme n'a pas de Comité de pairs qui revoit le mérite scientifique du projet, suivre la procédure d'évaluation du mérite scientifique.
 ORGANISMES SUBVENTIONNAIRES SUPPLÉMENTAIRES, COCHER ET LES INDIQUER À LA SECTION 6 DE LA PAGE SUIVANTE.

4. DÉCLARATION DU PROFESSEUR RESPONSABLE

LES INFORMATIONS FOURNIES DANS CE FORMULAIRE SONT EXACTES ET COMPLÈTES. JE M'ENGAGE À UTILISER LES ANIMAUX CITÉS CI-APRÈS SELON LES POLITIQUES ET LES NORMES DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL ET EN CONFORMITÉ AVEC LES PRINCIPES ET RECOMMANDATIONS DU CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (CCPA) ET CE, APRÈS AUTORISATION PAR LE COMITÉ DE DÉONTOLOGIE DE L'EXPÉRIMENTATION SUR LES ANIMAUX (CDEA). J'AVISERAI LE CDEA EN CAS DE MODIFICATION AU PROTOCOLE IMPLIQUANT LES ANIMAUX.
 JE M'ENGAGE À CE QUE TOUS LES UTILISATEURS DES ANIMAUX AIENT CONNAISSANCE DU PROTOCOLE AUTORISÉ PAR LE CDEA AVANT DE DÉBUTER TOUTE MANIPULATION ANIMALE.

SIGNATURE DU RESPONSABLE [REDACTED]

DATE : *23 / 10 / 2015*

EQUIVALENCE DE SIGNATURE : Transmettre directement la demande à partir du courriel institutionnel @umontreal.ca du professeur responsable OU Imprimer – signer – scanner et transmettre par courriel cette 1^{re} page à [REDACTED]. Ce formulaire complété en format WORD doit être transmis par courriel à [REDACTED].

5. AUTORISATION DU CDEA (Réservé à l'usage du Comité)

LE CDEA DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL AUTORISE CETTE DEMANDE D'UTILISATION D'ANIMAUX

CTI : *D*
 BU : *1*
 ANIMAUX AUTORISÉS : Nombre à préciser [REDACTED]
 DATE D'AUTORISATION (VALIDE UN AN) : *12 novembre 2015*

Annexe 2 - Demande d'autorisation d'utiliser des animaux – Sauvages (WT)

Renouvellement long

29 octobre 2015

Protocole 15-131



Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux

CDEA-F1 DEMANDE D'AUTORISATION D'UTILISER DES ANIMAUX

1. IDENTIFICATION DU PROFESSEUR RESPONSABLE

NOM : *Nanci* PRÉNOM : *Antonio*
 DÉPARTEMENT : *Autre, préciser: Stomatologie* TÉLÉPHONE : [REDACTED]
 FACULTÉ : *Médecine dentaire*
 ADRESSE : [REDACTED]
 FONCTION : *Professeur* COURRIEL : [REDACTED]

2. IDENTIFICATION DU PROTOCOLE

TITRE DU PROJET : *Études fonctionnelles et manipulations expérimentales des événements moléculaires dans les tissus calcifiés*

NOUVELLE DEMANDE RENOUELEMENT, NUMÉRO PRÉCÉDENT : *14-143*

TYPE DE PROTOCOLE : *Expérimental*

PROTOCOLE DE REPRODUCTION : UN FORMULAIRE DISTINCT POUR LE PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DOIT ÊTRE SOUMIS EN MÊME TEMPS AFIN DE JUSTIFIER LA PRODUCTION D'ANIMAUX.

DATE PRÉVUE DU DÉBUT : *2011*

DATE PRÉVUE DE LA FIN : *2016*

BUT DE L'UTILISATION DES ANIMAUX (BU)* : BU 1 Études de nature fondamentale CATÉGORIE DE TECHNIQUES INVASIVES* : B - Peu ou pas d'inconfort ou de stress

* VOIR ANNEXES I ET II DE CE FORMULAIRE POUR LA DESCRIPTION DES BUTS D'UTILISATION DES ANIMAUX ET DES CATÉGORIES DE TECHNIQUES INVASIVES.

3. FINANCEMENT

ORGANISME SUBVENTIONNAIRE	ACCORDÉE	EN ATTENTE*	COMITÉ DE PAIRS EXTERNE À L'UDEM**	
1. IRSC	<input checked="" type="checkbox"/> N° COMPTE : <i>R0018786</i>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON
2.	<input type="checkbox"/> N° COMPTE :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON
3.	<input type="checkbox"/> N° COMPTE :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> OUI	<input type="checkbox"/> NON

* Si les fonds ne sont pas accordés, mais que vous obtenez une cote de 3.5 ou plus, elle équivaut à une évaluation positive du mérite scientifique : svp nous transmettre une copie de la lettre indiquant la cote obtenue. Sinon, vous devez suivre la procédure d'évaluation du mérite scientifique décrite sur le site web du CDEA (www.cdea.umontreal.ca).

** Si l'organisme n'a pas de Comité de pairs qui revoit le mérite scientifique du projet, suivre la procédure d'évaluation du mérite scientifique.

ORGANISMES SUBVENTIONNAIRES SUPPLÉMENTAIRES, COCHER ET LES INDIQUER À LA SECTION 6 DE LA PAGE SUIVANTE.

4. DÉCLARATION DU PROFESSEUR RESPONSABLE

LES INFORMATIONS FOURNIES DANS CE FORMULAIRE SONT EXACTES ET COMPLÈTES. JE M'ENGAGE À UTILISER LES ANIMAUX CITÉS CI-APRÈS SELON LES POLITIQUES ET LES NORMES DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL ET EN CONFORMITÉ AVEC LES PRINCIPES ET RECOMMANDATIONS DU CONSEIL CANADIEN DE PROTECTION DES ANIMAUX (CCPA) ET CE, APRÈS AUTORISATION PAR LE COMITÉ DE DÉONTOLOGIE DE L'EXPÉRIMENTATION SUR LES ANIMAUX (CDEA). J'AVISERAI LE CDEA AVANT D'APPORTER TOUTE MODIFICATION AU PROTOCOLE IMPLIQUANT LES ANIMAUX.

JE M'ENGAGE À CE QUE TOUS LES UTILISATEURS DU PROTOCOLE AUTORISÉ PAR LE CDEA AVANT DE DÉBUTER TOUTE MANIPULATION ANIMALE.

SIGNATURE DU RESPONSABLE : [REDACTED]

DATE : *23/10/2015*

ÉQUIVALENCE DE SIGNATURE : Transmettre directement la demande à partir du courriel institutionnel @umontreal.ca du professeur responsable OU Imprimer – signer – scanner et transmettre par courriel cette 1^{re} page à [REDACTED]
 Ce formulaire complété en format WORD doit être transmis par courriel à [REDACTED]

5. AUTORISATION DU CDEA (Réservé à l'usage du Comité)

LE CDEA DE L'UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL AUTORISE CETTE DEMANDE D'UTILISATION D'ANIMAUX

CTI : D

BU : 1

ANIMAUX AUTORISÉS : 201 rats, 48 souris

12 novembre 2015

DATE D'AUTORISATION (VALIDE UN AN)

Annexe 3 – Figures complémentaires

FIGURE 4

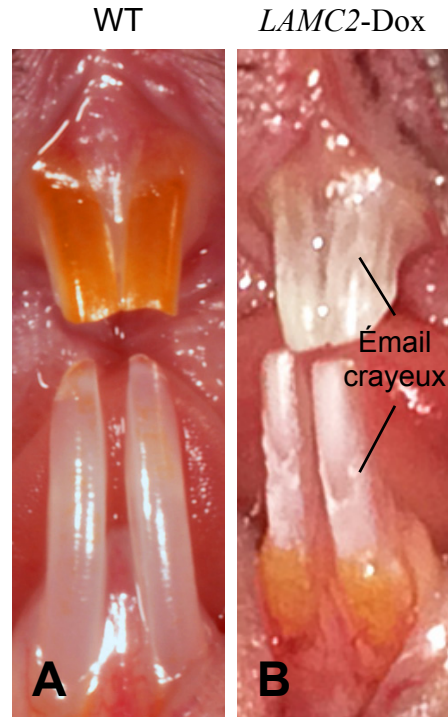


Fig. 4 : Vue clinique des incisives chez les souris WT et *LAMC2-Dox* : Les dents présentent différents aspects de l'émail, avec une incisive jaunâtre, brillante et homogène pour les souris WT (A), chez les souris *LAMC2-Dox*, l'émail est blanchâtre, pâle, hypominéralisé, ses pointes sont arrondies et la couche d'émail est écaillée (B).

FIGURE 5

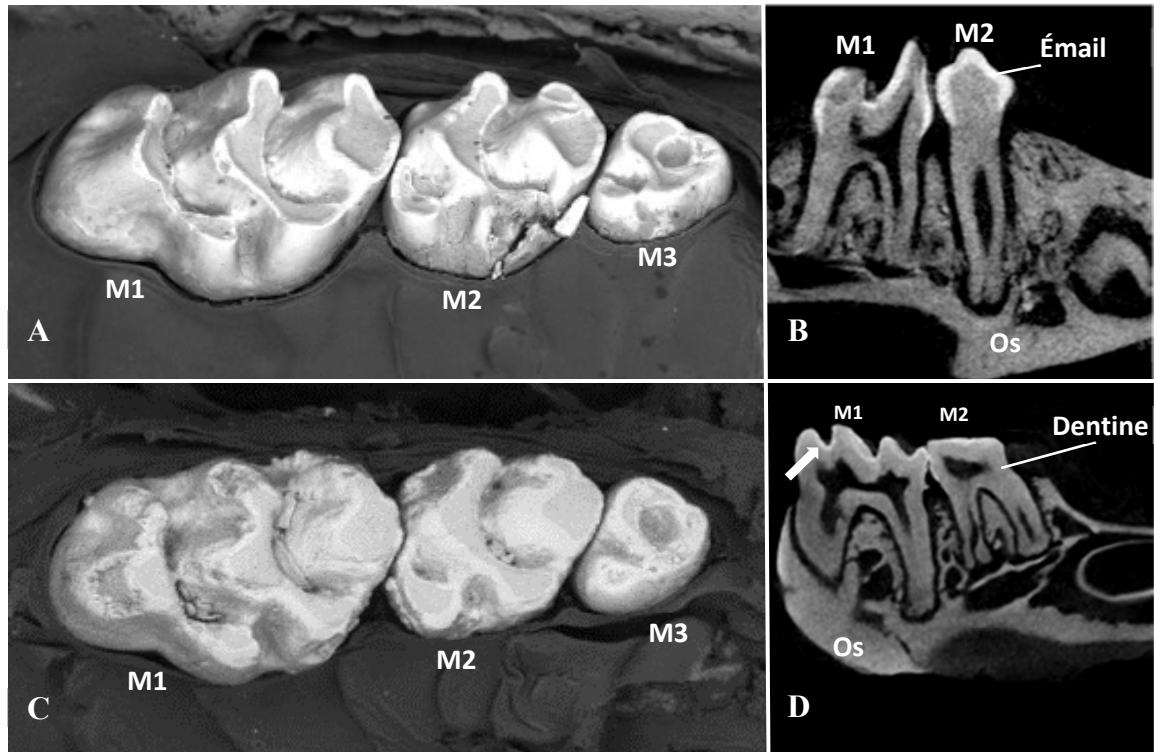


Fig. 5 : Microscopie électronique à balayage (MEB) et micro-tomographie (micro-CT scan) de molaires des souris WT et *LAMC2-Dox*: Les images au MEB montrent l'usure excessive des surfaces occlusales dans les molaires des souris *LAMC2-Dox* (C), de plus, la surface de l'émail est plus rugueuse, que celle des souris WT (A). Micro-CTs montrant une couche d'émail mince et hypominéralisée (flèche), ainsi que des zones de dentine exposée à la surface occlusale chez les souris *LAMC2-Dox* (D), en comparaison aux souris contrôles WT (B).

M1, 1^{re} molaire; M2, 2^{ème} molaire; M3, 3^{ème} molaire.

FIGURE 6

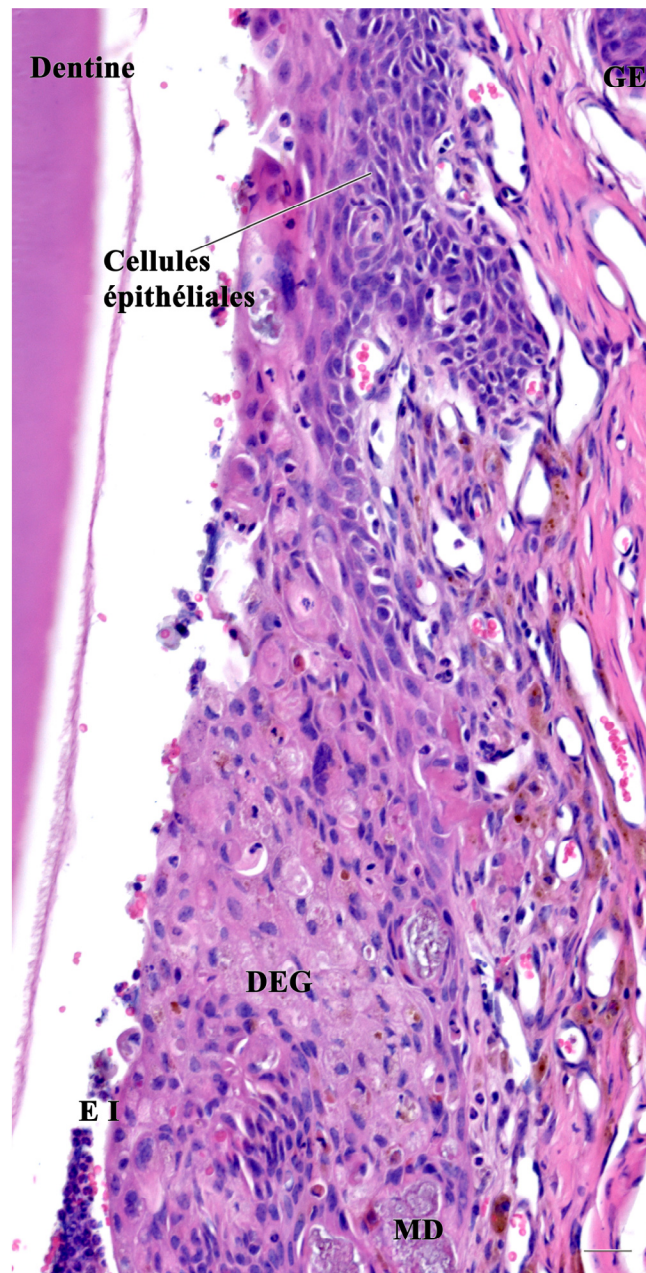


Fig. 6. Epithélium Jonctionnel de l'incisive des souris *LAMC2-Off-Dox*.

Chez les animaux *LAMC2-Off-Dox*, les cellules épithéliales sont désorganisées et parfois le tissu épithélial disparaît. Un intense infiltrat inflammatoire mixte remplace l'épithélium de jonction. Les cellules épithéliales de la gencive sont encore observées dans la coupe (GE).

DEG : sites de dégénérescence tissulaire ; MD : Matrice dystrophique ; * : Matrice résiduelle ; EI : Exsudat Inflammatoire.

Coloration : Hématoxyline et éosine. Échelle = 20µm

FIGURE 7

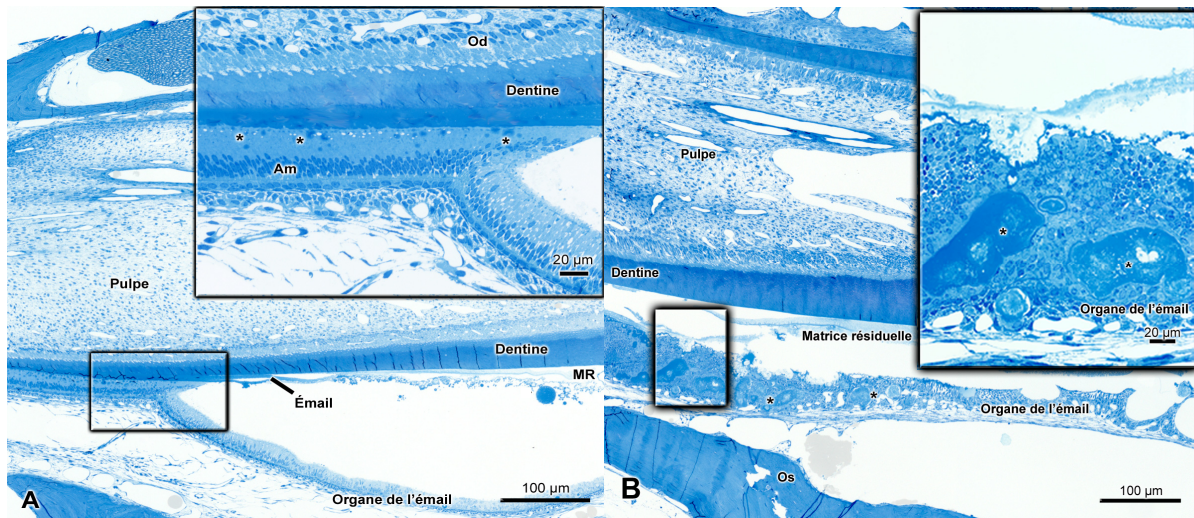


Fig. 7. Incisive inférieure des souris *LAMC2-Off-Dox*, avec les insertions des zones de sécrétion (finale) et début de la maturation (A) et maturation (B).

Chez les souris *LAMC2-Off-Dox*, pendant la sécrétion de l'émail (A), les projections de Tomes ne sont pas bien visibles et s'accompagnent d'un matériel dystrophique entre les cellules (*), ou à l'interface des améloblastes et de l'émail en formation. L'organe de l'émail se détache de l'émail en formation et en maturation, trois semaines après du retrait de la doxycycline.

La phase de maturation (B) est complètement perturbée par une abondante matrice dystrophique éloignée de l'interface organe de l'émail-dent (*). Le détachement entre l'organe de l'émail et l'émail en maturation est devenu plus évident et grave que chez les souris *LAMC2-On-Dox*.

Od : Odontoblastes ; Am : Améloblastes ; MR : Matrice résiduelle.

Coloration : Bleu de toluidine.