**MINISTERE DE l'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES**

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MEMOIRE**

présenté
par

RIBES Sandy

**pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes**

# PATHOLOGIES GENETIQUES AFFECTANT LA MINERALISATION DE LA DENT : EXEMPLE DE L'AMELOGENESE IMPARFAITE ET DE LA DYSPLASIE DENTINAIRE

Soutenu le 18 janvier 2018 devant le jury suivant :

- Président : Gad-Lapiteau Sophie
- Rapporteur : Babajko Sylvie
- Examinateur : Zahraoui Ahmed

Mémoire préparé sous la direction de : BARDET Claire
Laboratoire : EA2496, Faculté de Chirurgie dentaire, 1 rue Maurice Arnoux 92120 Montrouge
Directeur : CHAUSSAIN Catherine

Et de

DEMIGNOT Sylvie
UMRS 1138, Equipe A.Leturque
Centre de recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine 75004 PARIS
EPHE (Sciences de la vie et de la Terre)

**ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES**
**SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE**

# PATHOLOGIES GENETIQUES AFFECTANT LA MINERALISATION DE LA DENT : EXEMPLE DE L'AMELOGENESE IMPARFAITE ET DE LA DYSPLASIE DENTINAIRE

Sandy RIBES

Date soutenance :

**RESUME :** La dent est constituée par un ensemble de tissus dont l'association au sein de l'organe dentaire assure différentes fonctions : la pulpe, cœur vivant de la dent, et de trois tissus minéralisés, l'émail, la dentine, et le cément. L'organe dentaire est principalement impliqué, par son aspect morpho-fonctionnel, dans la fonction masticatrice, mais au-delà de la santé, fait la beauté du sourire, jouant un rôle important dans la construction et la stabilité de l'estime de soi. Les anomalies dentaires, qu'elles soient de nombre, forme, taille, structure ou d'éruption/résorption, font parties des manifestations phénotypiques de maladies rares ou syndromes fixant dans le temps les troubles issus du développement.

Mon projet de recherche est centré sur les pathologies affectants les processus de la minéralisation de la dent. Notre étude est basée sur l'analyse de données cliniques, en parallèle à des données ex vivo de tissus humain et in vivo chez la souris, en particulier les modèles murins de maladies rares. J'ai étudié principalement deux pathologies affectant deux tissus dentaires minéralisés, l'émail et la dentine, dessinant ainsi mes deux axes de recherche avec pour objectif commun la mise en évidence et/ou compréhension des dysfonctionnements moléculaires associés aux pathologies étudiées.

Le premier axe de recherche de ce projet a consisté à étudier les conséquences de la mutation du gène *claudin-16* responsable d'une pathologie rénale sévère (l'hypomagnésémie hypercalciurie et néphrocalcinose familiale ou HHNF) sur la formation de l'émail.
Nous avons démontré que la carence en CLDN16 conduit à une structure altérée des ameloblastes sécrétoires, à une réduction du pH extracellulaire dans la matrice de l'émail et à un traitement anormal de protéines dans cette matrice. Grâce à l'étude d'un autre modèle murin invalidé pour la claudin-3 nous avons pu confirmer ces résultats, soulignant l'importance des claudines pour la structure des jonctions serrées, dans la formation des dents.
Pour le second axe de mon projet, je me suis intéressée à l'identification de la mutation d'un nouveau gène impliqué dans la dysplasie dentinaire de type 1, le gène Trip 10 (Thyroid hormone receptor interactor 10) codant pour la protéine CIP4 (CDC42-interacting protein 4), une protéine à domaine BAR qui serait notamment impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine.
Nous suggérons que l'absence de TRIP10 à la membrane pourrait induire un dérèglement de la voie β-caténine. Cette perturbation pourrait affecter à la fois la formation des racines et l'ancrage des dents au parodonte, ce qui explique la perte dentaire précoce subie par les patients.

En étudiant les mécanismes impliqués dans les défauts de la minéralisation de l'émail et de la dentine, ce travail a permis d'identifier des nouveaux gènes et/ou leur implication dans des pathologies dentaires, d'apporter des éléments permettant une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces pathologies et un meilleur accompagnement du diagnostic associé à une meilleure prise en charge des patients.

MOTS CLES : Email, amelogénèse imparfaite, jonctions serrées, claudine, dentine, dysplasie dentinaire de type I, Trip10/Cip4.

**REMERCIEMENTS :**

Je remercie les membres de mon jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail de Diplôme de l'EPHE. Merci à Mme Sophie Gad-Lapiteau d'avoir accepté de présider le jury ; à Sylvie Babajko d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de Diplôme de l'EPHE en qualité de rapporteur mais également à Ahmed Zahraoui, examinateur de mon mémoire.

Catherine Chaussain, que je remercie pour m'avoir fait confiance et recruté dans son équipe il y a de cela 6 années maintenant : que le temps passe vite ! Merci de m'avoir laissé suivre cette formation qui m'a permis de prendre un peu plus confiance en moi.

Je remercie Claire Bardet d'avoir accepté d'être ma tutrice scientifique et pour m'avoir accordé autant de confiance et d'autonomie sur ces différents projets.

Je remercie Sylvie Demignot, d'avoir accepté d'être ma tutrice pédagogique, d'avoir corrigé et évalué ce travail. Merci également pour sa gentillesse, sa disponibilité et tous ses conseils.

Aux membres de l'EA2496, merci pour votre aide et votre gentillesse.

Merci à ma famille, et plus particulièrement mon conjoint Cyril, pour son soutien dans les nombreux moments de doutes que j'ai pu traverser durant ces quatre dernières années.

Merci à ma petite Manon qui m'a accompagné durant toute cette aventure : dans mon ventre, en suivant avec moi les différentes UE et également durant la rédaction de mon mémoire pendant toute la fin de ma grossesse, et qui je pense, sera maintenant particulièrement calée sur les maladies du métabolisme phosphocalcique. Ce qui aura peut-être pour conséquence chez elle, de créer une vocation dans le futur, en tant que chercheuse ou pourquoi pas dentiste (beaucoup plus lucratif !!!). Tu es ce qu'il y a de plus précieux pour moi.

# SOMMAIRE

**LISTE DES ABREVIATIONS ..... 7**

**LISTE DES TABLEAUX : ..... 9**

**LISTE DES FIGURES : ..... 10**

**INTRODUCTION ..... 11**

**CHAPITRE 1 : REVUE DES CONNAISSANCES ..... 13**

**1 Données générales de la dent 13**
1.1 Structure d'une dent 13
1.2 Les étapes du développement dentaire 13
1.2.1 L'initiation ..... 14
1.2.2 Formation de la placode ..... 15
1.2.3 Transition du stade bourgeon au stade capuchon (ou cupule) ..... 15
1.2.4 Le stade cloche ..... 15
1.2.5 Les différenciations cellulaires ..... 16
1.2.6 L'éruption ..... 17

**2 Anomalies dentaires 19**
2.1 Les anomalies de développement (nombre, de forme et de taille) 19
2.1.1 Dents manquantes ..... 19
2.1.2 Dents surnuméraires ..... 20
2.1.3 Anomalies de forme et taille ..... 20
2.2 Anomalies de structure 21
2.2.1 - Les anomalies de l'émail ..... 21
2.2.2 Anomalies de la dentine ..... 22
2.3 Anomalies d'éruption, de résorption et d'ancrage de la dent 23

**3 Le modèle murin comme modèle d'étude de la physiopathologie orofaciale 23**

**4 L'Amélogenèse imparfaite 26**
4.1 L'Amélogenèse 26
4.2 L'Amélogenèse Imparfaite 27
4.3 Les Claudines et l'Amelogenèse 29

**5 Dysplasie dentinaire 30**
5.1 Dentinogenèse 30
5.2 Phénotype des dysplasies dentinaires 32

**6 Objectifs 34**

**CHAPITRE 2 : LA DEFICIENCE EN PROTEINES DE JONCTIONS SERREES DES AMELOBLASTES, LES CLAUDINES, CONDUIT A UNE AMELOGENESE IMPARFAITE ....37**

**1 Introduction 37**
1.1 La famille des protéines Claudines 37

1.2 Implication du gène CLDN16 dans l'hypomagnesémie, hypercalciurie (HC) et néphrocalcinose ou FHHNC 39
1.3 La Claudine-3 et le développement dentaire 40

**2 Matériel et méthodes 41**
2.1 Le modèle murin 41
2.1.1 Modèle Cldn16−/− de la pathologie FHHNC ... 41
2.1.2 Modèle Cldn3 - / - (non associé à une pathologie) ... 42
2.1.3 Entretien de la lignée de souris transgénique Ko Cldn16-/- et Cldn3-/- par croisement successifs des souris ... 42
2.1.4 Génotypage des souris obtenues après croisement des souris Cldn16$^{+/-}$ ou Cldn3$^{+/-}$ ... 43
2.2 Extraction des ARN et PCR après transcription inverse (RT-PCR) 44
2.3 Histochimie 46
2.3.1 Prélèvement des hémi-mandibule et inclusion dans l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound) ... 46
2.3.2 L'immunofluorescence ... 47
2.3.3 Mise en place de la technique d'Hybridation in situ et son utilisation pour la localisation fine de l'expression de Cldn-16 ou Cldn-3 au niveau du rein et de la dent ... 49
2.3.3.1 Inventaire des besoins et coûts ... 49
2.3.3.2 Préparation des sondes ... 50
2.3.3.3 Préparation des coupes de tissus ... 53
2.3.3.4 Hybridation in situ (HIS) ... 53
2.3.4 Zymographie in situ ... 54
2.3.5 Mesure du pH dans l'incisive de souris adulte ... 55
2.4 Microscopie électronique à balayage (MEB) 57
2.5 Microscopie électronique en transmission (TEM) 57
2.6 Analyse par microtomographie à rayons X : micro-CT (micro computed tomography) 58
2.7 Extraction protéique et Western blot 60

**3 Résultats 61**
3.1 Diagnostic d'AI chez des patients atteints de FHHNC 61
3.2 Défauts de l'émail chez les souris Cldn16$^{-/-}$ et Cldn3$^{-/-}$ 62
3.2.1 Identification des souris Cldn-16 et Cldn-3 par génotypage ... 62
3.2.2 Imagerie au micro CT de mandibules de souris sauvages comparées à celles des modèles Cldn16−/−et Cldn3−/− ... 62
3.3 Cldn16 et Cldn3 sont exprimées dans tubules rénaux et font partie intégrante des améloblastes sécréteurs présents au niveau des jonctions serrées 64
3.3.1 Analyse de l'expression des Claudines-16 et 3 par PCR après transcription inverse : RT-PCR ... 64
3.3.2 Localisation des protéines Claudin-16 et 3 par immunohistochimie ... 64
3.3.3 Analyse western blot ... 65
3.3.4 Localisation de l'expression de l'ARNm des gènes Cldn16 et 3 par hybridation in situ ... 66
3.4 Effets de la mutation des Claudines sur la structure des jonctions serrées 69
3.5 Conséquences de la mutation de Cldn16 sur la matrice de l'émail 70
3.5.1 Les analyses en microscopie à balayage ... 70
3.5.2 Analyse de l'activité protéolytique de la MMP-20 par zymographie ... 71
3.5.3 Effet de la perte de fonction de Claudine-16 sur le pH dans l'incisive ... 72
3.5.4 Conséquences de la mutation sur l'expression des protéines de la matrice de l'émail ... 73
3.5.4.1 Par hybridation in situ ... 73
3.5.4.2 Par analyses en Western Blot ... 74
3.5.4.3 Par immunohistochimie ... 75

**4 Discussion 77**

**CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GENE, TRIP10, IMPLIQUE DANS LA DYSPLASIE DENTINAIRE ... 80**

**1 Introduction 80**
1.1 Le gène Trip 10 80
1.2 Implication du gène *Trip* 10 dans la forme autosomique récessive de la DD-I 83

**2 Matériel et méthodes 84**
2.1 Les patients 84
2.2 Les techniques utilisées 85
2.2.1 Analyse micro CT d'une dent d'un des patients 85
2.2.2 Extraction des ARN totaux et RT-PCR 86
2.2.3 Analyse de l'expression des ARNm Trip10 par Hybridation in situ 86
2.2.4 Culture de cellules souche de pulpe dentaire humaine (hDPSC) 87
2.2.5 Transfection transitoire sur cellules hDPCS d'un plasmide contenant le gène Trip10 muté 87
2.2.6 L'immunohistochimie sur cellules hDPCS 88

**3 Résultats 90**
3.1 Analyse de la dentine de patients par imagerie en micro tomographie à rayon X 90
3.2 Analyse de l'expression de TRIP10 dans la dent 90
3.2.1 Analyse de l'expression Trip10 par RT- PCR 90
3.2.2 Analyse de l'expression par Hybridation in situ 91
3.3 Effet de la mutation p.Arg139Gly sur la protéine Trip10 92
3.3.1 Localisation de la protéine Trip 10 sauvage par immunohistochimie sur cellules DPSCh sauvages 92
3.3.2 Localisation de la protéine Trip 10 après transfection de la version sauvage et mutée de Trip 10 sur cellules DPSCh 92

**4 Discussion 94**

**CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 97**

**CONCLUSION 100**

**BIBLIOGRAPHIE 101**

**ANNEXES : LISTE DES COMMUNICATIONS 108**

# LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AI : Amélogénèse imparfaite
*AMELX* : Amélogénine
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine Triphosphate
BCECF : 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl) -5-(et-6)-carboxyfluorescéine
BCIP : 5- Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-4-toluidine salt
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BSA : Albumine de sérum bovin
BSP : Sialoprotéine osseuse ou Bone SialoProtein
CIP4 : CDC42-interacting protein 4
CLDN3 : Claudin-3
CLDN16 : Claudin-16
CLDN19 : Claudin-19
CTP : Cytidine triphosphate
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DD : Dysplasie dentinaire
DI : Dentinogenèse imparfaite
DIG : Digoxygénine :
*DLX3 :* Distal-less homeobox 3
DMP1 : Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
DPP : Dentin phosphoprotein
DPSC : Dental pulp stem cells
DSP : Sialoprotéine dentinaire ou Dentin SialoProtein
DSPP : sialophosphoprotéine dentinaire
EMP : Enamel Matrix Protein
ECL1 : Extra Cellular Loop
ENAM : Enameline
FAM20A: Family with sequence similarity 20 gene
F-BAR : Bin–Amphiphysin–Rvs F
FGF : Facteur de croissance du fibroblaste
FHHNC : Hypomagnésémie hypercalciurie et néphrocalcinose familiale
GEH : Gaine épithéliale de Hertwig
GFP : Green fluorescent protein
GLUT4 : Glucose transporter type 4
GTP : Guanosine triphosphate
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HIS : Hybridation in situ
HNPP : 2-hydroxy-3-naphtoic-2'-phenylanilide phosphate
JAM : Junctional Adhesion Molecules
*KLK4*: Kallikrein-related petidase 4
KO : Knock Out
MABT : Maleic acid buffer containing *Tween* 20
MEB : Microscopie électronique à balayage
Micro CT : Micro computed tomography

MAGUK: Membrane-Associated Guanylate Kinase
MEPE : Matrix Extracellular phosphoglycoprotein
MMP20 : Matrix metalloproteinase-20
Msx : Muscle segment homeobox gene 1
NBT : Nitro Blue Tetrazolium Chloride
Npt2A : Transporteur rénal de phosphate sodium-dépendent A
OCT : Optimal Cutting Temperature compound
OPN : Ostéopontine
Pax9 : Paired box gene 9
PBS : Phosphate-buffered saline
PCR : Polymerase chain reaction
PFA : Paraformaldehyde
RHOQ : *Ras Homolog Family* Member Q
RT-PCR : Reverse Transcription PCR
SH3 : SRC Homology 3 Domain
SIBLINGs : Small Integrin-binding Ligand, N-linked Glycoproteins
SMAD4 : Son of Mothers Against Decapentaplegic protein 4
SMOC2 : Secreted modular calcium-binding protein 2
SSC : Tampon saline-sodium citrate
TEM : Microscopie électronique à transmission
TGF β : Transforming growth factor beta
TNF :Tumor necrosis factor alpha
Trip 10 : Thyroid hormone receptor interactor 10
UTP : Uridine-5'-triphosphate
WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE : WASP-family verprolin-homologous *protein*
Wnt : Wingless-type MMTV integration site
WT : Wildtype
ZO-1 : Zonula occludens protein-1

# LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Principales caractéristiques des anomalies de l'email.....28
Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier l'ADNg. .....43
Tableau 3 : Résultat du génotypage claudine attendu a_près dépôt sur gel d'agarose. .....44
Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier l'ADNc. .....45
Tableau 5 : Estimation du cout total pour la mise en place de l'hybridation in situ au laboratoire.....49
Tableau 6 : Récapitulatif des sondes synthétisées.....52
Tableau 7 : Séquences des amorces utilisees pour amplifier l'ADNc. .....86
Tableau 8 : Récapitulatif des sondes synthétisées.....86

# LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Structure de la dent ..... 13
Figure 2 : Voies de signalisation régulant le développement dentaire ..... 14
Figure 3 : Schéma récapitulatif des étapes du développement dentaire chez la souris ..... 18
Figure 4 : Origine des différentes anomalies dentaires ..... 19
Figure 5 : Dents manquantes ..... 20
Figure 6 : Dents surnuméraires ..... 20
Figure 7 : Anomalies de forme et de taille ..... 21
Figure 8 : Anomalies de l'émail ..... 22
Figure 9 : Anomalie de la dentine ..... 23
Figure 10 : Comparaison de la dentition ..... 24
Figure 11 : Différentes projections de l'incisive à croissance continue ..... 25
Figure 12 : Diagramme de représentation des différents stades de l'amelogenèse sur l'incisive de souris à croissance continue ..... 25
Figure 13 : Etapes de la formation de l'email ..... 27
Figure 14 : Evolution des complexes de jonctions durant la phase de sécrétion des améloblastes ..... 29
Figure 15 : Evolution des complexes de jonctions durant la phase de maturation des améloblastes ..... 30
Figure 16 : Comparaison de la structure du tissus osseux et dentine. ..... 31
Figure 17: radiographie panoramique d'un patient présentant une DDI ..... 32
Figure 18 : Principales différences entre DDI et DDII ..... 33
Figure 19 : Schéma récapitulatif projet Claudines ..... 35
Figure 20 : Structure d'une jonction serrée ..... 38
Figure 21 : Transport paracellulaire du calcium et du magnésium dans la branche ascendante de l'anse de Henlé dans le rein médié par CLDN16 et CLDN19 ..... 39
Figure 22 : Expression des Claudines ..... 41
Figure 23 : Délétion dirigée du gène murin Claudin-16 ..... 42
Figure 24 : Délétion dirigée de l'unique exon du gène murin Claudin-3 en utilisant une approche Cre/lox P ..... 42
Figure 25 : Représentation schématique du prélèvement, de l'inclusion en OCT et de la zone d'intérêt retenue pour les coupes cryostats de mandibule de souris trois jours après la naissance ..... 47
Figure 26 : Représentation schématiques des étapes de l'hybridation in situ ..... 49
Figure 27 : Carte du vecteur plasmidique utilisé pour la synthèse des sondes HIS ..... 50
Figure 28 : Représentation schématique de la zymographie in situ ..... 54
Figure 29 : Fluorophore BCECF incorporé dans l'incisive afin d'évaluer le pH par spectroscopie de fluorescence ..... 56
Figure 30 : Le micro CT Quantum FX Caliper ..... 59
Figure 31 : Patiente envoyée par le Centre de référence des maladies rares du métabolisme du phosphate et du calcium ..... 61
Figure 32 : Représentation généalogique de la famille étudiée ..... 85
Figure 33 : Phénotype dentaire de la molaire de patients Trip10 par imagerie au micro CT. ..... 90

# INTRODUCTION

Une maladie est dite rare lorsqu'elle atteint moins d'une personne sur 2 000. On dénombre environ 7000 maladies rares dont 80% sont d'origine génétique. Ces maladies concernent environ 30 millions de personnes en Europe dont 3 à 4 millions en France.

Les anomalies dentaires, qu'elles soient de nombre, forme, taille, structure ou d'éruption/résorption, font parties des manifestations phénotypiques de maladies rares ou syndromes fixant dans le temps des troubles issus du développement.

Notre équipe de recherche, EA2496 située à la faculté de Chirurgie dentaire de l'Université Paris Descartes, bénéficie de l'interface et de l'interaction forte avec la clinique. Ce travail vise à identifier de nouveaux gènes cibles impliqués dans les maladies génétiques dentaires et étudier les mécanismes sous-jacents afin, d'une part, d'accompagner le diagnostic clinique par un diagnostic génétique, et d'autre part, d'aider à la prise en charge des patients et au développement de nouveaux traitements par une meilleure connaissance de la pathologie. Ce travail s'intègre donc dans un processus de recherche translationnelle, grâce à de nombreuses collaborations entre les structures universitaires, hospitalières, laboratoires, instituts et centres de Référence, tels que le centre de référence des Maladies Rares du Métabolisme du Phosphore et du Calcium. C'est dans ce contexte que j'ai commencé à travailler sur les pathologies génétiques affectant la minéralisation de l'organe dentaire.

L'organe dentaire est une entité à part entière issue de la papille mésenchymateuse et assurant par son aspect morpho-fonctionnel la fonction masticatrice.
Il est constitué par un ensemble de tissus dont l'association au sein de l'organe dentaire assure différentes fonctions.

La dent est constituée de la pulpe, cœur vivant de la dent, et de trois tissus minéralisés, l'émail, la dentine et le cément.

- La pulpe dentaire confère à la dent ses propriétés de défense, de nociception et de nutrition via la présence de vaisseaux et de nerfs.
- L'émail est un tissu inerte, non vascularisé et non innervé, qui recouvre la couronne dentaire jusqu'au collet. Il s'agit du tissu le plus minéralisé puisqu'il est composé de plus de 95% d'éléments minéraux. C'est en effet le tissu le plus dur du corps humain. Il protège et isole la dent

des agents extérieurs (variations de température, pression masticatoire, acides alimentaires). L'émail n'est pas capable de se cicatriser en cas de carie, ni en cas de fracture. Cette partie minérale est essentiellement phosphocalcique. Elle présente une structure prismatique.

- La dentine se situe sous l'émail coronaire et le cément radiculaire. Elle représente le tissu qui occupe le volume le plus important de la dent. Elle contient environ 70% d'éléments minéraux (composé principalement de cristaux d'hydroxyapatite carbonatée), 20% de matrice organique (composé de collagènes essentiellement de type 1) et 10% d'eau. Elle présente une composition voisine de l'os, mais diffère par sa structure poreuse. Elle est parcourue par des canalicules dentinaires dans lesquels on retrouve les fibres de Tomes. Ces fibres émanent des cellules situées en périphérie de la pulpe : les odontoblastes.
- Enfin, le cément présente un degré de minéralisation avoisinant les 63%. Il permet l'ancrage de la dent dans son parodonte.

Mon projet de recherche est centré sur les pathologies affectants les processus de la minéralisation de la dent. Il est basé sur l'analyse de données cliniques en parallèle à des données ex vivo de tissus humain et in vivo chez la souris, en particulier les modèles murins de maladies rares. J'ai eu l'opportunité de travailler sur deux pathologies affectant deux tissus dentaires, l'émail et la dentine, dessinant ainsi mes **deux axes de recherche** avec pour objectif commun la mise en évidence et/ou la compréhension des dysfonctionnements moléculaires associés aux pathologies étudiées.

**Le premier axe de recherche** de ce projet a consisté à étudier les conséquences de la mutation du gène *Claudin-16*, responsable d'une pathologie rénale sévère (l'hypomagnésémie hypercalciurie et néphrocalcinose familiale ou HHNF), sur la formation de l'émail. Cette pathologie est également associée à des mutations dans *claudin-19*.

**Pour le second axe de mon projet,** je me suis intéressée à l'identification de la mutation d'un nouveau gène impliqué dans la dysplasie dentinaire de type 1, le gène *trip10* (Thyroid hormone receptor interactor 10) codant pour la protéine CIP4 (CDC42-interacting protein 4). Ce travail a fait l'objet d'un article actuellement soumis.

# CHAPITRE 1 : REVUE DES CONNAISSANCES

## 1 Données générales de la dent

### 1.1 Structure d'une dent

Anatomiquement, la structure d'une dent se distingue en deux parties. En effet, cet organe est composé d'une partie visible, la couronne, et d'une partie cachée, la racine. La couronne s'unit avec la racine par le collet. La dent se compose de plusieurs couches : L'émail, la dentine, le cément et la pulpe dentaire (Fig.1).

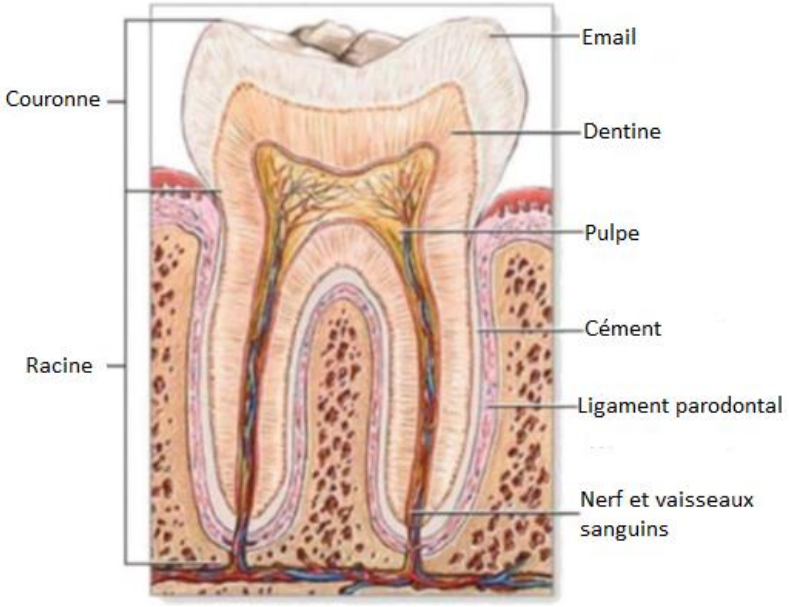



***Figure 1 : Structure de la dent***
*(S.V. Dorozhkin ; 2011)*

### 1.2 Les étapes du développement dentaire

Le développement dentaire est initié grâce à la migration des cellules de la crête neurale céphalique vers le premier arc pharyngien et les interactions épithélio-mésenchymateuses, se traduisant par un dialogue réciproque entre l'épithélium buccal et le mésenchyme sous-jacent (Thesleff et al., 1995)

Ce processus se décompose en 5 stades :

- Lame dentaire
- Le bourgeon

- Le capuchon ou cupule
- La cloche
- L'édification radiculaire avec l'éruption dentaire

Ces différentes phases sont régulées par des voies de signalisation conservées dans l'évolution (Fig.2). Elles sont bien connues et ont été identifiées notamment grâce aux travaux de recherche sur la souris.

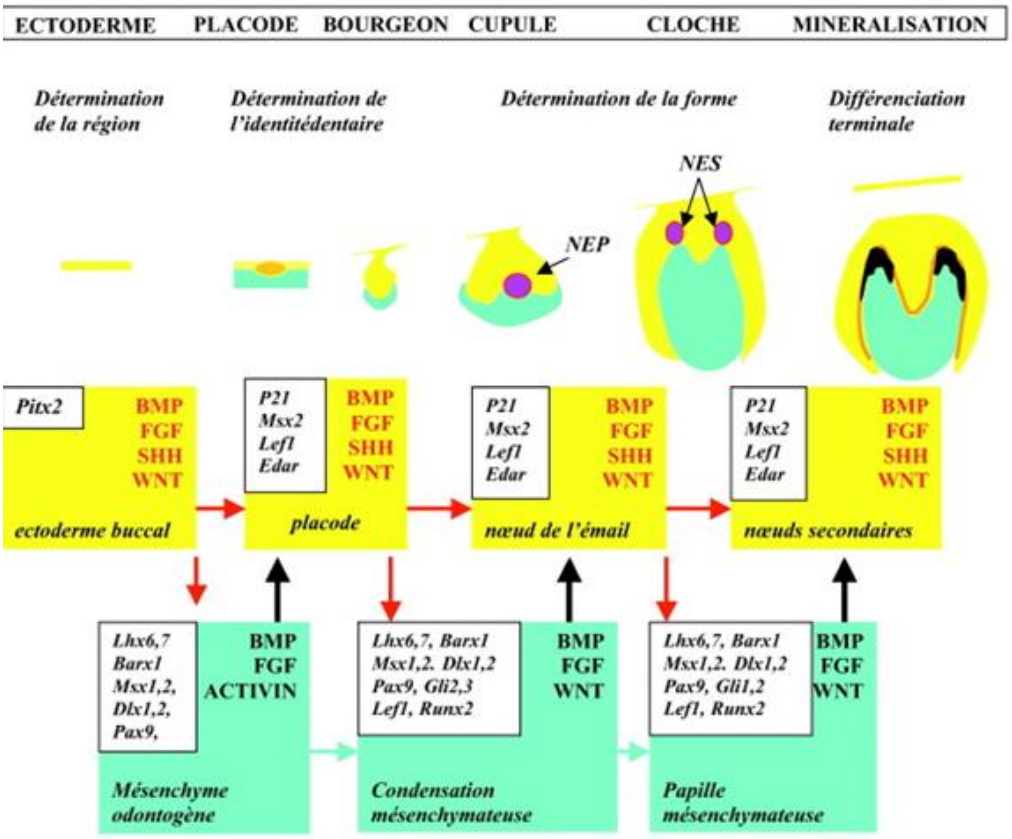



***Figure 2 : Voies de signalisation régulant le développement dentaire***
*(Magloire and Couble, 2011)*

### 1.2.1 L'initiation

Cette phase débute par la formation de l'épithélium odontogène puis la formation de la lame dentaire et vestibulaire. Cet épithélium est formé de plusieurs couches cellulaires dûes à l'augmentation du nombre de divisions cellulaires au niveau de l'épithélium odontogène. Ainsi après une multiplication cellulaire, il en résulte une élongation de cet épithélium. Au niveau de l'épithélium odontogène, la plaque équatoriale est parallèle à la membrane basale, donc chaque division entraine la création d'une nouvelle couche cellulaire. L'épaississement épithélial de l'éctoderme oral recouvrant la cavité buccale va proliférer, s'enfoncer dans l'ectomésenchyme puis se dédoubler pour former deux lames épithéliales : la lame vestibulaire et la lame dentaire.

La lame vestibulaire est à l'origine du futur vestibule, qui est l'espace entre la joue et l'arcade dentaire.

La lame dentaire est à l'origine des placodes dentaires qui donneront ensuite des dents. Au cours de la phase d'initiation, différents processus moléculaires et cellulaires déterminent le type exact, la position et l'orientation de chaque dent lors du développement de l'arcade.

### 1.2.2 Formation de la placode

L'activité proliférative continue et localisée de la lame dentaire va mener au développement de petits renflements appelés placodes dentaires. Chez l'Homme, ces placodes sont au nombre de 10 par arcade dentaire. La formation des placodes ectodermiques se fait par épaississement de l'épithélium à l'emplacement de chaque famille de dent. Des molécules de signalisation interviennent afin de participer au développement des placodes. En effet, le facteur de croissance du fibroblaste (FGF) et la glycoprotéine Wnt agiraient comme activateur alors que la protéine osseuse morphogénétique (BMP) jouerait un rôle de répresseur. D'autres molécules appartenant à la voie de signalisation TNF (facteur de nécrose tumorale) /NF-kappaB, ainsi que le proto-oncogène p63 seraient également impliqués dans la formation des placodes.

### 1.2.3 Transition du stade bourgeon au stade capuchon (ou cupule)

Le bourgeon correspond à un épaississement de l'épithélium plus conséquent et localisé, correspondant à des dents individuelles. Le mésenchyme sous-jacent se condense et contrôle la croissance et le repliement dentaire. Dans l'organe dentaire, des signaux mésenchymateux induisent la formation de centres de signalisation appelés nœuds de l'émail (Enamel Knots). Ce sont des structures transitoires où sont synthétisées plusieurs molécules de signalisation au stade capuchon (Thesleff and Jernvall, 1997). Ainsi, le bourgeon augmente de volume et prend la forme d'une cupule. La prolifération cellulaire épithéliale, caractérisée par une concavité, enveloppe partiellement le mésenchyme sous-jacent, future pulpe dentaire. On distingue alors nettement un ensemble épithélial, une papille mésenchymateuse et une enveloppe mésenchymateuse.

### 1.2.4 Le stade cloche

Le développement des cuspides des molaires est initié par les nœuds de l'émail secondaires qui apparaissent dans l'épithélium dentaire interne aux sites de formations de pointes des futures cuspides. Ils expriment de nombreuses molécules de signalisation dont FGF4 et stimulent la croissance des cuspides. La prolifération cellulaire au voisinage des nœuds de l'email et la non-prolifération dans les nœuds coordonnent les repliements de l'épithélium dentaire interne autour du mésenchyme qui se condense. L'apoptose dans les nœuds va induire la disparition progressive

et la fin de l'activité de signalisation de ces structures à la fin du stade capuchon et au début du stade cloche.

### 1.2.5 Les différenciations cellulaires

Après la disparition des nœuds de l'émail secondaires, les cellules constituant la dent commencent leur différenciation terminale. Les cellules de l'épithélium dentaire interne se différencient en améloblastes, tandis que les cellules mésenchymateuses de la pulpe dentaire se différencient en odontoblastes. Cette différenciation est régulée, comme dans les stades précédents, par des interactions épithélio-mésenchymateuses.

- Tout d'abord, la différenciation des odontoblastes commence par l'arrêt de la prolifération des cellules proches de la membrane basale (cellules périphériques de la papille éctomesenchymateuse). La taille de ces cellules va augmenter, puis elles vont s'accrocher à la membrane basale, grâce à des fibrilles d'ancrage et prendre le nom de pré-odontoblastes. Va ensuite avoir lieu la polarisation des noyaux odontoblastiques, suivie de la formation de prolongements odontoblastiques au pôle apical, qui vont se ramifier et contenir de nombreuses vésicules de sécrétion et d'endocytose. Ce sont des odontoblastes dits « secréteurs » qui alors vont synthétiser les protéines de la dentine : le collagène, les protéines non collagéniques (glycoprotéines), dont les plus abondantes appartiennent à la famille des SIBLINGS (Small Intégrin-binding Ligand, N- linked glycoproteins), ainsi que des protéoglycanes (Butler et al., 2003).

- Puis l'amélogenèse débute en présence de prédentine/dentine après la disparition de la membrane basale, la différenciation des améloblastes nécessitant la présence d'odontoblastes fonctionnels (Karcher-Djuricic et al., 1985 ; Zeichner-David et al., 1995). Les améloblastes sécrètent alors l'émail dentaire et participent à la minéralisation. Ils permettent le retrait de matière organique en particulier les protéines de l'émail ou EMPs (type amélogénines, améloblastine, énaméline, dentine phosphoprotein). Les améloblastes sécrètent la métallo protéinase 20 (MMP20, également appelée "Enamelysin") au stade sécrétoire et la "kallicréine 4" (KLK4) au stade de la maturation afin de cliver et de supprimer des protéines telles que l'Amelogénine et l'Enameline, avant que la matrice de l'émail ne soit entièrement minéralisée. Ainsi, la protéine ENAM clivée par MMP20 pendant la phase sécrétoire servirait d'agents de nucléation pour la formation de cristaux d'hydroxyapatite polysubstituée ou PAH (Xiaohua X. et al., 2016). D'autres analyses ont démontré que le clivage de AMEL serait altéré chez les souris déficientes en MMP20 et que l'AI hypomature chez les souris ko pour KLK4 serait caractérisée par une retenue significative de ENAM dans la matrice d'émail mature (Hu et al., 2016).

- La croissance des cristaux d'émail implique une balance entre l'acidification et la neutralisation du pH de l'émail immature, et l'élimination des fragments protéiques. La croissance des cristaux ne peut se faire que si les nanosphères d'amélogénine sont éliminées par l'activité protéolytique de la MMP20, enzyme produite en grande quantité pendant la phase de maturation. Cette activité protéolytique dépend essentiellement des valeurs du pH dans la matrice. Ainsi, le développement de l'émail comprend deux grandes étapes : la phase sécrétoire et la maturation. Dans la phase sécrétoire, les améloblastes synthétisent et sécrètent de nombreuses protéines de structures de la matrice de l'émail (EMPs). La matrice de l'émail pendant la phase sécrétoire, est maintenue à un pH proche de la neutralité (pH d'environ 7.2) (Lacruz et al., 2010), dans un environnement riche en protéines, ce qui permet sa minéralisation concomitante et un procédé de clivage des EMPs en particulier par la MMP20. Tous ces résultats démontrent que le traitement des protéines de matrice de l'émail et par MMP20 et KLK4 est essentielle au processus normal d'amélogenèse.
- Les différenciations terminales des odontoblastes et améloblastes, ainsi que la synthèse de la dentine et de l'émail, sont régulées par des molécules de la famille des TGF beta (pour facteur de croissance transformant, type BMP) et les FGF. Ces molécules participant aux interactions épithélio-mésenchymateuses sont synthétisées par les préodontoblastes et préaméloblastes et sont émises par l'intermédiaire de la membrane basale et de la dentine/prédentine.

La formation de la dentine et de l'email sont interdépendantes. Les odontoblastes sécrètent les amélogénines et les améloblastes sécrètent transitoirement la Sialoprotéine dentinaire (DSP) et la phosphoprotéine dentinaire (DPP) pendant la formation de la jonction émail/dentine (White et al. 2007).

### 1.2.6 L'éruption

C'est un phénomène régulé par les interactions tissulaires et nécessite plusieurs signaux. Cet événement post-natal intervient chez l'Homme dans les mois ou les années après la naissance, la dent émerge de sa crypte osseuse pour devenir fonctionnelle. Chez la souris ce processus est localisé, symétrique et programmé dans le temps. La phase pré-éruptive correspond à la période pendant laquelle la couronne dentaire se forme. La phase éruptive débute avec la croissance radiculaire (formation des racines dentaires). Le développement des racines ne commence qu'à partir du moment où les dimensions définitives de la couronne sont acquises, présentant une couche d'émail et de dentine. La formation des racines est liée à la présence d'un

organe épithélial radiculaire particulier, la gaine épithéliale de Hertwig (GEH ou HERS) (Ten cate, 1996). Cette gaine constitue en effet, l'élément central à l'édification radiculaire, en induisant la cytodifférenciation des odontoblastes radiculaires conduisant à la dentinogenèse radiculaire (Thomas, 1995).

La radiculogenèse (aussi appelée rhizagenèse) permet l'élaboration de l'organe pulpo-dentinaire radiculaire (Fig.3). Elle est en étroite relation avec la cémentogenèse, qui conduit à la synthèse du cément qui recouvre partiellement la surface des racines.

D'autres mécanismes entrent en jeu tels que la pression vasculaire dans les capillaires de la pulpe dentaire. La formation et la maturation du ligament alvéolo-dentaire pourraient également intervenir dans ce processus qui reste partiellement élucidé. Des interactions entre ostéoblastes, ostéoclastes et le follicule dentaire ont été mis en évidence. L'éruption dentaire nécessite une résorption osseuse localisée pour déterminer le chemin de l'éruption mais également l'élaboration d'un tissu osseux afin de combler l'espace précédemment occupé par le germe dentaire.

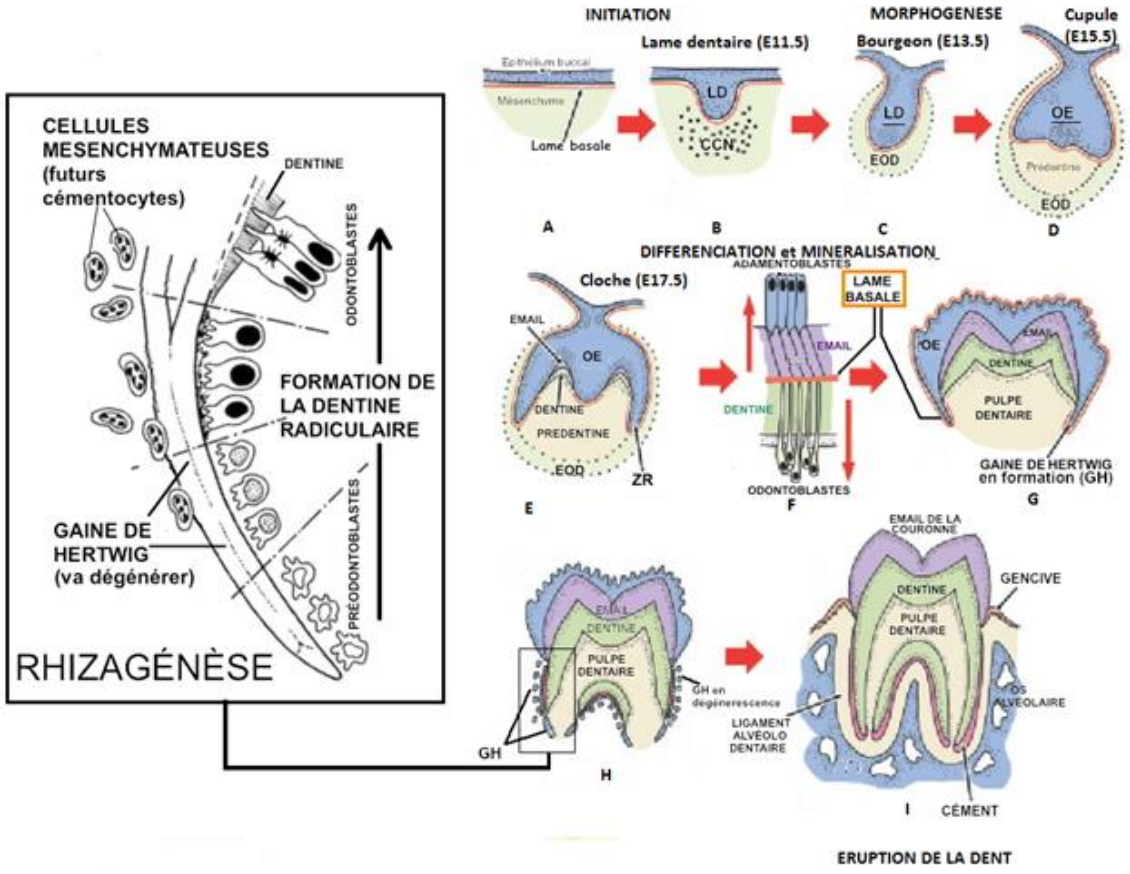



***Figure 3 : Schéma récapitulatif des étapes du développement dentaire chez la souris***
*(transformé à partir de Oshima H, J oral Biosci.*

# 2 Anomalies dentaires

Les anomalies dentaires, peuvent être regroupées en anomalies de nombre, de forme, de taille, de structure, de formation radiculaire ou d'éruption. Elles peuvent impacter aussi bien la denture temporaire que permanente.

Ces anomalies résultent de différents facteurs : génétiques, environnementaux ou systémiques (fig.4).

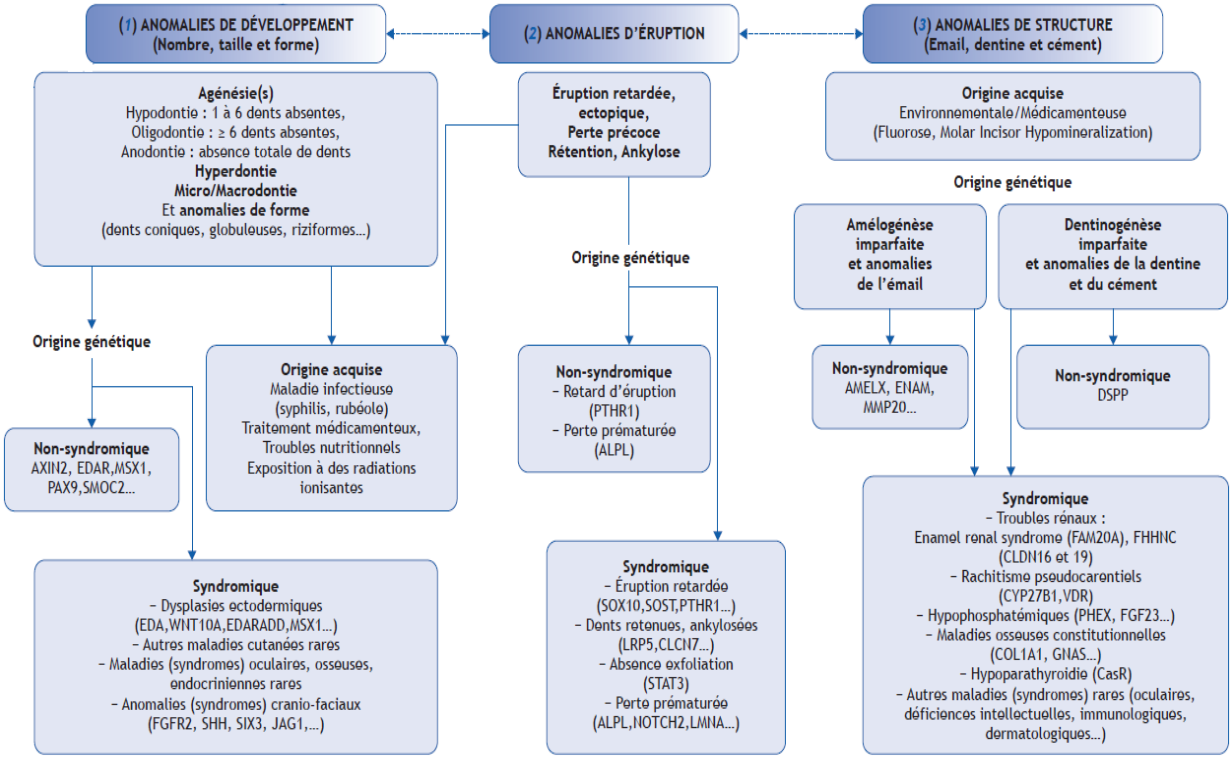



*Figure 4 : Origine des différentes anomalies dentaires*

Lorsqu'elles sont d'origines génétiques, différentes voies de signalisations intervenant au cours du développement dentaire peuvent être impliquées (fig.2).

## 2.1 Les anomalies de développement (nombre, de forme et de taille)

Ce sont des anomalies acquises (maladie infectieuse, exposition à des radiations ionisantes, ou à des médicaments…) ou d'origine génétique. Plus les gènes atteints par les expositions sont précoces, lors de l'embryogénèse, plus les anomalies dentaires seront sévères. Les anomalies génétiques syndromiques se retrouvent dans des maladies rares d'expressions très variées.

### 2.1.1 Dents manquantes

Il s'agit d'une anomalie de nombre, associée à des mécanismes régulant le patron de la dentition et la transition du bourgeon au capuchon. Elle se traduit par l'absence d'une ou plusieurs dents (agénésie dentaire), incluant : l'hypodontie, l'oligodontie, l'anodontie (Fig.5).

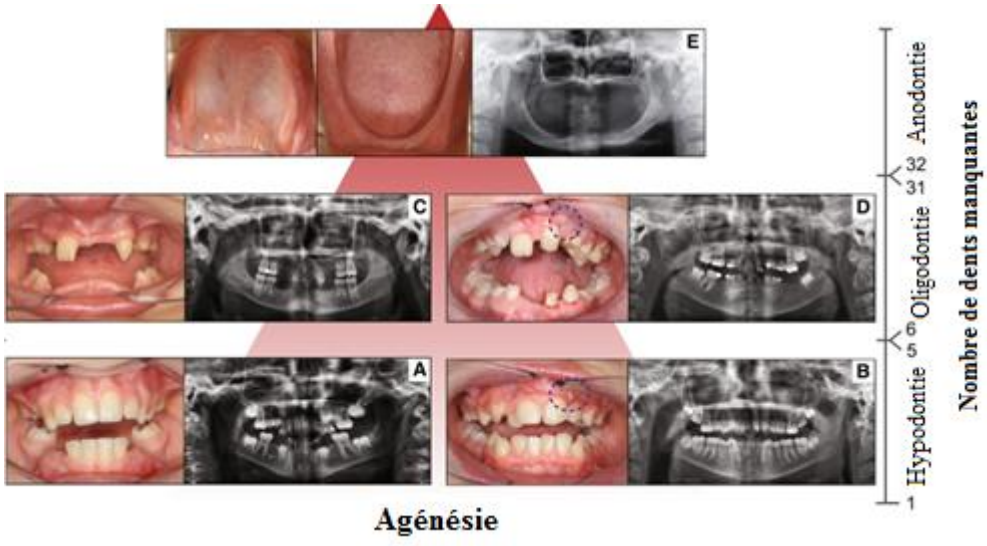



***Figure 5 : Dents manquantes***
*A-B) Hypodontie : absence de 1 à 5 dents. C-D) Oligodontie : absence de six dents ou plus. E) Anodontie : absence totale des dents. (Phan et al., 2016)*

De nombreux de gènes et voies de signalisation tels que *Msx1*, *Pax 9*, les voies Wnt, TNF /NF-kappaB et FGF, ont été identifiés comme impliqués dans cette anomalie dentaire (Phan et al., 2016).

### 2.1.2 Dents surnuméraires

Il s'agit d'une anomalie de nombre, plus fréquente en denture permanente, qu'en denture temporaire (Fig.6).



***Figure 6 : Dents surnuméraires (Holt et al., 2000)***

Plusieurs gènes ont été identifiés comme étant liés à ce type d'anomalie tels que *Runx2* (Runt-related transcription factor 2) et USAG-1 (Togo et al., 2016).

### 2.1.3 Anomalies de forme et taille

- L'anomalie de forme, généralisée ou localisée, affecte soit la couronne, soit la racine, soit toute la dent (Fig.8)

- L'anomalie de taille (Fig.8) :

Si l'organe dentaire paraît de taille inférieure à la normale, on parle de microdontie. Au contraire, lorsque la dent a un volume excessif, on parle de macrodontie.



*Figure 7 : Anomalies de forme et de taille (Bloch-Zupan et al., 2011)*

La mutation du gène codant pour la protéine de la famille SPARC, protéine 2 de liaison au calcium modulaire sécrétée *(SMOC2)*, est notamment connue pour être responsable de ce type d'anomalies (Bloch-zuplan et al, 2011).

## 2.2 Anomalies de structure

Elles peuvent avoir différentes origines :

- Soit acquises et dans ce cas peuvent être liées soit à une exposition médicamenteuse (ex. : doxycycline pendant la grossesse) soit à une exposition dite « environnementale ».
- Soit génétiques, se traduisant par une atteinte de toutes les dents, aussi bien permanentes que temporaires, même si l'expression du phénotype peut être plus ou moins sévère d'une denture à l'autre. La variabilité interindividuelle est également très importante, même au sein d'une même famille.

### 2.2.1 - Les anomalies de l'émail

Les anomalies de l'émail peuvent être d'origine :

- Soit génétique, comme c'est le cas pour l'amélogenèse imparfaite.

Les altérations de structure de l'émail peuvent être soit limitées aux dents et dites non syndromiques (gènes impliqués dans la formation de l'émail tels que AMEL, ENAM), soit associées à des anomalies d'autres systèmes tels que des troubles rénaux (Cld16 et 19 : FHHNC), et sont alors appelées syndromiques.

- Soit acquise : comme dans le cas d'une dysplasie de l'email. Ou résulter d'un excès d'absorbtion de fluor (fluoroses) ou une exposition à des ensembles de perturbateurs (endocriniens, microparticules, etc.) comme dans le MIH pour *Molar Incisor Hypomineralization* (Jedeon et al., 2014)

Différentes formes d'anomalies de l'émail existent en fonction de la nature du défaut amélaire (Fig.8) :

- Lorsque l'altération est quantitative, il s'agit d'un trouble du stade formatif. Il y a insuffisance de matrice amélaire au cours de l'amélogenèse. Ce qui conduit à un émail dur mais très mince et rugueux.
- Lorsque l'altération est qualitative, il s'agit d'un trouble de la maturation, il y a perturbation de la minéralisation conduisant à un email d'épaisseur normale mais extrêmement mou se séparant de la dentine.

Ces deux formes peuvent aussi être mêlées.




*Figure 8 : Anomalies de l'émail*
*a) et b)Amélogenèse hypoplasique (absence partielle ou totale de l'émail) . c) amélogenèse hypominéralisée (émail mou, friable ou rugueux). d) Amélogenèse hypomature (émail d'aspect blanc crayeux mais dureté préservée) (Crawford et al., 2007)*

### 2.2.2 Anomalies de la dentine

Les anomalies de la dentine peuvent être d'origine :

- Soit génétique, comme c'est le cas pour la dentinogénèse imparfaite.

Les altérations de structure de la dentine peuvent être non syndromiques (gènes impliqués tels que DSPP), ou syndromiques (s'accompagne d'un syndrome d'Hallerman Streiff et d'Hushton-Gildford (Piette et Goldberg, 2001)

- Soit acquise : rencontré dans les cas de rachitisme vitamine D résistant liés à des dysplasies dentinaires acquises (dentine inter-globulaire importante).

Les anomalies héréditaires de la dentine (Fig.9) sont dues à des mutations de gènes codant pour les protéines majeures qui constituent la dentine, en particulier les collagènes ou les phosphoprotéines (famille SIBLINGs pour Small Intégrin-binding Ligand, N- linked glycoproteins) en particulier la sialophosphoprotéine dentinaire (DSPP), protéine majeure de la minéralisation de la dentine.

Elles sont classées en plusieurs types, les dentinogenèse de type I et types II étant les plus connues. La dentinogenèse de type 1 est associée à l'osteogenèse de type 1 (liée à la mutation gène col1). Dans le cas de la dentinogenèse de type II, seule la dentine affectée. La mutation du gène *DSPP*, est à ce jour la seule connue pour être responsable de la dentinogenèse de type II. Un mode de transmission autosomique dominante a été identifié.

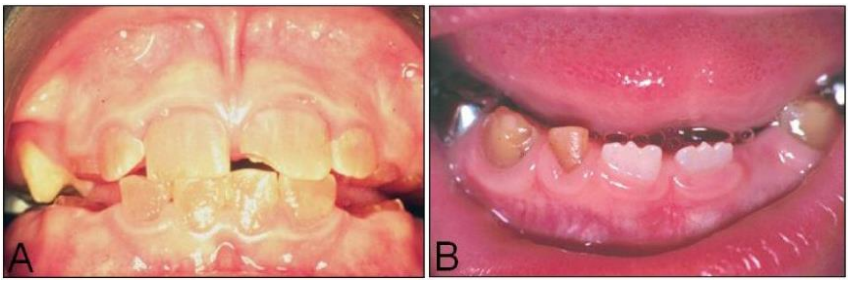



***Figure 9 : Anomalie de la dentine***
*(Barron et al., 2008)*

### 2.3 Anomalies d'éruption, de résorption et d'ancrage de la dent

L'éruption dentaire dépend de la présence de follicules dentaires, de la création de chemin à travers l'os alévolaire par les ostéoclastes et la capacité des ostéoclastes à former un nouvel os (Wise, 2009). Dans les maladies où la fonction des ostéoclastes est réduite, l'éruption est alors affectée sinon absente. Les maladies pour lesquelles la formation des ostéoclastes ou leur fonction est augmentée, sont associées à des anomalies dentaires comme l'hypercémentose, une résorption des racines et une perte des dents prématurée (Helfrich, 2005). La perte prématurée des dents peut aussi être à l'origine des périodontes anormaux et de formation de cément anormale.

## 3 Le modèle murin comme modèle d'étude de la physiopathologie orofaciale

L'objectif de la recherche via le modèle murin, et en particulier sur l'émail, est triple. Il permet 1) de comprendre les mécanismes impliqués dans la formation du tissu, 2) de comprendre l'origine de pathologies génétiques et des anomalies associées (Pugach and Gibson, 2014) et 3) de permettre de mieux prévenir, traiter, et envisager le développement de nouvelles thérapeutiques.

Les rongeurs sont de bons modèles d'étude du développement dentaire :

- Le processus de formation et de développement dentaire est similaire à celui rencontré chez l'Homme. Cependant la souris est monophyodonte (les dents ne sont pas remplacées)

contrairement à l'homme qui possède deux générations de dents, et dit diphyodonte, avec le remplacement des dents temporaires par les dents permanentes.

- Les souris ont trois molaires et une incisive sur chaque hémi arcade séparées par un espace appelé diastème. Chez l'Homme on observe quatre types de dents : deux incisives, une canine, deux prémolaires et trois molaires par hémi-arcade soit 32 dents au total chez l'adulte (Fig.10).

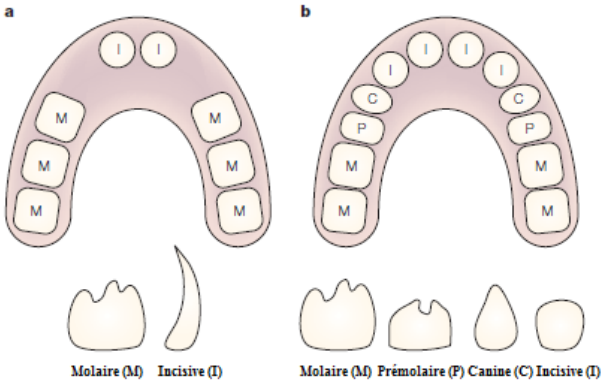



***Figure 10 : Comparaison de la dentition***
*Murine (a) et humaine (b). (D'après Tucker and Sharpe, 2004)*

- Leurs incisives présentent la particularité d'être à croissance continue et récapitulent toutes les étapes du développement de dentaire sur une même dent, et cela, tout au long de la vie de l'animal. L'émail se forme sur la partie labiale de l'incisive (développement asymétrique) et on retrouve tous les stades de différenciation des cellules impliquées dans l'amélogenèse. En partie linguale se trouvent les odontoblastes qui sécrètent la dentine (Fig.11).

Contrairement à la molaire, sur une même incisive il est donc possible d'étudier un stade précis de l'amelogenèse en fonction de l'endroit où l'on se positionne sur la dent. Ainsi sur une incisive de souris adulte, le tiers coté proximal de l'incisive correspondra à la phase de sécrétion (Fig.12.B) : phase durant laquelle les améloblastes synthétisent la matrice de l'émail. Laquelle sera suivie d'une phase de transition (Fig.12.C) et le la phase de maturation de l'email (Fig.12.D).

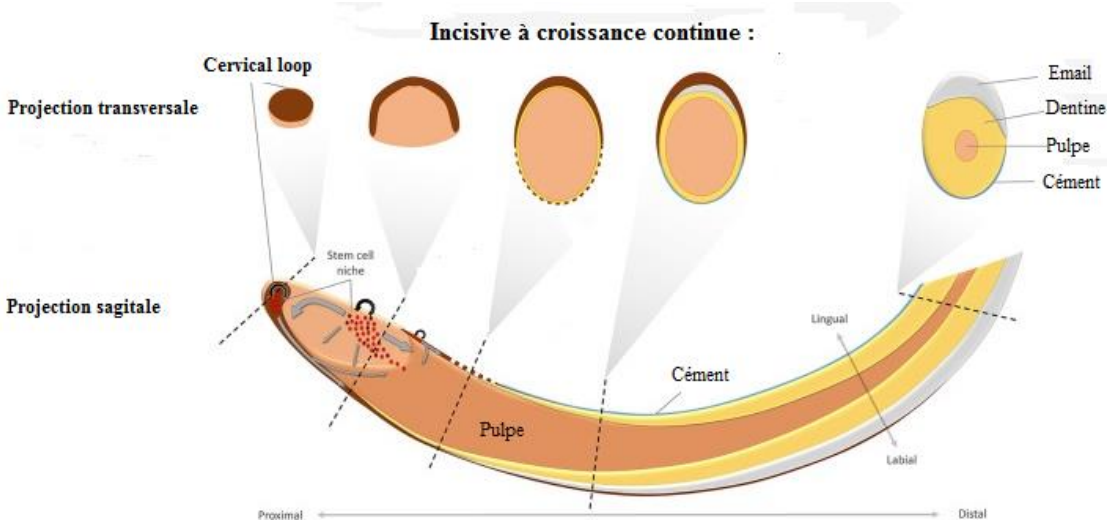



***Figure 11 : Différentes projections de l'incisive à croissance continue***
*( Naderi and Reilly, 2008)*

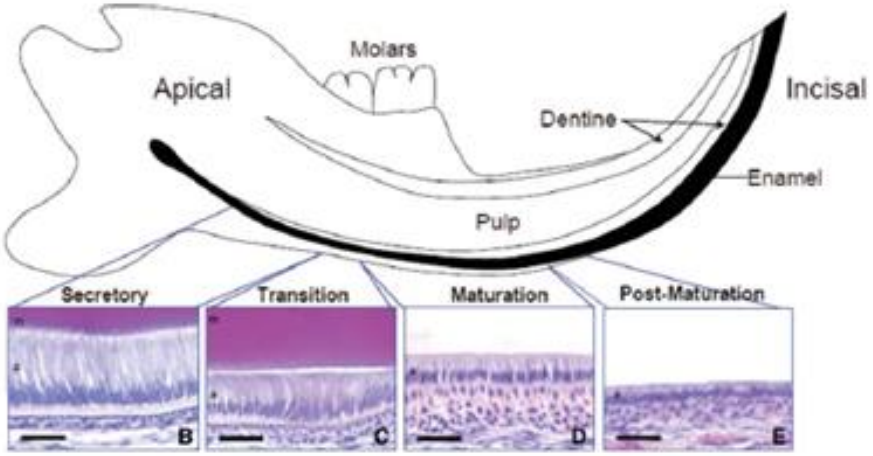



***Figure 12 : Diagramme de représentation des différents stades de l'amelogenèse sur l'incisive de souris à croissance continue***
*(D'après Barron et al., 2010)*

Il est possible de générer des modèles modifiés génétiquement/invalidés pour un gène donné, permettant de comprendre la fonction portée par ce gène ou reproduire l'effet de mutations impliquées dans des pathologies humaines. Pour notre étude nous utilisons deux modèles de souris transgéniques : *Cldn3*$^{-/-}$ afin de comprendre le rôle de claudin3 et *Cldn16*$^{-/-}$ mimant les anomalies et le phénotype d'une pathologie humaine (l'hypomagnésémie hypercalciurie et néphrocalcinose familiale ou HHNF).

# 4 L'Amélogenèse imparfaite

## 4.1 L'Amélogenèse

L'amélogenèse est un phénomène physiologique conduisant à l'édification d'un émail fonctionnel sur la dent. L'email est la seule structure minéralisée du corps d'origine épithéliale. La formation de l'email a lieu avant l'éruption de la dent, dans un environnement extracellulaire confiné, situé entre la dentine et la couche sous-jacente aux améloblastes (Fig.13).

L'amélogenèse se compose de deux étapes :

- Une phase sécrétoire puis une phase de maturation. Une première couche d'émail est sécrétée au contact du manteau dentinaire par les améloblastes sécréteurs sans prolongement de Tomes (émail aprismatique interne). Puis les améloblastes acquièrent un prolongement de Tomes et vont pouvoir former les prismes et la substance inter prismatique créant ainsi un émail prismatique. Cet émail est encore immature (37% de minéral, 19% phase organique, 44% d'eau).
- La deuxième étape de l'amélogenèse est la maturation correspondant à une croissance en largeur et en épaisseur des cristaux d'émail. A la fin de la phase de sécrétion, un quart des améloblastes disparaissent par apoptose. On assiste à une disparition de l'Enaméline et à une arrivée massive de calcium et phosphate dans l'émail. Cet émail mature ne présente presque plus de protéines, ni d'eau : 96% de cristaux, 3.2% d'eau et 0.8% de matière organique.

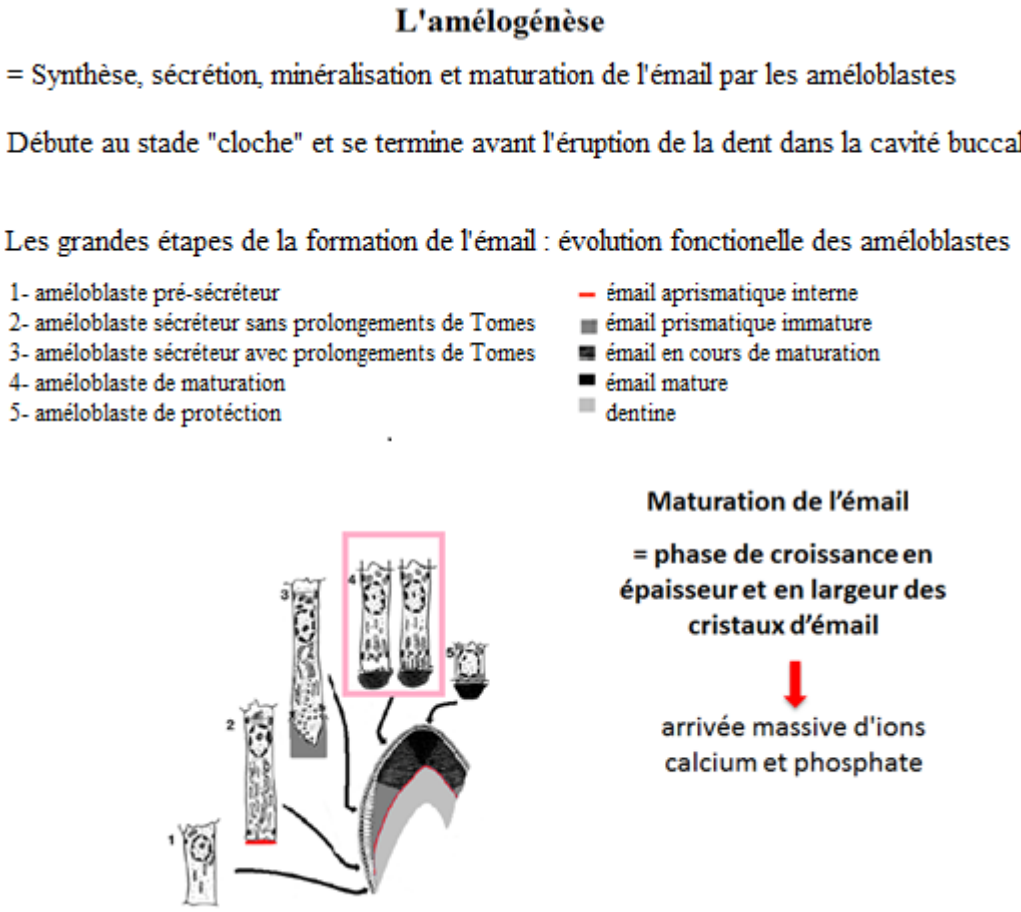



*Figure 13 : Etapes de la formation de l'email*

## 4.2 L'Amélogenèse Imparfaite

L'amélogenèse imparfaite ou *amelogenesis imperfecta* (AI) est une maladie génétique. Tous les modes de transmission sont possibles (autosomique dominant, récessif ou lié à l'X). Elle constitue un groupe d'anomalies du développement affectant la structure et l'apparence clinique de l'émail de toutes ou de quasiment toutes les dents, temporaires et/ou permanentes, chez un même individu. Le diagnostic est fondé sur l'histoire familiale, l'étude de l'arbre généalogique, et un examen clinique méticuleux. La prévalence de la maladie avoisine 1 pour 14000 personnes.

Elle se caractérise par une hypoplasie et/ou une hypominéralisation. La forme dite hypoplasique, est caractérisée par un émail dont l'épaisseur est réduite par rapport à la normale. Pour la forme hypominéralisée le volume d'email est normal mais sa consistance est altérée. Les différents types de défauts peuvent coexister sur une même dent, au sein d'une même cavité buccale ou varier d'un individu à l'autre au sein d'une même famille. Au niveau de leur phénotype, les patients atteints d'amélogenèse imparfaite peuvent également présenter des sensibilités dentaires et les dents peuvent être cassées avant ou après leur éruption.

L'Amélogénèse imparfaite peut être associée à d'autres symptômes dans le cadre de syndromes ou maladies rares (Tableau 1). Tous les modes de transmission sont possibles (autosomique dominant, récessif ou lié à l'X). Neuf gènes ont été identifiés comme impliqués dans cette pathologie dont *AMELX*, *ENAM*, *MMP20*, *KLK4*, *FAM20A*, *DLX3*. Ces gènes codent pour des protéines de structure de l'émail (*AMELX* : amélogénine, *ENAM* : énaméline) mais aussi des enzymes résorbant la matrice protéique (MMP20 : métalloprotéinase de la matrice extracellulaire ; KLK4 : kallikréine 4) en prélude à une minéralisation optimale, des facteurs de transcription (DLX3) et des protéines impliquées dans le métabolisme phosphocalcique. *(Crawford PJM and al, Amelogenesis imperfecta,Orphanet Journal of Rare Diseases 2007).*

| Syndrome | Caractéristiques | Gène impliqué | Type de molécule | Transmission | Locus |
|---|---|---|---|---|---|
| Amelogénèse imparfaite AIH1 | Hypoplasie, hypo minéralisation | AMELX | Protéine de l'émail | Liée à l'X | Xp22.3-p22.1 |
| Amelogénèse imparfaite AIH2 | Forme hypoplasique, dents lisses | ENAM | Protéine de l'émail | Autosomique récessive | 4q21 |
| Amelogénèse imparfaite type III, AI3 | hypo minéralisation | FAM83H | | Autosomique dominante | 8q24.3 |
| Amelogénèse imparfaite et hyperplasie gingivale III | Hyperplasie gingivale | FAM20A | Glycoprotéine sécrétée | Autosomique récessive | 17q24.2 |
| Amelogénèse imparfaite IIA1, AI2A1 | hypomaturation | KLK4 | Sérine protéase | Autosomique récessive | 19q13.3-q13.4 |
| Amelogénèse imparfaite IIA2, AI2A2 | hypomaturation | MMP20 | Métalloprotéase | Autosomique récessive | 11q22.2 |
| Amelogénèse imparfaite IIA3, AI2A3 | hypomaturation | WDR72 | Hélice béta | Autosomique récessive | 15q21.3 |
| Amelogénèse type IV, AI4 | Hypoplasie Hypomaturation Taurodontie | DLX3 | Facteur de transcription | Autosomique dominante | 17q21.3q22 |
| Gamétogénèse imparfaite et dystrophie des cônes et bâtonnets | | CNNM | Transporteur de métaux | Autosomique récessive | 2q11 |

***Tableau 1 : Principales caractéristiques des anomalies de l'email.***

## 4.3 Les Claudines et l'Amelogenèse

L'émail a une origine ectodermique. Les améloblastes qui sont responsables de l'amélogenèse, sont issues de la différenciation des cellules de l'épithélium dentaire interne de l'organe adamentin. Les jonctions intercellulaires des améloblastes vont évoluer au cours de ce phénomène physiologique, permettant la formation d'un émail sain. Lors de la phase sécrétoire des améloblastes, le complexe de jonctions apicales évolue, des jonctions serrées venant à se former. Ainsi, les cellules contrôlent étroitement les voies de transfert des protéines de l'émail en formation et leur maturation initiale. Sous ces jonctions intercellulaires apicales se situe un compartiment extracellulaire étanche (Fig14).

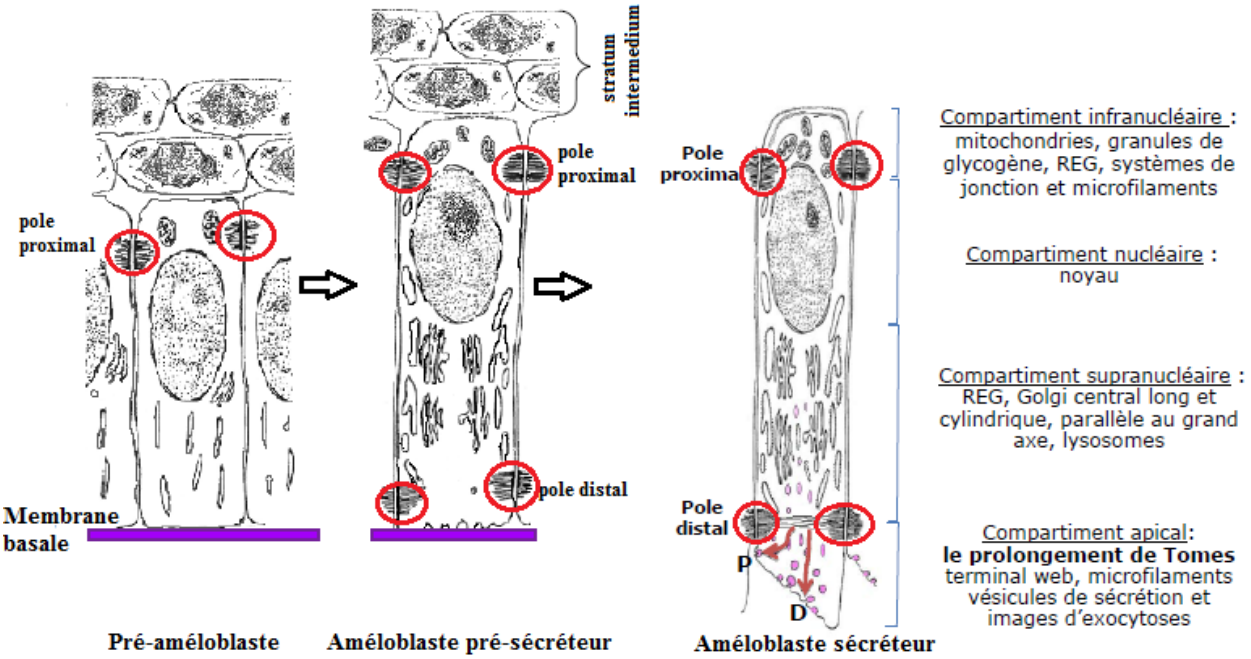



*Figure 14 : Evolution des complexes de jonctions durant la phase de sécrétion des améloblastes*

De même, lors de la phase de maturation, deux types d'améloblastes post-sécréteurs ont été identifiés et varient cycliquement (Fig.15) :

- Des améloblastes à extrémités plissées présentant un complexe de jonctions étanches dans leur tiers apical.
- Des améloblastes à extrémités lisses, liés entre eux par des desmosomes et quelques jonctions communicantes dans leur tiers basal.

Ces changements phénotypiques contrôlent le passage d'ions calcium via les améloblastes à extrémités plissées ou entre les améloblastes à extrémités lisses, assurant ainsi la croissance des prismes. Cette phase de modulation entre les phases plissées et lisses modifie le complexe de jonctions apicales devenant plus perméable et permettant à d'autres composés de passer dans l'émail ou d'être évacués.

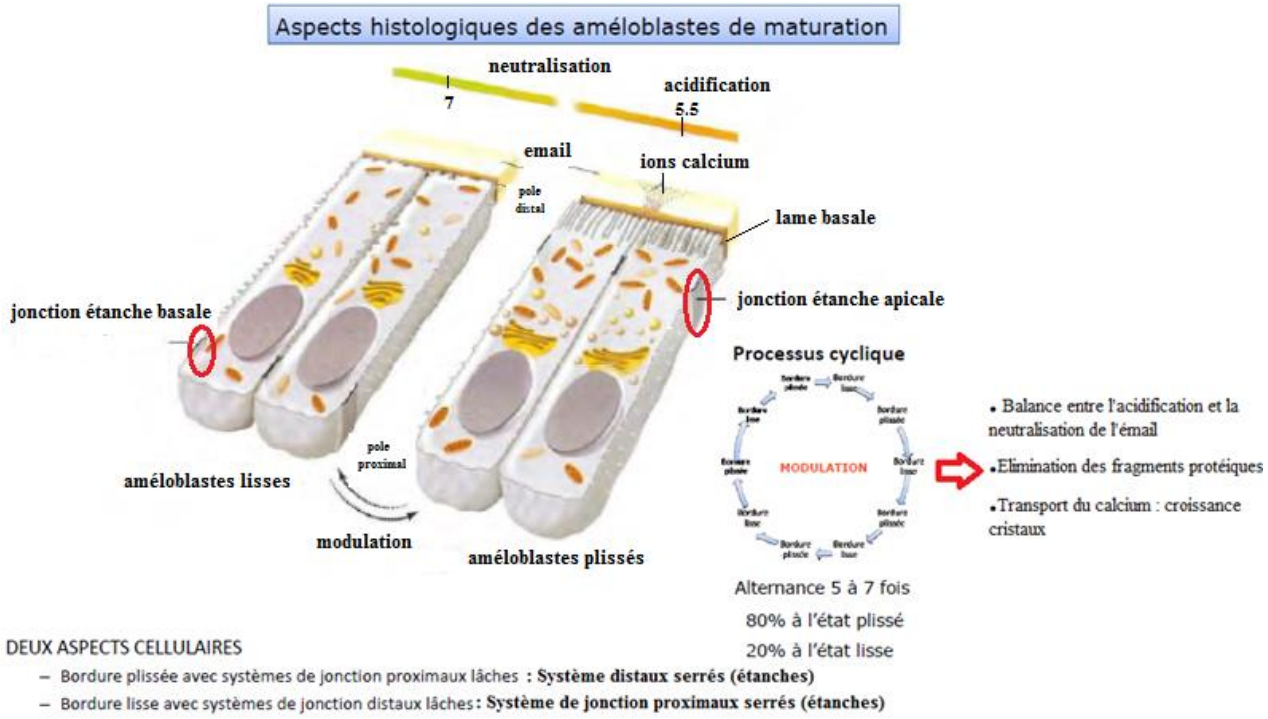



*Figure 15 : Evolution des complexes de jonctions durant la phase de maturation des améloblastes*

# 5 Dysplasie dentinaire

## 5.1 Dentinogenèse

La dentine est un tissu minéralisé dont la formation comprend deux étapes essentielles :

- La synthèse et la sécrétion par les odontoblastes de la matrice organique de la dentine (prédentine)
- Le dépôt minéral sur la prédentine

Elle résulte de l'interaction des cellules épithéliales et mésenchymateuses via les composants de la matrice. Lors de la présécrétion, les préodontoblastes prolifèrent sous l'induction des préaméloblastes. Ils se polarisent et forment une palissade de cellules, au niveau de la jonction épithélo-mésenchymateuse, puis vont se différencier en odontoblastes fonctionnels sous le contrôle de facteurs de transcription. Au stade de sécrétion, les odontoblastes forment un prolongement cellulaire dans la matrice de la dentine, alors que le corps cellulaire va rester en bordure de la dentine. Les odontoblastes vont alors sécréter des protéines de la matrice extracellulaire, telles que le collagène de type I, constituant principal de la matrice organique, et des protéines intervenant dans la minéralisation de cette matrice telles que les SIBLING en particulier la DPP (dentine phosphoprotéine) et la DSP (Sialoprotéine dentinaire). Toutes deux sont issues de l'expression d'un même gène, la DSPP (sialophosphoprotéine dentinaire).

La dentine est très similaire à l'os au niveau de ses contenus inorganiques et organiques.

En effet, tous deux sont composés d'une phase minérale à environ 70% (cristaux d'hydroxyapatite, associés à d'autres phosphates type magnésium, et à des oligo-éléments), d'une phase organique à environ 20% (collagène, glycoprotéines et protéoglycanes) et d'environ 10% d'eau. Toutefois, leur structure est très différente. Chez l'adulte, le tissu osseux est capable d'un remodelage constant, par un équilibre stationnaire entre apposition et résorption des phosphates de calcium sous forme d'hydroxyapatite, organisés sur leur charpente matricielle. Alors que la dentine est en sens unique d'apposition, sans remodelage en dehors de conditions pathologiques.

Dans le tissu osseux, la sécrétion de la matrice est assurée par les ostéoblastes qui, une fois enfermés dans la matrice minéralisée, se modifient structurellement pour former des cellules à l'état quiescentes, appelées ostéocytes. Ces cellules sont capables de survivre ainsi enfermées, et communiquent entre elles grâce à un important réseau de prolongements cytoplasmiques cellulaires, eux-mêmes enfermés dans des canicules. La dentine, elle, ne contient pas de cellules enfermées dans les lacunes mais des prolongements cellulaires. Elle possède une structure poreuse. Elle est parcourue par des canalicules dentinaires dans lesquelles circulent les prolongements de Tomes. Les prolongements de Tomes émanent de cellules situées en périphérie de la pulpe : les odontoblastes. Les odontoblastes restent en effet en surface de la matrice dentinaire et en assurent la sécrétion (Fig.16).

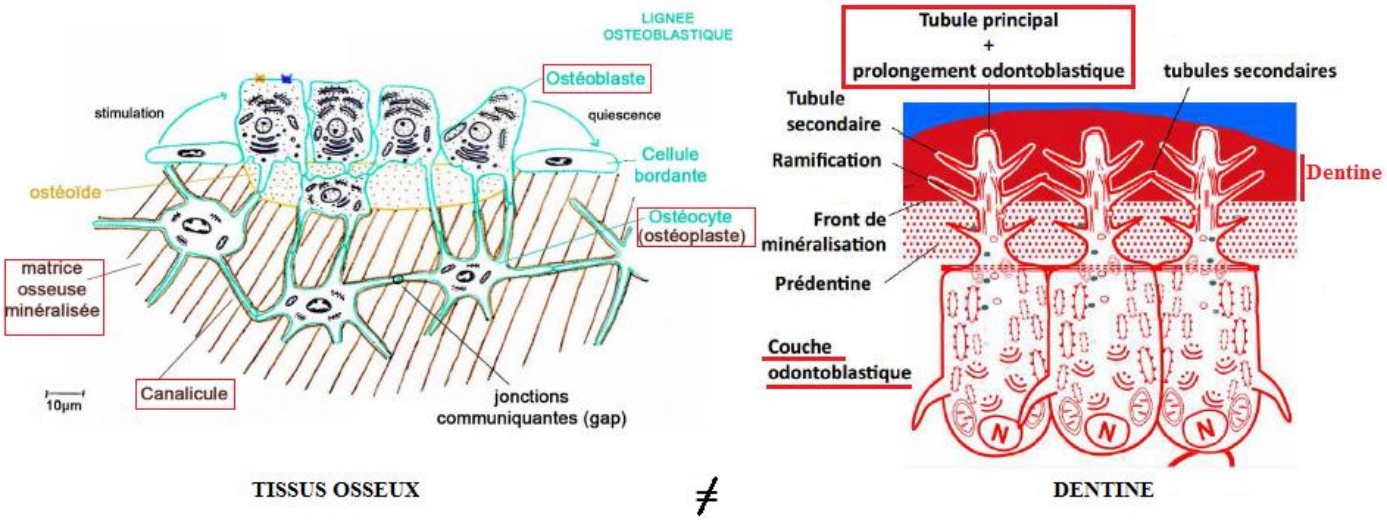



*Figure 16 : Comparaison de la structure du tissus osseux et dentine.*

On distingue deux maladies génétiques affectant la dentine : les dentinogèneses imparfaites (ou DI) et les dysplasies dentinaires (ou DD).

Les anomalies héréditaires de la dentine, dentinogenèse imparfaite (DI) et dysplasie de la dentine (DD), représentent un groupe d'affections génétiques, de transmission autosomique

dominante. L'incidence de la DI est comprise entre 1/8 000 et 1/6 000. La prévalence de la DD de type I est de 1/100 000, et celle de la DD de type II est inconnue.

Jusqu'alors, les atteintes dentinaires isolées étaient composées de quatre entités phénotypiques plus ou moins distinctes cliniquement. En effet, selon la classification de Shields (Shields E.D. et al., 1973) :

- Deux sous-types de dysplasies dentinaires ont été décrites : la DD de type I et la DD de type II).
- Pour la dentinogenèse imparfaite : on distingue une forme syndromique, associée à l'ostéogenèse imparfaite (DI type I), et deux formes isolées (DI types II et III).

Cette classification devrait être modifiée, au regard des études moléculaires montrant la distinction de deux formes : la dentinogenèse imparfaite regroupant les DI-II, DI-III et DD-II et la dysplasie dentinaire correspondant à la DD-I.

Ainsi, la dentinogenèse imparfaite de type II (Zhang et al., 2001) et III (Dong et al., 2005) et la DD de type II (Rajpar et al., 2002), seraient causées par des mutations au niveau du gène *DSPP* (4q21.3) codant pour la sialosphophoprotéine dentinaire, un précurseur de la sialoprotéine et de la prosphoprotéine dentinaires.
La dysplasie dentinaire de type I resterait une entité à part (De La Dure-Molla et al., 2015).

## 5.2 Phénotype des dysplasies dentinaires

La dysplasie de la dentine (DD) est caractérisée par une structure dentinaire et un développement de la racine anormaux.

La dysplasie de la dentine de type I affecte la dentine radiculaire ; les dentitions primaires et permanentes sont touchées.

Cliniquement les dents ont une apparence normale. L'aspect radiologique est très caractéristique (Fig.17) :



***Figure 17: radiographie panoramique d'un patient présentant une DDI (d'après Depprich et al., 2007)***

La DDI caractérisée par des racines anormalement courtes, voire absentes dans les cas sévères. Le plus souvent, elles mesurent moins de la moitié de leur hauteur normale, sont coniques et pointues à l'apex (certains parlent de constriction apicale) donnant un aspect globulaire. Les dents pluriradiculées sont qualifiées de taurodonte et plus spécialement d'hyperdonte. La pulpe présente des oblitérations. Certaines dents présentent une ligne radio claire en forme de croissant ou de demi-lune parallèle à la jonction amélo-cémentaire en guise de réminiscence pulpaire. Cette ligne peut même être double.

La dysplasie de la dentine de type II est cliniquement similaire à une dentinogenèse imparfaite type II de Shield, et n'affecte que la denture temporaire. Les dents permanentes ont une teinte, une taille et une forme normale (Fig.18). Mais, radiologiquement, ces dents présentent une pulpe dite en chardon (« thistle-tube ») c'est-à-dire une chambre pulpaire large et des canaux fins. On retrouve fréquemment des calcifications intra camérales. Les racines dentaires sont normales.




*Figure 18 : Principales différences entre DDI et DDII*

# 6 Objectifs

De par son origine embryologique, la formation de la dent en particulier de l'émail et de la dentine, fait intervenir des acteurs spécifiques à chaque tissu. L'objectif général de mon travail a consisté à identifier des nouveaux gènes qui seraient impliqués dans des maladies génétiques affectant l'émail et la dentine, et à étudier les mécanismes sous-jacents. J'ai travaillé sur deux pathologies : l'hypomagnésémie hypercalciurie et néphrocalcinose familiale associée à une amélogenèse imparfaite et la dysplasie dentinaire de type 1.

**Le premier axe de recherche** de ce projet a consisté à étudier les conséquences de la mutation du gène *Claudin-16* (*CLDN16*) codant pour une protéine de jonctions serrées sur la formation de l'émail. Des mutations de *Claudin-16* sont à l'origine d'une maladie récessive autosomique responsable de l'hypomagnésémie hypercalciurie et néphrocalcinose familiale ou HHNF, une pathologie rénale sévère. La protéine CLDN16 (initialement appelée paracelline-1) est exprimée principalement dans la branche ascendante de l'anse de Henlé dans le rein où elle forme, en association avec d'autres protéines, (dont la CLDN19) des hétéromultimères dans les jonctions serrées pour former des pores sélectifs de cations permettant la réabsorption paracellulaire du calcium et du magnésium (Hou et al., 2009).

En 2014, le diagnostic d'une Amélogenèse Imparfaite chez un jeune patient de 16 ans atteint HHNF due à une mutation de *CLDN16,* à qui a été diagnostiqué a suscité l'étude des conséquences de la déficience de la protéine CLDN16 sur le développement dentaire.

Afin de déterminer si l'FHHNC due à des mutations de *CLDN16* est associée à l'AI, nous avons caractérisé le phénotype oral de cinq patients, non apparentés, atteints de FHHNC lié à des mutations de *CLDN16*, et étudier le phénotype dentaire de souris invalidées pour le gène *Claudin-16* (*Cldn16*$^{-/-}$), le modèle murin de la pathologie (Will et al., 2010a), en collaboration avec Dominik Muller (Université de la Charité de Berlin),.

L'ensemble de mes travaux, présent dans le mémoire, fait partie de deux articles publiés, dans *Journal of Bone and Mineral Research* et *Frontiers in physiology*, dont je suis co-auteur.

Dans un second temps, j'ai étudié un second modèle invalidé pour un autre gène participant à la formation des jonctions serrées, *CLDN3* (en collaboration avec Dominik Muller). Le rôle de Claudin-3 dans la perméabilité transcellulaire étant un rôle de barrière et non de canal, nous avons voulu regarder l'implication de ce deuxième type de protéine de jonctions serrées dans l'amélogénèse.

L'objectif de mon travail consiste à étudier ces deux modèles afin d'identifier et de mieux comprendre le rôle des claudines dans l'amelogénèse imparfaite (fig. 9).

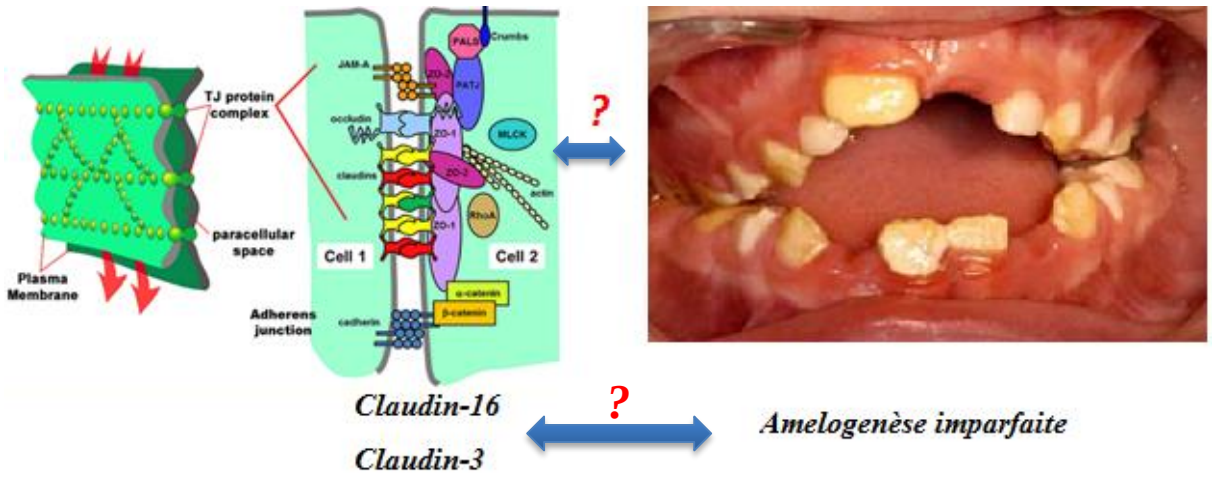



*Figure 19 : Schéma récapitulatif projet Claudines*
*(Mitchell and Koval, 2010. Cliché du Pr J. L. Sixou, UFR d'Odontologie, Université Rennes 1)*

Ce travail vise donc à étudier :

- Le phénotype oral de souris invalidées pour les gènes *Claudin-16* et *3*
- L'expression des Claudines-16 et 3 dans les améloblastes chez la souris pour supporter le lien entre les défauts de l'émail et l'invalidation de ces gènes.
- L'implication de la perte de fonction de ces Claudines dans l'altération de la structure et de la fonction des jonctions serrées dans les améloblastes.
- Les mécanismes impliqués dans les défauts de minéralisation de l'email liés à la perte de fonction des Claudines.

**Le second axe de mon projet** a porté sur l'identification d'un nouveau impliqué dans une maladie génétique affectant la dentine : le gène Trip 10 (Thyroid hormone receptor interactor 10) codant pour la protéine CIP4 (CDC42-interacting protein 4), une protéine à domaine BAR qui serait notamment impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine.

Ce projet résulte d'une collaboration avec l'institut *Imagine* à Cochin, et le département de génétique médicale (INH-Rabat), qui a recruté une famille présentant un cas de dysplasie dentinaire de type I avec phénotype clairement établi. Jusqu'ici, pour la dysplasie dentinaire de type II, des mutations sur les gènes DSPP et SMOC2 sont reconnues comme étant impliquées dans cette pathologie. En revanche, pour la dysplasie dentinaire de type I, aucun gène n'a encore clairement été identifié et mis en cause à ce jour. Sur cette famille marocaine, et grâce aux techniques de séquençage à haut débit, il a été possible de mettre en évidence une mutation du

gène Trip 10, commune entre les patients et localisée sur une région du chromosome 19, et qui pourrait donc être impliquée dans cette forme autosomique récessive de la dysplasie dentinaire de type 1.

Les objectifs de cet axe ont été de :

- Caractériser les défauts de minéralisation de la dentine sur des dents extraites de patients.
- Etudier l'expression de ce gène dans la dent de souris sauvage pour supporter son implication dans la formation de la dentine.
- Etudier l'effet de la délétion de l'acide aminé Arg139 *in vitro* sur la localisation membranaire de la protéine CIP4.

# CHAPITRE 2 : LA DEFICIENCE EN PROTEINES DE JONCTIONS SERREES DES AMELOBLASTES, LES CLAUDINES, CONDUIT A UNE AMELOGENESE IMPARFAITE

## 1 Introduction

### 1.1 La famille des protéines Claudines

Identifiées pour la première fois en 1998, les Claudines sont des protéines transmembranaires identifiées comme le composant majeur des jonctions serrées (zonula occludens) des cellules épithéliales et endothéliales (Fig.20).

La jonction serrée apparaît comme une apposition entre les membranes latérales de cellules adjacentes, essentielle dans la perméabilité paracellulaire. Elle agit comme une barrière sélective de perméabilité entre les compartiments aqueux et comme une barrière à l'intérieur de la membrane cellulaire, en restreignant mécaniquement la diffusion des protéines et des lipides à l'intérieur de la bicouche lipidique.

Elle maintient par ailleurs une polarisation cellulaire, en délimitant le domaine apical du domaine basolatéral des cellules. Cette séparation limiterait la diffusion latérale de protéines membranaires particulières. Ainsi ces jonctions maintiennent la distribution des canaux sodiques dans le domaine apical et celle des pompes à sodium et potassium dépendantes de l'ATP dans le domaine basolatéral.

Les jonctions serrées sont constituées d'un complexe de protéines transmembranaires, des protéines cytoplasmiques, des protéines de signalisation, et d'adaptateurs qui la relient au cytosquelette d'actine. Il existe trois types de protéines transmembranaires qui participent à ce type de jonctions : l'occludine, les Claudines, et les molécules d'adhérence jonctionnelle (JAM, Junctional Adhesion Molecules). Ces protéines transmembranaires sont associées à des protéines cytosoliques pour former les jonctions serrées. La principale protéine est ZO-1. Il s'agit d'une protéine de la famille des guanylate cyclases associées à la membrane (MAGUK, Membrane-Associated Guanylate Kinase).

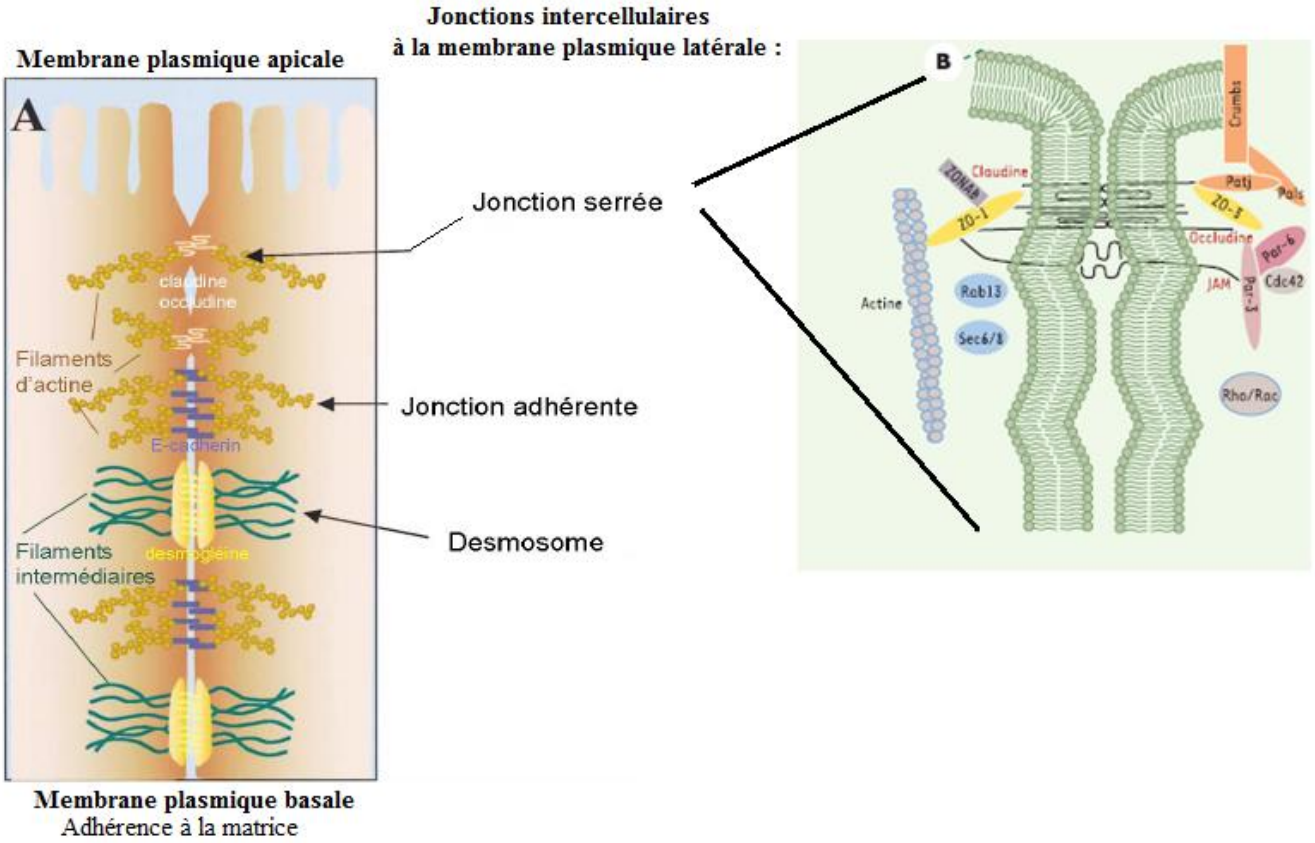



*Figure 20 : Structure d'une jonction serrée*

Claudine vient du latin claudere (fermer, clore). Les Claudines, sont impliquées dans la perméabilité paracellulaire et le maintien des propriétés du milieu au sein de compartiments donnés, comme par exemple, le pH.

Il existe 27 Claudines chez l'humain et 20 connues chez la souris. Elles ont une expression différente selon le type de tissu où elles sont retrouvées, ce qui pourrait expliquer la différence de perméabilité de ces tissus.

Ces protéines vont interagir avec d'autres molécules et peuvent s'associer entre elles, formant ainsi des jonctions inter-cellulaires et des canaux ioniques impliqués dans la perméabilité membranaire. Ces différents types d'interactions permettent de créer des canaux ioniques sélectifs. En effet, l'étanchéité de la couche d'ameloblastes dépend de la composition en jonctions serrées, qui est elle-même dépendante de sa composition en protéines Claudines. Par conséquent, une combinaison de différentes Claudines permet soit un passage d'ions paracellulaires, soit limite ce passage (Denker et Sabath, 2011 ; Bronckers, 2017).

Quelques Claudines sont qualifiées sans équivoque de protéines poreuses, telles que Claudin-2, -10b et -15 (pores cationiques) et Claudin-10a et -17 (pores anioniques). D'autres ont été signalées pour former des pores uniquement lorsqu'elles interagissent spécifiquement avec

une autre Claudine (Gunzel et Yu, 2013). Tel est le cas de la Claudine-16 et de la Claudine-19, qui forment un complexe de jonction serrée sélectif aux cations dans l'épaisseur de la branche ascendante de l'anse de Henle (Hou et al., 2008).

## 1.2 Implication du gène CLDN16 dans l'hypomagnesémie, hypercalciurie (HC) et néphrocalcinose ou FHHNC

La protéine CLDN16 (initialement appelée paracelline-1) est exprimée principalement dans la branche ascendante de l'anse de Henlé dans le rein, où, elles forment en association avec la protéine Claudine-19 (CLDN19), des pores sélectifs de cations permettant la réabsorption du $Ca^{2+}$ et du $Mg^{2+}$ (Fig.21).

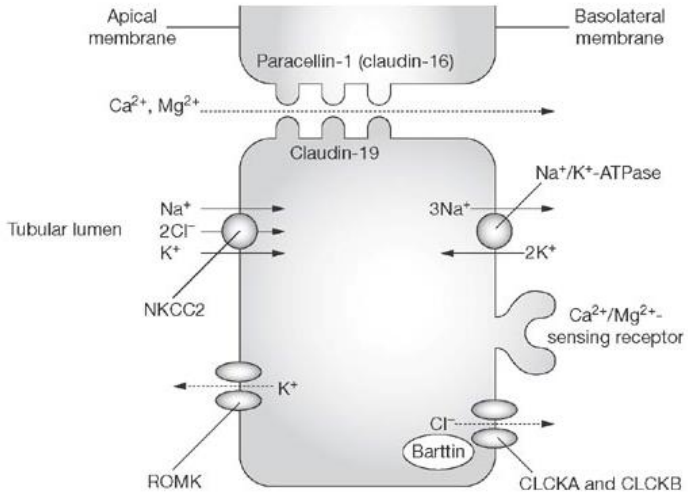



***Figure 21 : Transport paracellulaire du calcium et du magnésium dans la branche ascendante de l'anse de Henlé dans le rein médié par CLDN16 et CLDN19***
*(d'après Naderi and Reilly, 2008)*

Des mutations de *CLDN16* ou *CLDN19* sont à l'origine de fuites rénales de Ca2+ et de Mg2+ qui détériorent la fonction rénale, conduisant à une hypomagnésémie familiale avec hypercalciurie (HC) et néphrocalcinose (NC) (FHHNC ; OMIM 248250 et 248190 OMIM, respectivement) et une insuffisance rénale progressive.

L'intérêt pour le rôle des Claudines au cours du développement dentaire a débuté récemment lors de l'examen dentaire d'un patient atteint d'hypomagnésémie, hypercalciurie et néphrocalcinose familiale (FHHNC), maladie autosomique récessive liée à une mutation du gène *CLDN16*. Grâce à une collaboration avec Dominik Muller (Université de la Charité, Berlin, Allemagne), le laboratoire a pu travailler sur le modèle murin de la pathologie FHHNC et étudier les mécanismes conduisant aux défauts de formation de l'émail à l'origine du phénotype dentaire.

## 1.3 La Claudine-3 et le développement dentaire

Dans un second temps, nous nous sommes posé plus généralement la question du rôle des Claudines dans l'amélogenèse, en particulier en fonction de leurs propriétés de pore ou de barrière au sein de la jonction serrée. Nous avons donc étendu notre collaboration avec Dominik Muller à un deuxième modèle murin invalidé pour un autre gène de la famille des Claudines, le gène *Claudin-3*.

L'expression des Claudines serait à la fois régulée en fonction des besoins de perméabilité de l'organisme en certains ions et au cours du développement.

*Claudine-3* est exprimée dans différents sites au cours du développement *(*Krause and al, 2015 ; Watters and al, 2015) :

- Dans l'intestin lors de son développement.
- Dans les poumons.
- Dans l'estomac par les cellules sécrétant le mucus et les cellules du col, dans les villosités intestinales et le colon.
- Dans les cellules souches neurales
- Dans le rein
- Dans les ostéoblastes

L'expression du gène *Cldn3* a été étudiée chez la souris au cours du développement dentaire uniquement par hybridation in situ. *Cldn3* a été identifiée chez la souris comme exprimée lors de l'épaississement de l'épithélium buccal (par une fine bande de cellules faisant face à la cavité orale) avant le stade de cupule ainsi qu'au stade de cupule lors du développement de la 1ère molaire. *(Ohazama and a1, 2007) (*Fig.22*).*

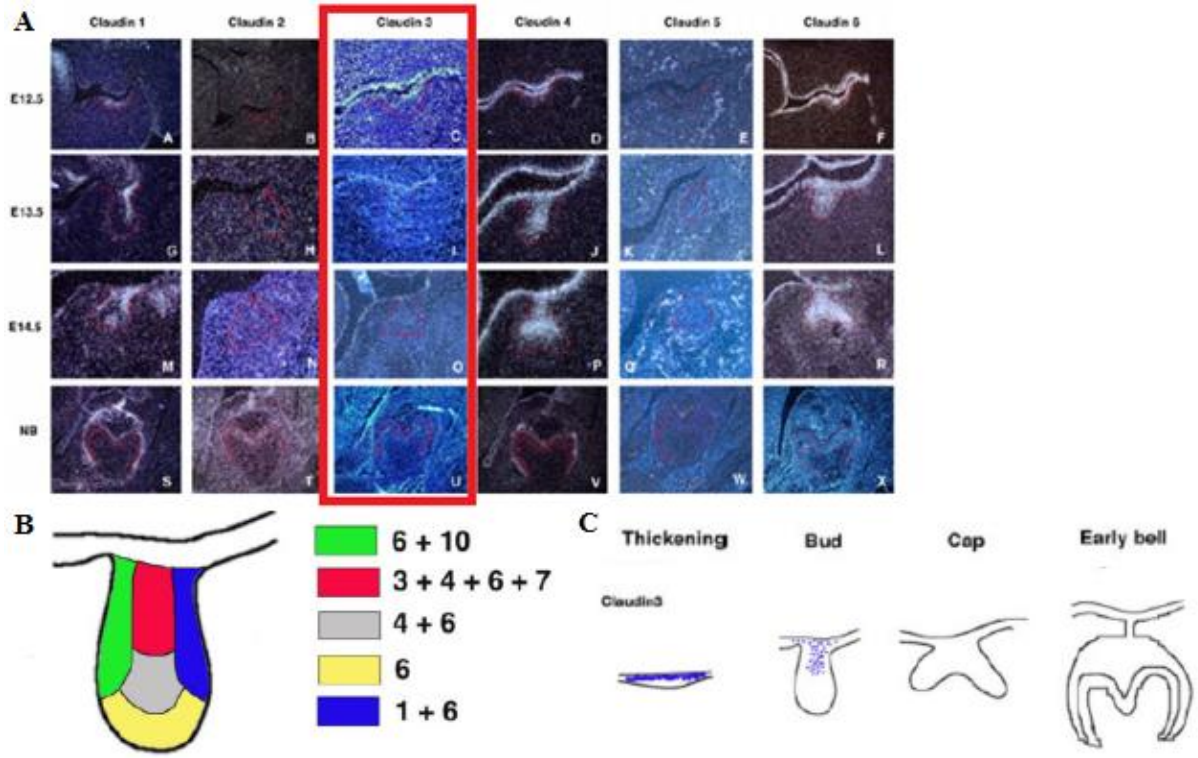



*Figure 22 : Expression des Claudines*
*A) Hybridation in situ de l'expression des Claudines dans la 1ere molaire lors du développement dentaire, chez la souris- coupes frontales- épithélium dentaire en pointillées rouges.*
*B) Schéma de répartition de l'expression des Claudines dans la dent de souris au stade de cupule (E13)-en rouge : Cldn3. C) Représentation schématique de l'expression des Claudines au cours des différents stades du développement dentaire, épithélium en bleu : Cldn3 est exprimée au stade d'épaississement de l'épithélium et de cupule (d'après Ohazama and Al, Janurary 2007, Developmental Dynamics).*

# 2 Matériel et méthodes

## 2.1 Le modèle murin

Pour notre étude, j'utilise deux modèles de souris transgéniques fournies par l'équipe de Dominik Muller (Université de la Charité, Berlin, Allemagne).

### 2.1.1 Modèle Cldn16−/− de la pathologie FHHNC

Les souris mutantes *Cldn16* $^{-/-}$ ont été obtenues par délétion dirigée du gène murin *Claudin-16*, grâce à des sites lox P entourant de part et d'autre l'exon 2 présent au sein du gène *claudin-16* (Fig.23).

Ces souris présentent une reproduction et une viabilité normale, ainsi qu'une croissance comparable aux individus sauvages ou hétérozygotes.

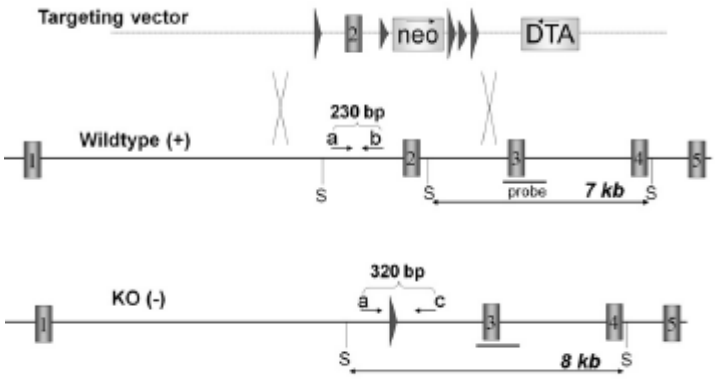



*Figure 23 : Délétion dirigée du gène murin Claudin-16 , au sein de l'exon 2, en utilisant une approche Cre/lox P. (Will et al., 2010b)*

### 2.1.2 Modèle Cldn3 -/- (non associé à une pathologie)

Les souris mutantes *Cldn3* $^{-/-}$ ont été obtenues par délétion dirigée de *Claudin-3*, grâce à des sites lox P entourant de part et d'autre l'unique exon présent au sein du gène *claudin-3*, par recombinaison homologue dans des cellules ES (approche Cre/lox P : Fig.24).

Chez ces souris invalidées pour le gène *Claudin-3* la reproduction, la viabilité et la croissance n'a pas été modifiée par rapport aux individus sauvages ou hétérozygotes.

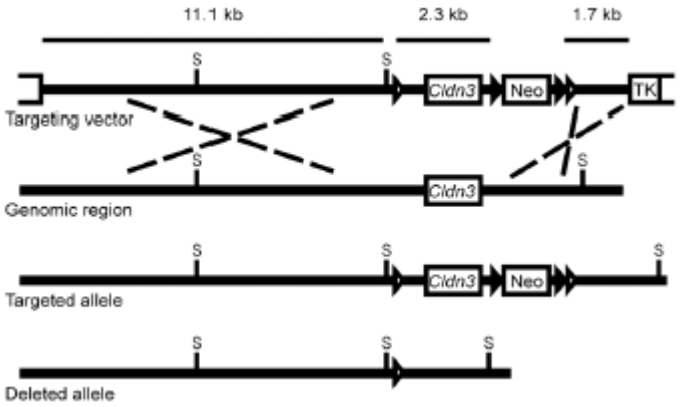



*Figure 24 : Délétion dirigée de l'unique exon du gène murin Claudin-3 en utilisant une approche Cre/lox P (Kooij et al., 2014)*

### 2.1.3 Entretien de la lignée de souris transgénique Ko Cldn16-/- et Cldn3-/- par croisement successifs des souris

- Croisements de souris de souche C57BL/6 sauvages $^{+/+}$ (Wildtype, WT) et invalidées soit pour le gène *Claudin-16* (Knockout, KO) soit pour le gène *Claudin-3* afin d'obtenir des générations de souris hétérozygotes $^{+/-}$.

- Croisements de souris hétérozygotes soit *Cldn16*$^{+/-}$ soit *Cldn3*$^{+/-}$, afin d'obtenir selon une loi mendélienne environ 25% de souris KO, 25% de souris WT, et 50 % d'hétérozygotes pour

une même portée. Les souris étudiées ont alors exactement le même âge et sont donc au même stade de développement dentaire.

### 2.1.4 Génotypage des souris obtenues après croisement des souris Cldn16$^{+/-}$ ou Cldn3$^{+/-}$

L'ADN génomique est extrait à partir 30 mg d'un échantillon de queue prélevé sur les souris en utilisant le kit « *EZ-10 Spin genomics DNA minipreps animal Kit* » (Qiagen) : selon les instructions du fabricant.

L'ADN est ensuite quantifié par dosage sur 1µl d'échantillon purifié au NanoDrop (ND200 ThermoScientific)

Je procède ensuite à l'amplification par une PCR (Polymérase Chain Reaction) multiplexe d'une région spécifique des gènes *Cldn16* ou *Cldn3* murins (Tableau 2) :

On utilise en effet, dans la même réaction de PCR, deux couples d'amorces afin d'amplifier simultanément deux cibles d'ADN :

- Pour un individu sauvage : il y a amplification par le couple A-B uniquement si les deux allèles sont sauvages sur le gène cible.
- Pour un individu KO : il y a amplification par le couple A-C uniquement, si les deux allèles sont mutés sur le gène cible.
- Pour un individu hétérozygote : il y a amplification simultanée par les couples AB et AC, car il y a présence d'un allèle muté et d'un allèle sauvage au niveau du gène cible.

| N° Amorces | Séquence des amorces |
|---|---|
| *Cldn16* - A | 5' gtgataatatccacttagcgc 3' |
| *Cldn16* - B | 5' gctaactccagattttcaagg 3' |
| *Cldn16* - C | 5'gagggcattaacaatggattg 3' |
| | |
| *Cldn3 N° - A* | 5'acatgagggtgctggacaag 3' |
| *Cldn3 N° - B* | 5' ctgtttgtcgccgtaggtg 3' |
| *Cldn3 N° - C* | 5'tggcagtcctttaggtgagg 3' |

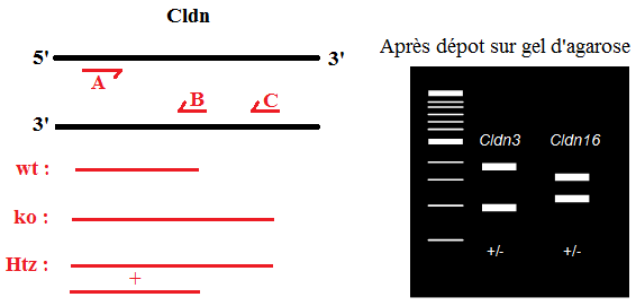



*Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier l'ADNg.*

L'ADNg de chaque extraction (50ng) est amplifié par PCR dans un mélange composé de 2.5µl de tampon (10X), 1µl de MgCl2, 2.5µl de dNTP (2.5mM de chaque), en présence des amorces (0.75µl d'amorces 1 et 2 et 0.25µl d'amorce N°3) et de 0,125µl de Takara DNA Polymerase et d'eau stérile (qsp25µl). L'amplification se fait dans un thermocycleur en 35 cycles précédés d'une phase de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes et suivie d'une phase

d'élongation à 72°C pendant 10 minutes. Chaque cycle est composé de 10 secondes de dénaturation, 30 secondes d'hybridation à 60°C, et 30 secondes d'élongation à 72°C.

Résultat attendu après dépôt sur gel d'agarose 1.5% et migration éléctrophorétique 30 minutes à 75 volts en tampon TBE1X (Tableau 3)

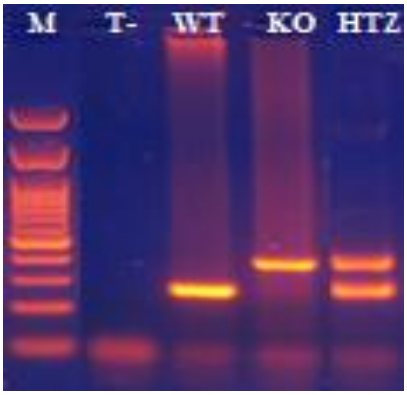
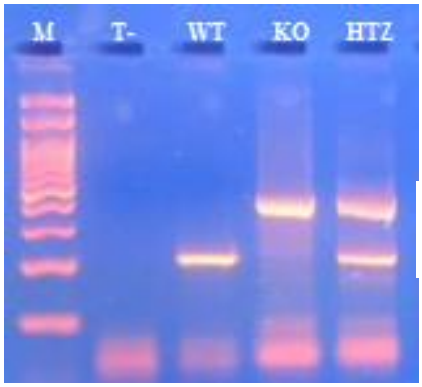
| Pour *Cldn16*: | Pour *Cldn3*: |
|---|---|
| J'utilise un marqueur de taille 100pb pour identifier les bandes (M).<br>Le second puit est le témoin négatif (T-) qui permet de vérifier l'absence de contamination lors de la manipulation (La PCR est réalisée sans ADN d'intérêt)<br>La migration sur gel d'agarose permet d'identifier :<br>- soit une bande à 230 pb correspondant à une souris WT<br>- soit une bande à 320 pb correspondant à une souris KO pour le gène *Cldn16*.<br>- soit les 2 bandes de 320pb et 230pb pour une souris Htz. | J'utilise un marqueur de taille 100pb pour identifier les bandes (M).<br>Le second puit est le témoin négatif (T-) qui permet de vérifier l'absence de contamination lors de la manipulation (La PCR est réalisée sans ADN d'intérêt)<br>La migration sur gel d'agarose permet d'identifier (Fig.29) :<br>- soit une bande à 196 pb correspondant à une souris WT<br>- soit une bande à 373 pb correspondant à une souris KO pour le gène *Cldn3*.<br>- soit les 2 bandes de 373pb et 196pb pour une souris Htz. |
|  320pb<br>230pb |  373pb<br>196pb |

*Tableau 3 : Résultat du génotypage claudine attendu après dépôt sur gel d'agarose.*

## 2.2 Extraction des ARN et PCR après transcription inverse (RT-PCR)

Les tissus de souris âgées de trois mois, sont disséqués et les ARN totaux extraits en utilisant le Kit « RNeasy Plus mini kit micro kit » (Qiagen).

Les tissus mous : peau, foie, poumon, cœur, cerveau, rein ont été broyés directement après prélèvement dans le tampon préconisé par le Kit.

Les tissus durs : os, germe dentaire sont broyés et réduits à l'état de poudre à l'aide d'un pilon et de l'azote liquide, puis directement transférés dans le tampon préconisé par le Kit.

L'ARN total est ensuite quantifié par dosage sur 1µl d'échantillon purifié au NanoDrop (ND200 ThermoScientific).

La synthèse d'un ADN complémentaire à partir de la matrice d'ARN totaux se fait par une enzyme ADN polymerase ARN-dépendante, en trois étapes :

- 1 - Elimination des structures secondaires de l'ARN par chauffage à 65°C.
- 2 - Synthèse du cDNA
- 3 - Inactivation de l'enzyme

Les ADNc sont fabriqués à l'aide du Kit « cDNA kit Verso » (ThermoFisher, Waltham, MA) à partir de 250ng d'ARN préalablement dénaturé par incubation 5 minutes à 65°C et maintenue à +4°C durant 1 minutes, dans un mélange composé de 4µl de tampon (5X), 2µl de dNTP, 1 µl d'amorce ARN (queue polyT qui se fixe sur la queue polyA à l'extrémité 3' des ARN messagers uniquement), 12µl de « RT Enhancer », d'eau stérile (qsp 20µl final) et 1µl d'enzyme Verso. La reverse transcription se déroule dans un thermocycleur Verity à 42°C pendant 30minutes suivi d'une inactivation de l'enzyme 2 minutes à 95 °C.

Pour une analyse semi-quantitative, l'ADNc de chaque échantillon (10ng) est amplifié par PCR dans un mélange composé de 5µl de tampon (5X), 1µl de $MgCl_2$, 0.5µl de dNTP (10mM chacun), en présence des amorces sens et antisens (1µl de chaque à 10pmol/µl) et de 0,125µl de Go Tag®Hot Start polymerase (Promega, Fitchburg, WI) et d'eau stérile (qsp 25µl). L'amplification s'est déroulée dans un thermocycleur Verity.

Pour se faire des amorces ont été définies afin d'amplifier les régions spécifiques des gènes recherchés sont présentés dans le tableau 4.

| Nom du gène | N° Sequence reference NCBI | Région amplifiéé | Primer Sens | Primer Antisens | Taille de l'amplicon |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Cldn16*** | NM_053241.5 | 646ème pb à la 938ème pb | 5'GGTCTGGACTGTGTGAAGTT3' | 5'GGCATAAGGGTAGTTCCTCT3' | 312pb |
| ***Cldn3*** | NM_009902.4 | 313ème pb à la 436ème pb | 5'ATGTGGCGCGTTTCG3' | 5'GCGAGTCGTACATTTTGC3' | 124pb |
| ***Gapdh*** | NM_001289726.1 | 803ème pb à la 932ème pb | 5'TGTGTCCGTCGTGGATCTGA3' | 5'TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG3' | 150pb |

*Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour amplifier l'ADNc.*

Après optimisation des conditions d'amplification pour chaque gène, les produits de PCR ainsi obtenus, à partir d'une même quantité de cDNA initiale, sont déposés sur gel agarose/TBE à 1,5%.

Le gel est ensuite visualisé sous UV et l'intensité de fluorescence des bandes obtenues permet de donner une estimation relative du niveau d'expression des gènes dans chacun de nos tissus, (en effet, contrairement à la PCRq, la détection et l'appréciation de l'intensité de fluorescence des bandes se fait à l'œil nu), comparée à celle de la gapdh utilisée comme gène de référence (puisque gène dont l'expression est présumée ubiquitaire, stable entre les différents tissus, quelles que soit les conditions expérimentales) afin de corriger le biais inhérent aux différences de charge de l'échantillon.

## 2.3 Histochimie

### 2.3.1 Prélèvement des hémi-mandibule et inclusion dans l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound)

Les 2 hémi-mandibules inférieures de souris sont prélevées puis séparées (Fig.25.1). Elles sont ensuite incluses en OCT, milieu d'enrobage du tissus (Fig.25.2) qui permet de préserver l'ultrastructure cellulaire (histologie) aussi bien que les acides nucléiques. Il est important de réaliser cette inclusion dans une orientation précise afin de pouvoir par la suite se repérer sur l'échantillon. L'échantillon congelé et conservé à -80°C, pour ensuite être coupé à -20°C à l'aide d'un cryostat pour obtenir des coupes frontales 7 µm d'épaisseur. Notre zone d'intérêt se situe sur l'incisive à partir de la fin de la 1ère molaire jusqu'à environ 50 coupes après celle-ci, c'est-à-dire dans la partie sécrétrice des améloblastes (fig. 25.3). Ces coupes sont conservées en vue de faire de l'immunohistochime, de la zymographie in-situ, ainsi que de l'hybridation in-situ.

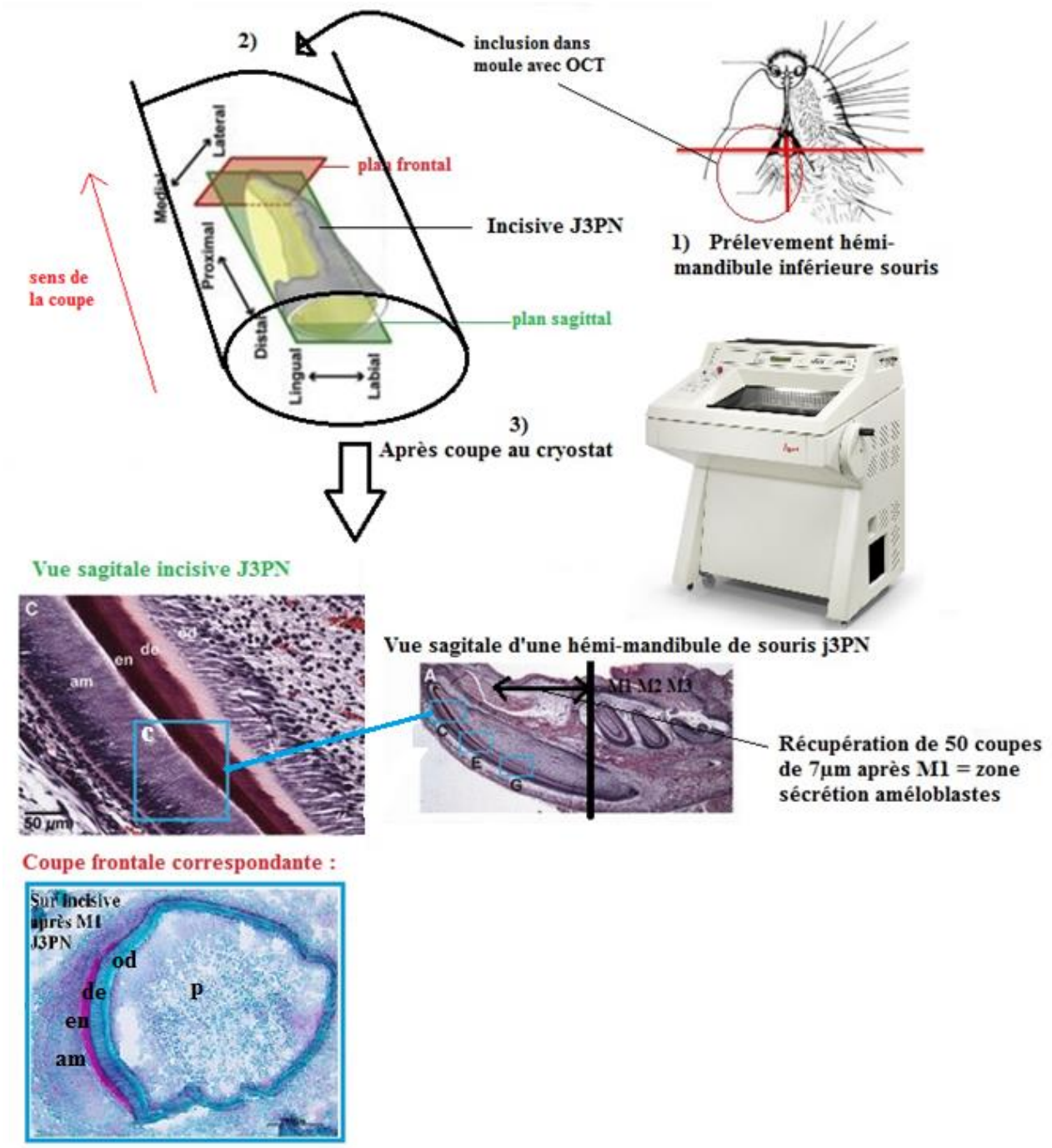



*Figure 25 : Représentation schématique du prélèvement, de l'inclusion en OCT et de la zone d'intérêt retenue pour les coupes cryostats de mandibule de souris trois jours après la naissance*
*M1 = première molaire ; M2 = deuxième molaire ; M3 = troisième molaire ; am = ameloblaste ; en = email ; de = dentine ; od =odontoblaste.*

### 2.3.2 L'immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique de détection de protéines dans les cellules d'une coupe d'un tissu utilisant la fluorescence. Les lames une fois décongelées et séchées quelques minutes à température ambiante sont fixées 10 min au paraformaldehyde (PFA) à 4%.

Après rinçage dans du PBS, on bloque ensuite la fixation non spécifique des anticorps aux tissus par incubation à température ambiante pendant 90 min :

Pour Claudin-16 et Enamelin : dans 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) dans du tampon phosphate salin (PBS).

Pour amelogenin : dans 10% de sérum de chèvre + 1 % de BSA dans du PBS.

Incubation avec l'anticorps primaire :

- Pour Claudin-16 : Ac polyclonal de Lapin Claudin-16 à 1/200 une nuit dans une chambre humide à 4 °C. Après rinçage au PBS les lames sont ensuite incubées pendant 90 min avec l'anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin ALEXA Fluor 488 (invitrogen) : au 1/200 PBS+5%BSA : incubation 1h en chambre humide dans l'obscurité.
- Pour Amelogenin : incubation avec l'anticorps Amelogenin FL-191 polyclonal IgG de lapin (réf. : SC-32892) au 1/200$^{ème}$ dans 10% sérum de chèvre + 1% de BSA une nuit dans une chambre humide à 4 °C. Après rinçage au PBS les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire Rhodamine Red X-goat anti rabbit (réf. : R-6394) durant 60 minutes à température ambiante.
- Pour Anamelin : incubation avec l'anticorps Enamelin C-18 polyclonal IgG de chèvre (réf. : SC-33107) au 1/25$^{ème}$ dans 1%de BSA une nuit dans une chambre humide à 4 ° C. Après rinçage au PBS les lames sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire Donkey anti-goat conjugé au DyLight 488 durant 60 minutes à température ambiante.

Pour Claudin-3, la mise au point de la technique s'est avérée plus compliquée. Après rinçage dans du PBS, il est apparu qu'une étape d'incubation des tissus à -20°C avec du méthanol suivie d'un traitement au Retrievagen (BD Retrievagen A Pharmigen) afin d'améliorer l'accessibilité des épitopes antigéniques était nécessaire. Pour se faire, les lames sont plongées dans cette solution commerciale durant 10 minutes à 90°C puis ramenées à température ambiante durant 20 minutes. Après un rinçage en bain d'eau distillée durant 5 minutes, on bloque ensuite la fixation non spécifique des anticorps aux tissus par incubation à température ambiante pendant 60 min dans 10% de sérum de chèvre et 1 % de BSA dans du PBS. Incubation avec l'anticorps primaire polyclonal de Lapin Claudin-3 à 1/100 (réf. :34-1700 thermofisher) une nuit dans une chambre humide à 4 °C. Après rinçage au PBS les lames sont ensuite incubées pendant 60 min avec l'anticorps secondaire de chèvre anti lapin Rhodamine Red (lifetechnologies) au 1/500 PBS+1% BSA : incubation 1h en chambre humide dans l'obscurité.

Pour exclure une liaison non spécifique, les contrôles sont effectués en omettant l'anticorps primaire. Enfin, après rinçage au le PBS 1X et coloration au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pour marquer les noyaux par une incubation 10min à température ambiante, les coupes

sont ensuite montées entre lame et lamelle au Mowiol qui permet conserver la fluorescence dans le temps.

### 2.3.3 Mise en place de la technique d'Hybridation in situ et son utilisation pour la localisation fine de l'expression de Cldn-16 ou Cldn-3 au niveau du rein et de la dent

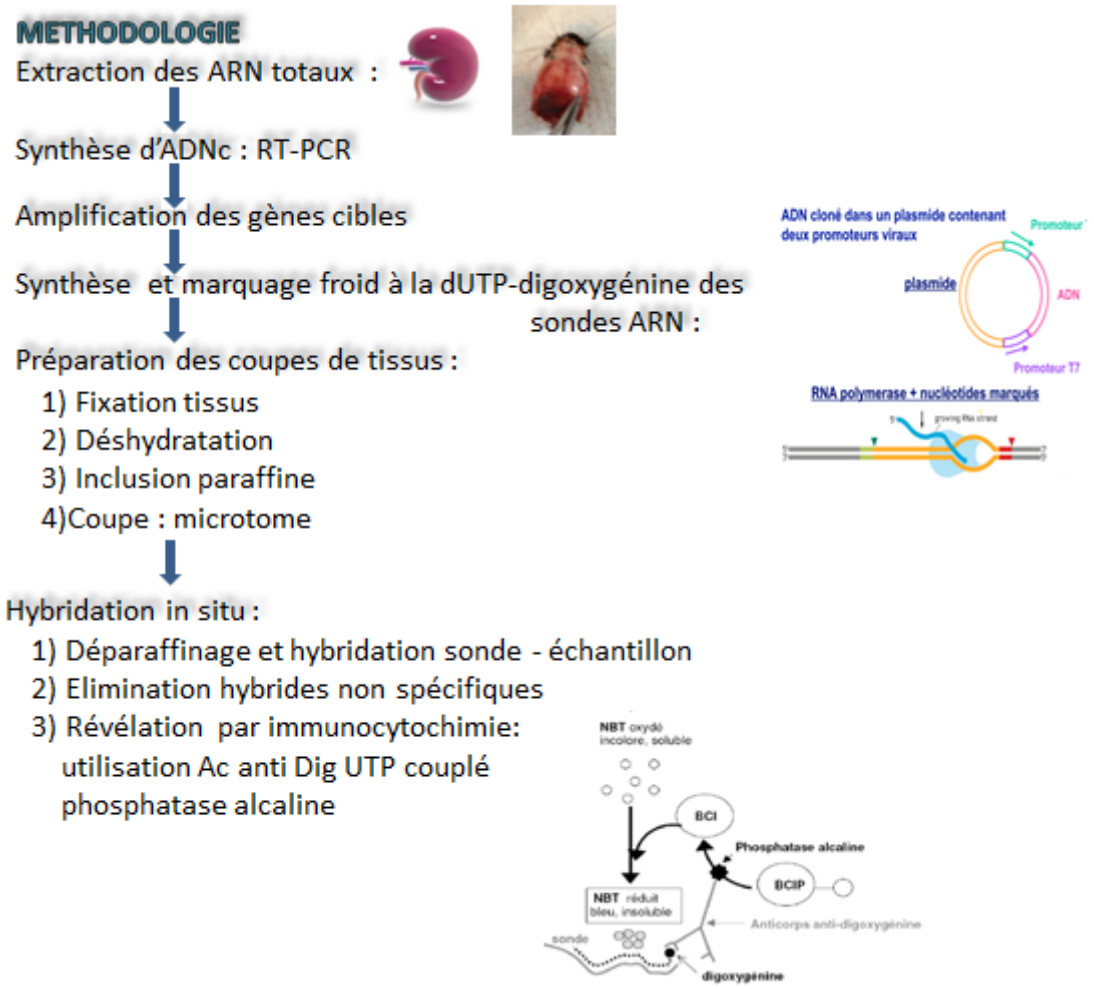



*Figure 26 : Représentation schématiques des étapes de l'hybridation in situ*

#### *2.3.3.1 Inventaire des besoins et coûts*

Tout d'abord afin de mettre en place la technique d'hybridation au sein du laboratoire, j'ai fait l'inventaire des besoins, pris en charge intégralement la commande et la négociation du matériel nécessaire. Ce travail a donc été réalisé de juin à septembre 2013

| Cout total TTC non négocié | Cout total après remise |
|---|---|
| 12900.21 | 7190.96 (soit 5709.25 euros de remise = 44.27% de remise totale) |

*Tableau 5 : Estimation du cout total pour la mise en place de l'hybridation in situ au laboratoire.*

### 2.3.3.2 *Préparation des sondes*

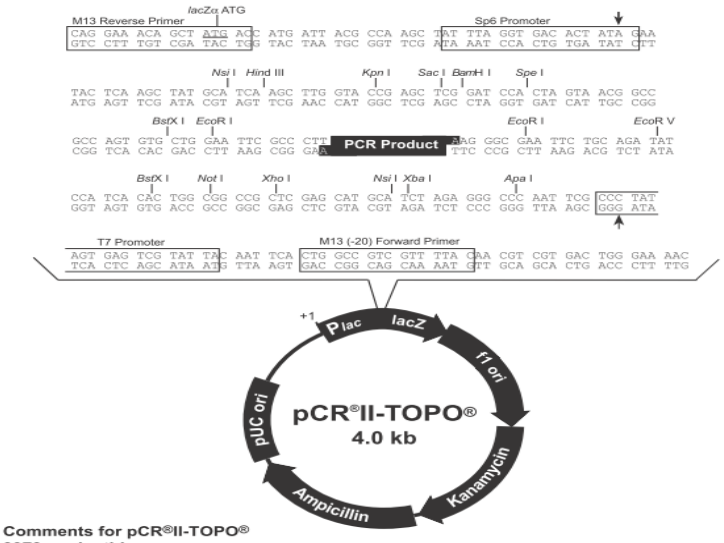
J'ai testé la synthèse de deux types de sondes :

- Par clonage dans un vecteur plasmidique :

Utilisation d'un couple de primers spécifiques de la séquence du gène recherché amplifiée par RT-PCR.

L'amplicon une fois purifié est ensuite cloné dans un vecteur plasmidique nous permettant de répliquer en grande quantité l'insert par transformation dans des bactéries compétentes. Il contient également le gène LacZ alpha permettant la production d'une activité beta galactosidase, qui permet d'identifier les bactéries recombinantes par test « Blanc/bleu ». Le gène de résistance à l'Ampicilline permettra lui d'exercer une pression de sélection et de ne sélectionner que les bactéries ayant intégré le vecteur.

Le plasmide (Fig.27) une fois extrait et purifié est linéarisé par des enzymes de restriction dont les sites se situent à proximité de l'insert de manière à ce que l'ARN polymérase puisse faire la synthèse du transcrit à partir des promoteurs Sp6 (pour site XbaI) ou T7 (pour le site HindII).




**Comments for pCR®II-TOPO®**
**3973 nucleotides**

*LacZα* gene: bases 1-589
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-383
T7 promoter: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
f1 origin: bases 590-1027
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
pUC origin: bases 3178-3851

*Figure 27 : Carte du vecteur plasmidique utilisé pour la synthèse des sondes HIS*

- Par amplification par PCR de l'ADNc : Utilisation de primers spécifiques de la séquence du gène recherché auxquels j'ajoute à chaque extrémité les séquences du promoteur (Tableau 6) Sp6 pour le primer Forward afin de générer la sonde sens 5' → 3'.
T7 pour le primer Forward afin de générer la sonde antisens 3' → 5'.

Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc du rein, de l'os et le germe de molaire de souris sauvage ont été disséqués et les ARN totaux extraits en utilisant le Kit « RNeasy Plus mini kit mini kit » selon les instructions du fabricant pour une extraction à partir de tissu.

Amplification des gènes et séquençage : Les ADNc ont été fabriqués à l'aide du Kit « Verso » à partir de 500ng d'ARN.

Des séquences de 400 et 800pb (taille optimale pour une sonde ARN en Hybridation in situ (Acloque et al., 2008)ont été amplifié par RT- PCR.

L'ADNc de chaque extraction (10ng) a été amplifié par PCR dans un mélange composé de 2.5µl de tampon (10X), 2µl de dNTP (2.5mM chacun), en présence des amorces sens et antisens (1µl de chaque à 10pmol/µl) et de 0,125µl de TAKARA DNA Polymerase. L'amplification s'est déroulée dans un thermocycleur Verity.

Après optimisation des conditions PCR pour l'amplification pour chaque gène, les produits de PCR ainsi obtenus sont déposés sur gel agarose/TBE à 1,5% puis purifiés en utilisant le Kit « NucleoSpin Gel and PCR product Clean Up », et élués dans 15µl de la solution NE (Tampon d'élution).

Les produits de PCR purifiés sont dosés au Nanodrop puis soit réamplifiés par PCR quand utilisation des primers contenant les promoteurs Sp6 et T7, soit transformés (pour les gènes ne possédant pas les promoteurs SP6 et T7 dans les primers utilisés pour l'amplification).

| Nom gene | N° Sequence reference NCBI | Expression | Primer Forward | Primer Reverse | Taille amplicon |
|---|---|---|---|---|---|
| *Col1a1* | NM_007742.3 | Os | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur Sp6 5'ATTTAGGTGACACTATAGCCCGAGGTATGCTTGATCTG3' | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur T7 5'TAATACGACTCACTATAGGGCCTTGGAAACCTTGTGGACC3' | 480pb |
| *Claudin-16* | NM_053241.5 | Rein | N°1 : Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur Sp6 5'ATTTAGGTGACACTATAGGGTAACTCGAGCACTGATGAT3'<br><br>N°2 Sur région 5'UTR de Cld 16 : Design primers avec promoteurs Sp6 5'ATTTAGGTGACACTATAGAGGGATGTGAGGAAACGTGAAA3' | N°1 Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur T7 5'T7TAATACGACTCACTATAGGGACCTGCAGTTGAATAGGGCT3'<br><br>N°2 Sur région 5'UTR de Cld16 : Design primers avec promoteurs T7 5'TAATACGACTCACTATAGGGTCATCAGTGCTCGAGTTACCAC 3' | 594pb<br><br>440pb |
| *Claudin-3* | NM_009902.4 | Rein | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur Sp6 5'ATTTAGGTGACACTATAGAAATGTACGACTCGCTGCTG3' | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur T7 TAATACGACTCACTATAGGGGACCAGGACACCGGTACTAA3' | 250pb |
| *Enam* | NM_017468.3 | Germe de molaire souris | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur Sp6 5'ATTTAGGTGACACTATAGATGTGGCCTGGTACCAAATG3' | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur T7 5'TAATACGACTCACTATAGGGCATGGTGGTTGTGGATAGGG3' | 530pb |
| *Amelx* | NM_009666.4 | Germe de molaire souris | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur Sp6 5'ATTTAGGTGACACTATAGGCAACCAATGATGCCAGTTC3' | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur T7 5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGCAGCTCAGGAAGAAT 3' | 287pb |
| *Npt2A* | NM_011392.2 | Rein | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur Sp6 5'ATTTAGGTGACACTATAGTGACCCGAGGGTATAAAGAAGA3' | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur T7 5'TAATACGACTCACTATAGTTGGTGACAGAGGTTCC3' | 720pb |

***Tableau 6 : Récapitulatif des sondes synthétisées.***

Synthèse des sondes ARN :

Les sondes ARN antisens marquées à la Digoxigenin-UTP, sont synthétisées par SP6 à l'aide du Kit « Riboprobe® Combination System—SP6/T7 RNA Polymerase » en suivant les instructions du fabricant, avec le mélange de nucléotides suivants : 1µl de rATP, 1µl de rCTP, 1µl de rGTP, 0,5µl de rUTP, et 0,5µl de digUTP. Les sondes sont purifiées à l'aide du Kit « illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns ».

Afin de vérifier la présence et la taille de la sonde synthétisée en ARN je procède à un dépôt sur gel d'agarose 1.5%.

#### *2.3.3.3 Préparation des coupes de tissus*

Les échantillons de reins sont fixés avec du paraformaldéhyde 4% injecté en intracardiaque avant inclusion en OCT afin de conserver au maximum l'intégrité du tissu et éviter tout nécrose. Les mandibules de souris C57 WT J3 post natal sont incluses directement en OCT après prélèvement (elles seront fixées dans du PFA 4% uniquement après décongélation). Les pièces ont été coupées à l'aide d'un cryostat et déposées sur des lames Superfrost plus.

#### *2.3.3.4 Hybridation in situ (HIS)*

Les coupes sont décongelées 15 minutes à température ambiante puis fixées au PFA4% durant 10 minutes à température ambiante.

Les coupes sont rincées avec du PBS et de la protéinase K (20mg/ml, Invitrogen) est ajoutée à une concentration de 0,5µg/ml, dans du PBS 0,1M (PH 7.4) à 37°C pendant 6 minutes. Les coupes sont rincées avec du PBS puis fixées pendant 30 min dans du paraformaldéhyde à 4%. Après deux bains successifs de PBS et de SSC 2X, la sonde est hybridée dans une chambre humidifiée au SSC 2X à 65°C pendant une nuit. Les lames sont rincées dans un tampon avec du formamide 50% à 65°C, 30 min, puis 2 fois 1h. Après 2h de blocage dans une solution de sérum de chèvre inactivé à 20% et de Blocking Reagent 2%, l'antiDig, ajoutée à cette solution, est déposée sur les lames, durant la nuit, à température ambiante. Après rinçage, la révélation est réalisée :

Soit au BCIP (5- Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-4-toluidine salt à 3,5µl/ml) combiné au NBT (Nitro Blue Tetrazolium Chloride à 0,45µl/ml, Roche) substrats de la phosphatase alkaline catalysant une réaction colorée (apparition d'un précipité bleu) observable en lumière blanche.

Soit au en utilisant le kit détection HNPP (2-hydroxy-3-naphtoic-2'-phenylanilide phosphate) / Fast Red TR (4-chloro-2-methylbenzenediazonium hemi-zinc chloride salt) substrat fluorescent pour la phosphatase alkaline qui permet une détection en théorie plus sensible qu'en

lumière blanche. L'absorbance max du HNP/Fast Red TR est 553nm pour une émission max de 584nm (565-620nm).

Les lames sont rincées et recouvertes d'une lamelle montée en Gel Mounting Medium pour la lumière blanche, soit en Mowiol ® 4-88 Reagent. L'acquisition d'images est réalisée à l'aide d'un microscope Leica DFC 425.

### 2.3.4 Zymographie in situ

Ce travail a été réalisé par Yong Wu, uniquement sur le modèle Claudin-16.

Par zymographie in situ (Fig.28), nous mettons en évidence l'activité protéolytique des MMPs, grâce à leur capacité à dégrader leur substrat, ici de la gélatine (pour identifier l'activité de la MMP2) et de la caséine (pour identifier l'activité de la MMP20) présents sur coupes de tissus congelées.

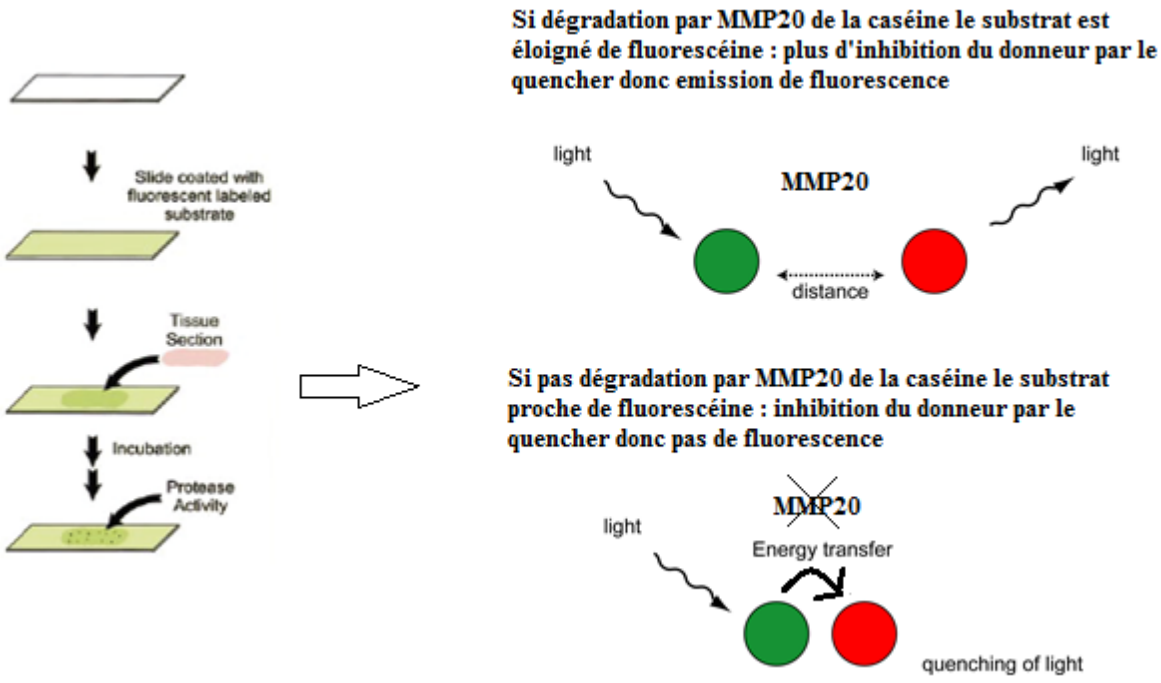



*Figure 28 : Représentation schématique de la zymographie in situ (D'après Yan and Blomme, 2003)*

En plus de fournir des informations sur la présence de formes actives, cette technique nous renseigne sur leur localisation dans le tissu (elle ne permet cependant pas d'établir quelle protéase est responsable de la dégradation du substrat protéique, et doit donc être complétée avec des expériences d'inhibition réalisées avec des inhibiteurs spécifiques des MMP pour confirmer l'identité de celles-ci ou bien par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, si les quantités de MMP le permettent) Le substrat protéique, couplé à la fluorescéine est placé en contact avec la coupe. La MMP20 présente est ainsi détectée suite à la dégradation de substrat fluorescent par

l'observation en microscopie de fluorescence. L'intensité du signal fluorescent augmente avec l'activité protéolytique puisqu'elle entraîne une perte de quenching (processus d'extinction de la fluorescence).

Après avoir séché les coupes à l'air pendant 10 minutes, des dilutions au 1/20eme DQ-gélatine ou de la caséine ont été réalisées au 1/20 dans un gel d'agarose à 1% en PBS (p / v) à faible température de gélification. Ce mélange a été apposé au-dessus des sections et recouvert d'une lamelle. Après polymérisation de la gélose, l'incubation a été effectuée à 4 ° C pendant une nuit. Une approche similaire a été réalisée avec 10 mM de 1,10-phénanthroline (Sigma-Aldrich), qui est un inhibiteur de métalloprotéases (composé chélateur du zinc, qui se lie au site catalytique des MMP, inhibant ainsi leur activité enzymatique). Des témoins négatifs ont été réalisés au moyen de gels sans gélatine ou caséine et traitées de la même manière que celle décrite ci-dessus. L'examen de la lyse du substrat a été évalué à l'aide d'un microscope IX 81 (Olympus) et à objectif 20X. Les acquisitions ont été faites avec ORCA R2 (HAMAMATSU). Des paramètres d'imagerie identiques ont été utilisés pour toutes les acquisitions. L'intensité de l'analyse de fluorescence a été réalisée à l'aide d'ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij/). Les mêmes niveaux de seuil ont été utilisés pour les tissus issus de souris sauvages et KO afin de les comparer.

### 2.3.5 Mesure du pH dans l'incisive de souris adulte

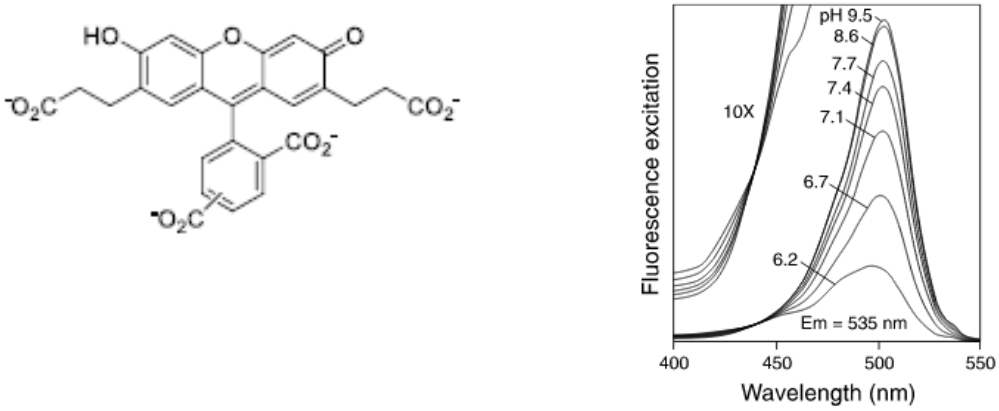
Ce travail a été réalisé par Yong Wu, uniquement sur le modèle Claudin-16.

Les sections situées sur l'incisive au même niveau par rapport à M1 pour les souris sauvages et KO sont décongelées et traitées pendant 15 min dans une chambre noire à la température ambiante avec 4µM de BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyéthyl) -5-(et-6) -carboxyfluorescéine, Life Sciences) dilué dans une solution saline. Il s'agit d'une sonde fluorescente dérivée de la fluorescéine (Fig.29. A). Les coupes sont rincées trois fois avec du sérum physiologique. Les échantillons sont transférés sur la platine d'un microscope inversé (AxiovisionA1, Carl Zeiss, Allemagne). Le pH est évalué par microscopie à fluorescence à double longueur d'onde d'excitation.

En effet, le BCECF est une sonde qui présente un pic d'émission à 530 nm (de couleur verte) et une excitation dont la forme dépend du pH. En général, les variations de fluorescence ne sont pas uniquement liées à des variations de pH : Un photo-blanchiment de la sonde ou une diminution de la concentration de la sonde due à des phénomènes de relargage hors de la cellule peuvent entrainer une diminution de l'intensité mesurée. L'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation ne permet donc pas d'obtenir à elle seule une mesure de pH. On utilise alors une excitation à une seconde longueur d'onde : le point isoémitif. Avec cette excitation,

l'intensité de fluorescence est indépendante du pH et ne dépend que de l'environnement de la sonde (concentration, blanchiment, ions environnants). Le rapport d'intensité entre les deux mesures est indépendant de tout facteur extérieur et permet alors une évaluation du pH intracellulaire « réel ». Cette approche est appelée mesure ratiométrique en excitation.

Pour se faire, BCECF (sonde extracellulaire), est excité alternativement à 500 et 440 nm avec une diode électroluminescente (Optoled, Cairn Research, Faversham, Royaume-Uni). Ainsi $\lambda = 440$ nm correspond à la longueur d'onde d'excitation pour laquelle l'intensité de fluorescence est donc indépendante du pH (point isoémitif) et 500 nm celle pour laquelle l'intensité correspondante varie en fonction du pH (Figure 29.B) La lumière émise est recueillie à travers un miroir dichroïque, passée à travers un filtre à 530nm et focalisé sur une caméra EM-CCD (iXon, Andor Technology, Belfast, Irlande) connecté à un ordinateur. Les intensités lumineuses mesurées sont numérisées avec une précision de 14 bits (échelle de 16384 niveaux de gris) pour une analyse plus approfondie. Pour chaque échantillon, 28 régions adjacentes d'intérêts sont analysées et le gris moyen est mesuré avec le logiciel IQ Andor (Andor Technology, Belfast, Irlande). On effectue ensuite le rapport d'intensité entre les deux mesures afin d'évaluer le pH.




A) B)

*Figure 29 : Fluorophore BCECF incorporé dans l'incisive afin d'évaluer le pH par spectroscopie de fluorescence*
*A) Structure du fluorophore synthétisé par Tsien et al. B) Spectre d'excitation du BCECF (Moleuclar Probes, 2006)*

La sonde extracellulaire est calibrée à la fin de chaque expérience. Les échantillons sont traités par une solution saline de BCECF contenant 100 mM de tampon HEPES (Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique). Trois solutions d'étalonnage différentes, titrées à pH 6,3, 6,8 ou 7,3, sont utilisées.

## 2.4 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Afin de comparer la structure de l'émail des souris mutantes par rapport aux souris sauvages, j'utilise la microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM en anglais pour scanning electron microscopy). Elle utilise un fin faisceau d'électrons, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques permettent de focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon.

L'interaction entre les électrons et l'échantillon provoque la formation d'électrons secondaires de plus faible énergie. Ils sont amplifiés puis détectés et convertis en un signal électrique. Ce processus est réalisé en chaque point de l'échantillon par un balayage du microscope. L'ensemble des signaux permet de reconstruire la typographie de l'échantillon et de fournir une image en relief.

La préparation des échantillons est contraignante. Ils doivent être déshydratés puis subir un traitement pour devenir conducteur (fixation des tissus, nettoyage). Pour se faire, les mandibules de souris, sont prélevées, transférées dans de l'éthanol 70% et conservées à +4°C.

Les échantillons subissent une attaque acide 20 secondes dans HCl 0.1%, puis sont rincés 10 secondes à l'H2O ultrapure. Ils subissent ensuite une déprotéinisation par un bain de 2 minutes dans la javel 5% puis rincés 20 secondes l'H20 ultrapure. Ils sont ensuite fixés 30 minutes dans solution de Glutaraldéhyde 2.5%+Cacodylate de Na à 0.1M (pH=7.4) et déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante en éthanol (25%, 50%, 75%, 95% d'éthanol). Enfin, ils sont conservés à +4°C dans éthanol 100%.

Des sections sont réalisées avec une scie équipée d'un disque de diamant (Struers , Champigny sur Marne , France) sous un jet d'eau continu. Après le polissage minutieux, les surfaces sont nettoyées avec de l'hypochlorite de sodium à 5 % pendant 2 minutes, rincées deux fois avec de l'eau distillée, gravés avec 2 % d'acide nitrique pendant 10 s, puis rincer abondamment à l'eau distillée. Les surfaces revêtues par pulvérisation cathodique d'or sont observées sous un microscope électronique à balayage (SEM S260 Cambridge, Royaume-Uni) équipé d'un détecteur d'électrons Everhart - Thornley et l'ESB.

## 2.5 Microscopie électronique en transmission (TEM)

Cette technique utilise un faisceau d'électron à haute tension, émis par un canon à électrons. Des lentilles électromagnétiques sont utilisées pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon. En traversant l'échantillon et les atomes qui le constituent, le faisceau d'électrons produit différentes sortes de rayonnements. En général, seuls les électrons transmis sont alors analysés par le détecteur, qui traduit le signal en image contrastée.

Les échantillons doivent être préparés selon un protocole précis, qui doit à la fois conserver sa structure et être conducteur pour laisser passer le faisceau d'électrons.

Pour se faire, les mandibules de souris sont prélevées.

Elles sont fixées sous agitation à +4°C durant 12h dans du PFA4% + 1% Glutaraldéhyde+0.1M NaCaCo pH 7.3.

Elles sont ensuite rincées 3 x 20min à l'H2O puis déshydratées dans des bains d'alcool de concentration croissante en éthanol (30%, 50%, 70% d'éthanol) à +4°C.

Les échantillons sont inclus dans Epon 812 (Fluka). Les sections semi- minces sont colorées avec du bleu de toluidine et fuchsine. Après lavage, les coupes sont séchées et montées dans Eukitt. Des coupes ultrafines sont colorées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb et sont examinées avec un microscope électronique JEOL 1011.

## 2.6 Analyse par microtomographie à rayons X : micro-CT (micro computed tomography)

Le micro CT (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA) est un appareil d'imagerie utilisant la technologie du scanner à rayons X appliqué au petit animal (rat, souris).

Il s'agit d'une technique d'imagerie non-invasive radiographique tridimensionnelle. Cet appareil permet une imagerie volumique X in vivo de petits animaux avec un champ de vue 5 à 73 mm de diamètre et des résolutions variables de 10 à 295 µm , selon le principe du Cone Beam CT (Computed Tomography). Pour simplifier, le micro-CT est une forme miniaturisée d'un scanner conventionnel qui fournit des images tridimensionnelles de petits échantillons atténuant le faisceau de rayons X (cone Beam).

L'animal est exposé à un faisceau de rayons X (rayonnement électromagnétique à haute fréquence constitué de photons ionisant d'origine artificielle produit par des transitions électroniques des noyaux des atomes) qui sont recaptés à leur sortie du corps par un système de détection. C'est l'atténuation du rayon X qui est mesuré lorsque celui-ci est capté par le détecteur. Cela permet de déterminer l'atténuation en chaque point de l'animal et de le retranscrire en voxels d'atténuation différentes suivant le tissu traversé. Les voxels correspondent à de petits éléments de volumes équivalent au pixel mais ajoutant une dimension supplémentaire par rapport à celui-ci : la profondeur. Il se matérialise donc par trois coordonnées : X, Y, Z. Un algorithme permet ensuite de traduire l'atténuation en unité Hounsfield pour obtenir une image en nuances de gris. Etant donné que le faisceau tourne autour de l'animal, de nombreuses projections sont obtenues

pendant la durée de l'acquisition. Ces projections sont ensuite reconstruites pour obtenir une image en trois dimensions en assemblant les différents plans de coupe. La haute résolution spatiale, l'épaisseur de coupe très fine, la production de voxels et la qualité d'images obtenues par les systèmes microtomographiques ouvrent de nouvelles perspectives pour l'analyse précise de détails morphologiques des structures dentaires.

La souris est anesthésiée avec de l'isofluorane puis installée dans la chambre à rayons X (Fig.30).

La mandibule est explorée avec les paramètres suivants :

- Voltage : 90 kV.
- Intensité : 160µA.
- FOV (Champ de vue) : 10mm.
- Résolution : 20µm.
- Mode d'acquisition : fine.

Le logiciel Osirix permet de réaliser le post-traitement des images.

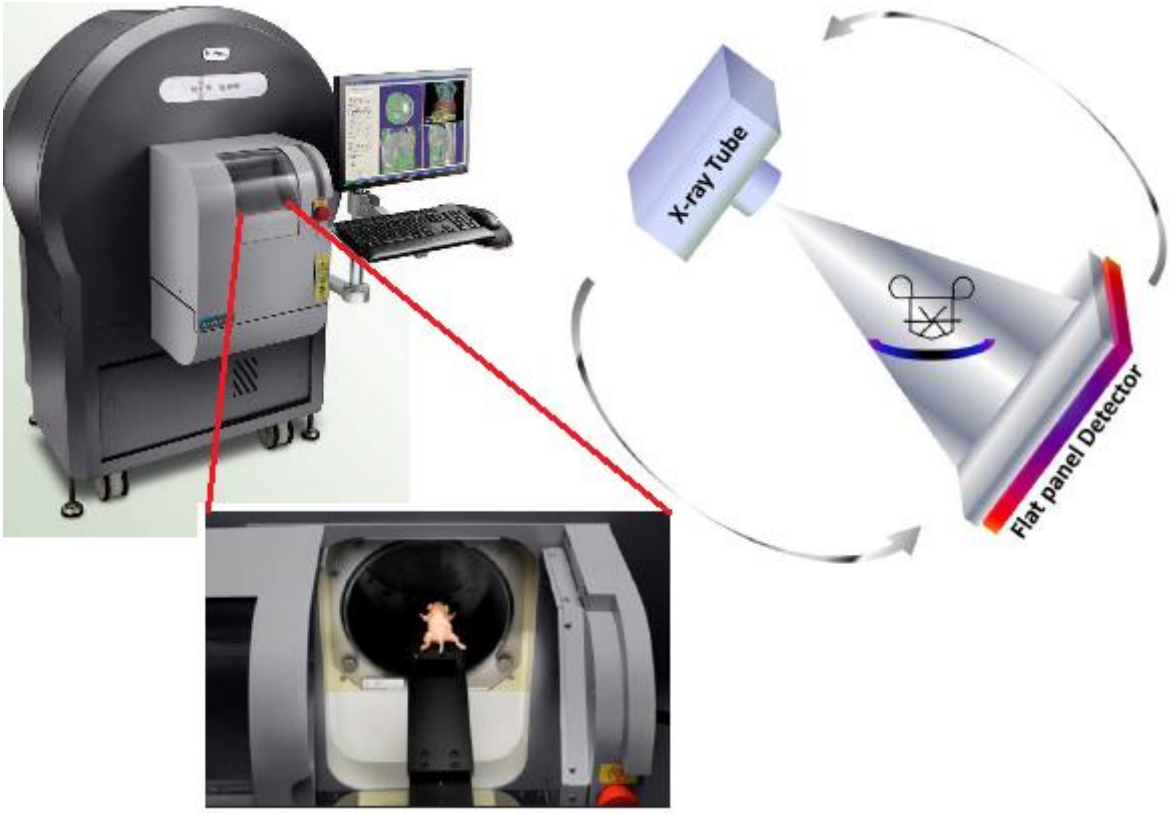



*Figure 30 : Le micro CT Quantum FX Caliper*

## 2.7 Extraction protéique et Western blot

Extraction protéique : Prélèvement des deux incisives inférieures sur des souris issues de mêmes, âgées de 2 mois. Pour se faire les hémi-mandibules sont séparées et l'incisive nettoyée au maximum des tissus adjacents, tout en conservant la cervicale loop, qui contient une grande partie des protéines. Elles sont ensuite plongées dans l'azote liquide et broyées à froid afin de se prémunir de toute dégradation protéique.

Les échantillons sont transférés dans 100µl de tampon d'extraction glacé (2 incisives par individu poolées) contenant 50mM de Tris 50mM, 5mM de $CaCl_2$, 0.9% de NaCl 0.9%, 0.2% de Triton et un cocktail d'inhibiteurs de protéases au 1/100 (Calbiochem, La Jolla, CA). Les broyats résultants sont ensuite brièvement soniquées sur la glace (3 fois 5 sec), puis centrifugés à 10000g pendant 15 min à 4 °C et stockés à -80 °C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons sont ensuite dosés grâce à un au kit « Pierce BCA Protein Assay ».

Western blot : 20µg de chaque échantillon sont soumis à SDS-PAGE par dépôt sur gels préfabriqués 4-20% (Mini-Protean TGX Precast Gels, BIO-RAD) en présence du marqueur de poids « Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards » (Biorad) et transférés sur une membrane de nitrocellulose 0.22µm (BIO-RAD) durant 2 heures à 100V. Les membranes sont incubées avec un anticorps anti-amélogénine (1/700) et anti-énaméline (1/500, Santa Cruz) durant une nuit à 4 °C. Les membranes sont incubées avec une dilution au 1/1000 d'un anticorps secondaire IgG anti-lapin (amelogenin) lié à une péroxydase ou un anticorps secondaire anti-chèvre (énaméline) pendant 1 heure à température ambiante. La révélation se fait au moyen du kit BM de chimioluminescence (Roche Diagnostics, Meylan, France). Pour le témoin de charge, les membranes sont soigneusement lavées et débarrassées des anticorps préalablement fixés à l'aide d'un tampon de décapage (Pierce Chemical, Rockford, IL) et traités avec anticorps monoclonal de lapin anti-GAPDH pour Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Epitomics, Californie, USA). Ce témoin est très important car il permet, en plus d'indiquer si les échantillons ont été chargés de manière égale dans chacun de nos puits, de vérifier si les protéines ont été transférées de façon adéquate, et de normaliser la quantité de nos protéines.

L'intensité relative des bandes est digitalisée et quantifiée en utilisant le logiciel image J.

# 3 Résultats

## 3.1 Diagnostic d'AI chez des patients atteints de FHHNC

C'est dans le cadre d'examen odontologique d'une patiente âgée de 16 ans, et envoyée par le centre de référence des maladies rares du métabolisme du phosphate et du calcium, qu'il nous a été possible d'identifier une pathologie dentaire associée à un syndrome FHHNC (Fig.31).

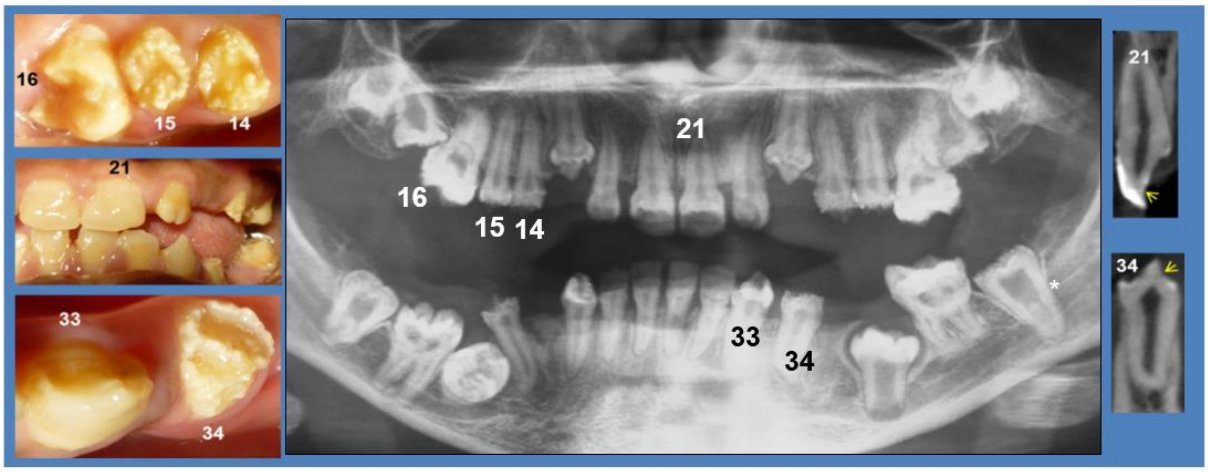



*Figure 31 : Patiente envoyée par le Centre de référence des maladies rares du métabolisme du phosphate et du calcium*

Nous avons pu diagnostiquer une AI avec une sévérité variable chez quatre autres patients non apparentés, avec hypomagnésémie familiale avec hypercalciurie et Néphrocalcinose (FHHNC) en raison de la mutation du gène *Claudin-16* (Fig.32).

Le patient 5 présente une perte l'émail essentiellement sur les incisives centrales inférieures exposant la dentine sous-jacente et plutôt associée à une forme hypomature de l'email (un défaut qualitatif). Alors que les autres patients présentent des formes d'hypoplasie (défaut quantitatif de l'email) ou des forme hypominéralisée (email mou friable, rugueux couleur jaune brun) avec pour certains, des dents permanentes non éruptées.

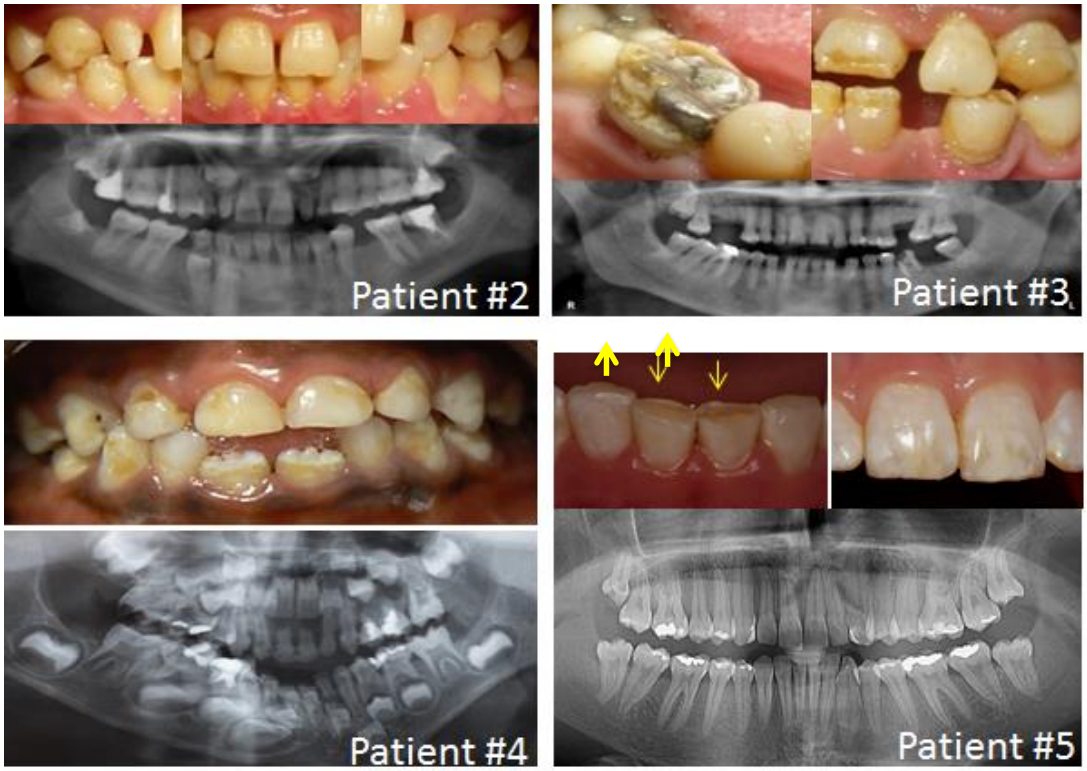



*Figure 32 : Autres patients envoyés par le Centre de référence des maladies rares du métabolisme du phosphate et du calcium*

## 3.2 Défauts de l'émail chez les souris Cldn16$^{-/-}$ et Cldn3$^{-/-}$

### 3.2.1 Identification des souris Cldn-16 et Cldn-3 par génotypage

Se référer en 2.1.4.

### 3.2.2 Imagerie au micro CT de mandibules de souris sauvages comparées à celles des modèles Cldn16−/−et Cldn3−/−

Nous avons étudié phénotype dentaire de nos souris, en imagerie 3D par micro CT, qui permet à la fois une analyse qualitative (défauts de l'émail) et quantitative (volume de l'émail) de nos échantillons. Les souris KO pour le gène *Cldn16* montrent des fractures de l'émail et une exposition de la dentine coronale, particulièrement visible sur les cuspides linguales des molaires inférieures (Fig.33). Chez les souris sauvages, l'email est intact. Les analyses quantitatives de haute résolution montrent une diminution significative du volume de l'émail des molaires de *Cldn16*$^{-/-}$–souris par rapport avec des souris sauvages. Sur l'incisive, l'émail minéralisé (représenté en rose sur la coupe sagittale fig.33.A) est retrouvé au niveau de la première molaire (M1) chez les souris KO alors que chez les WT ce tissu est déjà bien minéralisé sous la deuxième molaire (M2).

La modification du phénotype de l'incisive inférieure, bien que moins évidente que dans les molaires, montre donc un retard de la minéralisation de l'émail, ce qui entraîne une légère diminution du volume d'émail (Fig.33 A).

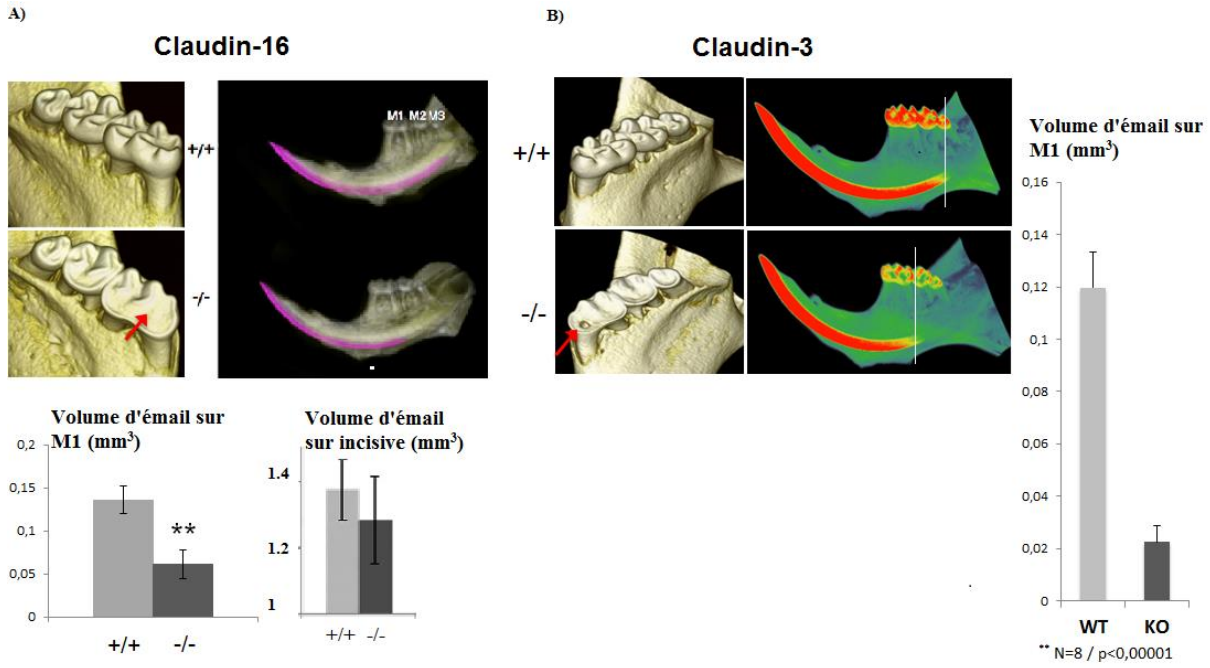



*Figure 33 : Phénotype dentaire de souris âgées de 3 mois.*
*A) Analyses quantitatives par micro CT de souris Cldn16$^{-/-}$ comparées aux souris sauvages : volume 3D de l'email sur molaire de souris et volume d'email par analyse quantitative haute résolution sur incisive. (Rose = émail minéralisé), p<0.001) (n =6 par groupe). B) Analyses quantitatives par micro CT de souris Cldn3$^{-/-}$ comparées aux souris sauvages : volume 3D de l'email sur molaire de souris et minéralisation de l'incisive. (Rouge = émail minéralisé), p<0.00001) (n =8).*

De plus, nous avons pu constater que le phénotype dentaire de notre modèle murin pouvait être d'avantage associé au phénotype du patient n °5. En effet, tous deux présentent une forme hypomature de l'émail essentiellement sur les incisives inférieures.

L'analyse au micro CT des souris KO pour le gène *Cldn3* (Fig.33.B) montre une forte diminution du volume d'émail de la 1ère molaire M1 (on observe, en effet une perte de 83% du volume d'émail en mm3 sur les M1). Sur la reconstitution 3D, l'émail de la 1ère molaire mandibulaire est abrasé chez les KO sur la face occlusale au niveau de la zone la plus exposée aux contraintes liées à la mastication (Fig.33B) alors que chez les souris WT, l'émail est intact.

De plus, un retard de la minéralisation de l'émail est constaté sur l'incisive à croissance continue chez la souris KO. En effet, de l'émail minéralisé (représenté en rouge sur la coupe sagittale fig.33B) est retrouvé sur l'incisive au niveau de la M1 chez les souris KO alors que chez les WT la minéralisation est observée jusque sous la M2.

Ces défauts d'émail suggèrent l'implication de la protéine Claudin-3 dans l'amélogenèse, ce qui concorde avec le rôle des protéines des jonctions serrées dans la formation de l'émail démontrée par les résultats obtenus pour Claudin-16.

## 3.3 Cldn16 et Cldn3 sont exprimées dans tubules rénaux et font partie intégrante des améloblastes sécréteurs présents au niveau des jonctions serrées

### 3.3.1 Analyse de l'expression des Claudines-16 et 3 par PCR après transcription inverse : RT-PCR

J'ai voulu dans un premier temps confirmer l'expression de l'ARNm de *Cldn16* et *Cldn3* dans les deux tissus impliqués dans le métabolisme phosphocalcique : le rein et la mandibule. Pour se faire, j'ai donc extrait les ARN totaux dans plusieurs tissus et réalisé à la suite une RT-PCR. Les résultats obtenus confirment l'expression de ces deux gènes dans le rein ainsi que dans le germe dentaire des souris sauvages (Fig.34).

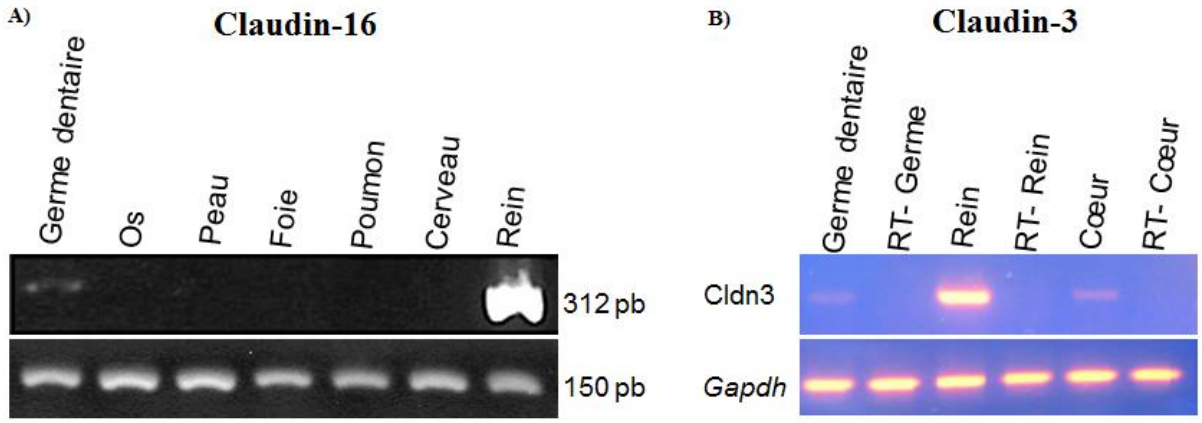



*Figure 34 : RT-PCR réalisée sur différents tissus de souris sauvage C57BL/6*

### 3.3.2 Localisation des protéines Claudin-16 et 3 par immunohistochimie

Afin de confirmer la localisation des protéines Claudin-16 et 3 dans le rein et les améloblastes sécréteurs, nous avons réalisé une immunohistochimie sur les coupes de ces tissus. Le marquage nucléaire au dapi permet de mettre en évidence la polarisation des améloblastes au stade de sécrétion. La protéine Claudin-16 est localisée à l'extrémité apicale des améloblastes sécréteurs (Fig.35.A). Claudin-3 est également localisée dans les améloblastes (Fig.35.B) ce qui suggèrerait un rôle de ces deux protéines dans l'amélogenèse et pourrait expliquer les défauts d'émail chez les deux modèles de souris invalidées pour le gène *Cldn16 et 3*. Le rein de souris, qui sert de témoin positif pour la mise au point de l'immunofluorescence des Claudines, présente

bien un marquage membranaire des tubes contournés proximaux du cortex rénal par la protéine Claudin-3.

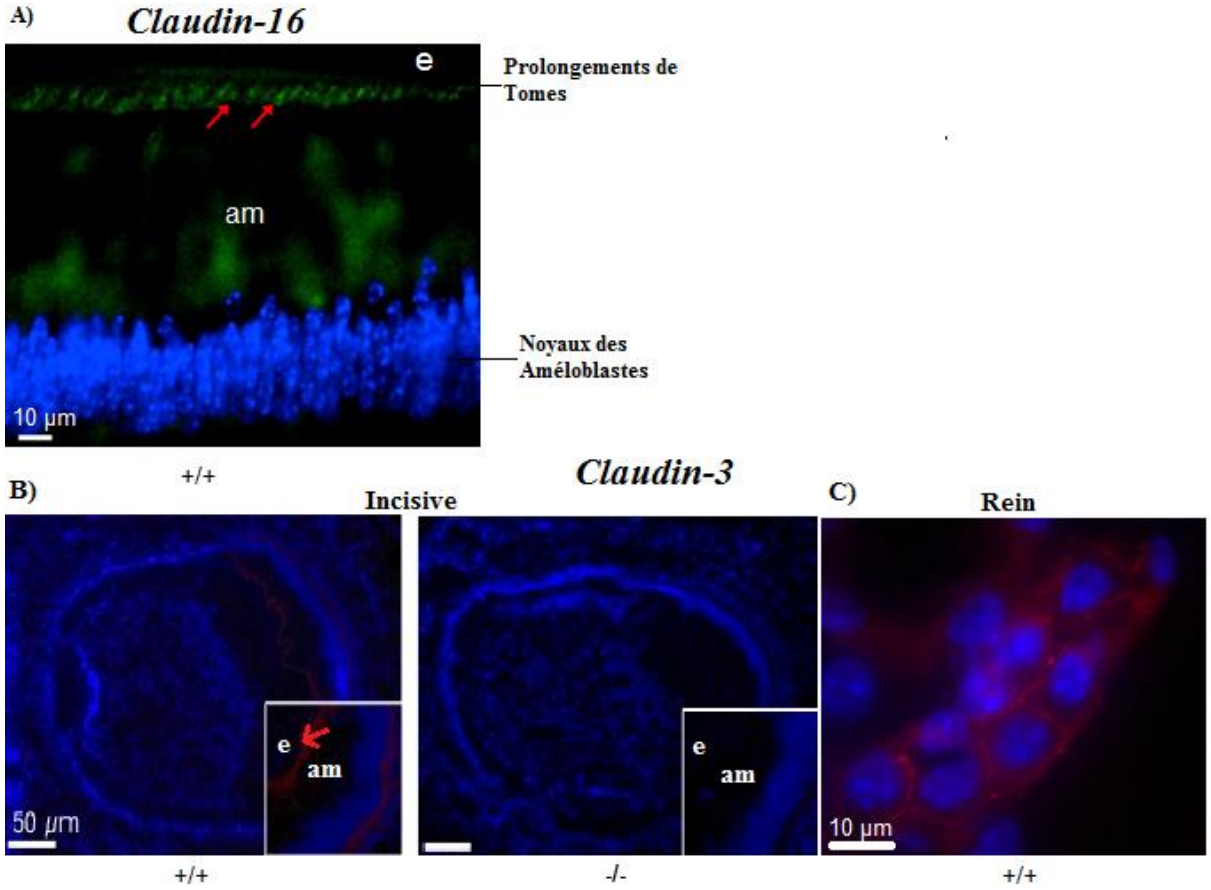



*Figure 35 : Immunohistochimie des protéines Claudin-16 et 3 sur coupe cryostat de dent de souris sauvages C57BL/6 trois jours après la naissance et de rein de souris sauvage adulte C57 :*
*A) Immunohistochimie Cldn16 sur incisive de souris sauvage trois jours après la naissance. En bleu marquage nucléaire au dapi. En vert marquage de la Cldn16. Fleche rouge : localisation de la Cldn 16 au niveau des prolongements de Tomes. am = ameloblastes. e = émail. B) Immunohistochimie Cldn-3 sur incisive de souris J3PN sauvage Vs Ko. En bleu marquage nucléaire au dapi. En rouge marquage de la Cldn3 au niveau apicale des améloblastes. C) Immunohistochimie Cldn3 sur coupe de rein de souris adulte sauvage.*

### 3.3.3 Analyse western blot

Nous avons voulu confirmer par Western blot l'absence de synthèse des protéines Claudin-16 et Claudin-3, chez les souris mutées pour ces gènes, au niveau de nos deux tissus d'intérêt (rein et incisives) et valider par cette technique les anticorps utilisés en immunohistochimie.

A ce jour, l'anticorps anti-Claudin-3 a été validé en western blot sur des extraits protéiques de rein uniquement (Fig.36). En effet, les Claudines sont présentes en très faible quantité dans l'incisive et ne nous permettent pas leur détection par cette technique. Il serait nécessaire de tester de nouveau cette technique en augmentant la quantité de d'extraits protéiques d'incisives dans le gel et en optimisant les conditions d'utilisation des anticorps utilisés.

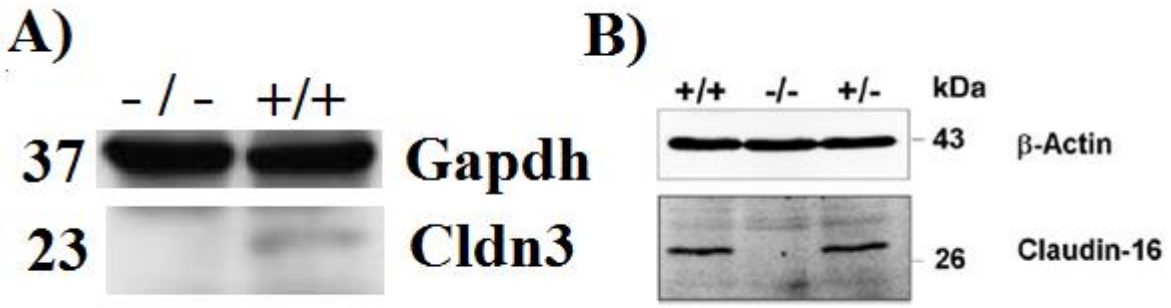



*Figure 36 : Western blot sur échantillon protéines totales extraites à partir de rein chez les souris Cldn-3 adultes WT vs KO (selon Will et al., 2010)*

### 3.3.4 Localisation de l'expression de l'ARNm des gènes Cldn16 et 3 par hybridation in situ

Ce projet a nécessité la mise en place en routine au laboratoire la technique d'hybridation in situ (HIS), ce que j'ai fait, pour nous permettre une localisation fine des ARNm codants pour les protéines potentiellement impliquées dans ces pathologies.

Cependant la technique d'hybridation in situ a ses limites. En effet, pour des protéines faiblement exprimées telles que les Claudines, dans les tissus étudiés, il ne nous a pas été possible de les mettre en évidence dans l'incisive. Cette technique est en effet basée sur l'utilisation de sondes froides, moins sensible que dans l'étude d'Ohazama & Sharpe (2007) où les sondes utilisées étaient radioactives. En effet, nous ne disposons pas des locaux adaptés à l'utilisation de la radioactivité au sein de notre laboratoire, qui nécessite un agrément délivré par décision de l'Autorité de sûreté nucléaire répondant aux exigences de la norme NF EN ISO/CEI 17025.

Ainsi, pour ce projet de nombreuse tentatives d'optimisation de la technique ont été réalisées afin d'augmenter la sensibilité de cette technique.

Afin d'optimiser la qualité de nos hybridations in situ il était possible de jouer sur plusieurs paramètres.

Dans un premier temps j'ai tenté d'améliorer la qualité de nos ARN dans nos échantillons en incluant les tissus frais dans l'OCT, un cryoconservateur (Park and Cunningham, 2007), en vue de la réalisation de coupe au cryostat.

J'ai également augmenté l'épaisseur des coupes de 7µm (standard) à des coupes de 12 à 14µm, ce afin d'augmenter le signal. Cette épaisseur de coupe est réalisable pour un tissu mou tel que le rein, mais reste difficile pour un tissu plus rigide tel que la mandibule notamment en cryostat.

Le rein reste un tissu particulièrement difficile à fixer, ceci étant dû à la capsule rénale en périphérie. Nous avons donc du envisager de travailler sur des tissus fixés au PFA 4% par perfusion intracardiaque pour une meilleure préservation des tissus et donc des ARNm (Gage et al., 2012). De plus le rein est un tissu particulièrement auto fluorescent. L'utilisation du système HNPP risquait donc être difficile et si nous souhaitions augmenter notre sensibilité. J'ai donc testé l'utilisation de Sudan Black B. (Sun et al., 2011), en plus du PFA mais qui n'a donné aucun résultat probant pour diminuer les problèmes d'autofluorescence du rein.

Pour finir, afin d'augmenter la sensibilité de la technique je me suis orientée vers l'utilisation d'un Anticorps secondaire dirigé contre l'Anticorps anti DIG UTP lui-même couplé à la phosphatase alkaline afin augmenter le niveau du signal après révélation soit par le système BCIP/NBT : méthode dite « sandwich ».Ce qui a effectivement porté ses fruit notamment pour la mise en évidence de *Npt2A* sur coupe de rein (fig.38), cotransporteur du sodium phosphate particulièrement impliqué dans la réabsorption rénale. Ce gène jouerait également un rôle dans la minéralisation osseuse ce qui en fait un témoin positif de choix (Segawa et al., 2009).

L'utilisation de cet anticorps secondaire n'a néanmoins pas rendu la technique suffisamment sensible pour permettre la détection des Claudines que ce soit dans l'incisive ou le rein.

En effet, pour tenter de palier à une faible quantité d'ARN recherché, j'ai décidé de tester la révélation en fluorescence. La fluorescence est connue pour être plus rapide et la détection par microscopie peut se révéler plus sensible que par colorimétrie (Roche D., 2008). De plus, notre système de détection nous permet d'utiliser le système de révélation en fluorescence HNPP. J'ai donc testé dans un premier temps, la sonde col1 et obtenu un marquage bien spécifique des ostéoblastes et odontoblastes (Fig.37).

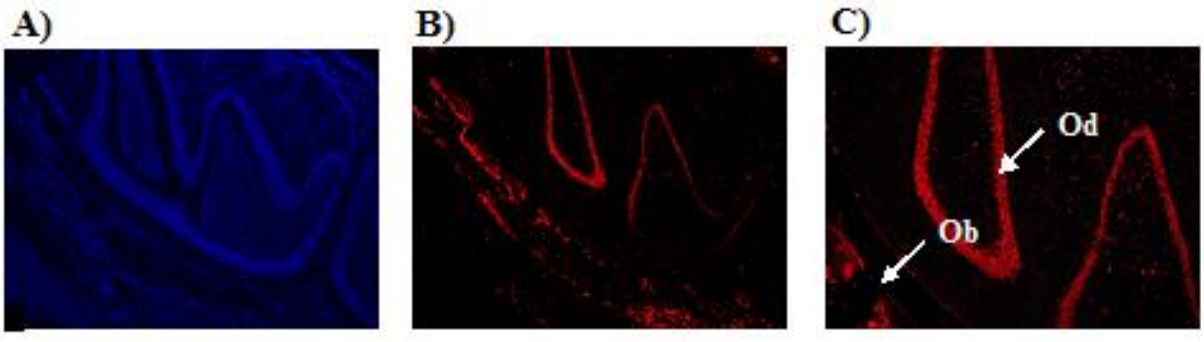



***Figure 37 : Hybridation in situ sur mandibule de souris C57BL/6 sauvages trois jours après la naissance (inclusion paraffine)***
***(A)Fluorescence sonde antisens Col1 Contre coloration DAPI grossissement x 10; (B) Fluorescence sonde antisens Col1 HNPP/ fast red grossissement x 10 ; (c) Fluorescence sonde antisens col1 HNPP/ fast red grossissement x 20.***

J'ai ensuite testé la sonde cldn16 sur des coupes de rein et de mandibule mais je n'ai pas obtenu de marquage concluant.

J'ai également cherché à développer une sonde témoin positif pour le rein.

En effet, Claudin-16 est une protéine connue pour être exprimée dans le rein. Dans le cadre de notre projet nous recherchons son expression dans les améloblastes (cellules synthétisant l'émail). L'expression au niveau des améloblastes est probablement plus faible que dans le rein au vu d'une présence restreinte des jonctions serrées au niveau du pôle sécréteur des ameloblastes. J'ai donc décidé de me focaliser d'abord sur l'expression de *Cldn16* dans le rein. N'ayant encore pas obtenu de résultat probant sur le rein, il m'a donc été nécessaire de valider la technique de préparation de nos échantillons en testant une nouvelle sonde comme témoin positif du rein.

Le Collagen de type 1 ne s'exprimant pas dans le rein sain (Stokes et al., 2000), je me suis par conséquent tournée vers un autre gène fortement exprimé dans le rein, Npt2A (transporteur rénal de phosphate sodium-dépendent A).

Il a été possible de mettre en évidence une expression des ARNm de Npt2A au niveau du rein (fig.38) mais pas au niveau de l'incisive.

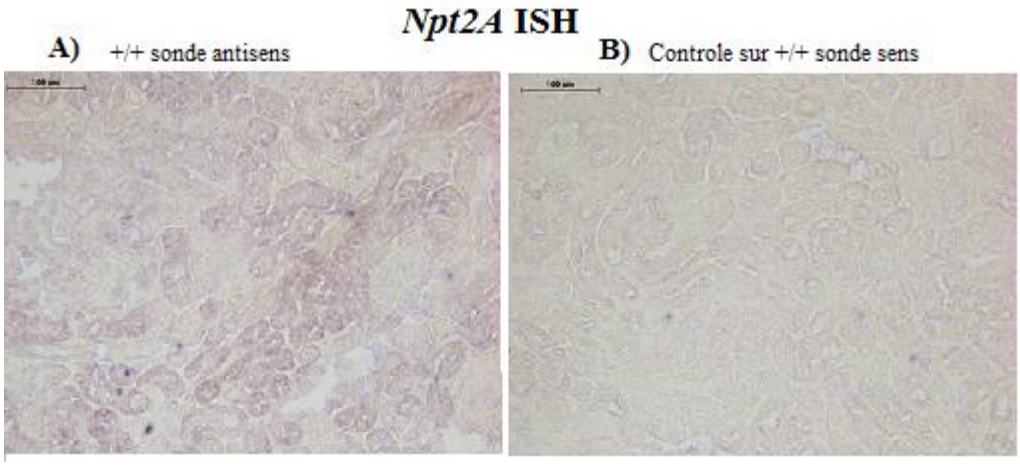


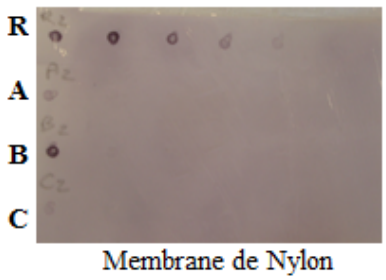

***Figure 38 : Hybridation in situ sur coupe de rein de souris sauvage adulte perfusé PBS1X intracardiaque avec la sonde du transporteur rénal de phosphate sodium-dépendent A (Npt2A).***
***a) sonde antisens. b) sonde sens***

J'ai enfin, cherché à vérifier l'intégration de la Dig UTP dans nos sondes synthétisées.

Ce que j'ai fait par estimation du niveau de marquage à la DIG d'une partie des sondes ARN synthétisées, par Dot Blot**.** Cette technique permet de réaliser un test colorimétrique par comparaison d'intensité spots de dilution en série de l'échantillon (sonde ARN) par rapport au

standard DIG-labeled Control RNA (ARN standard de concentration connue fournie dans le Kit Roche) sur membrane de nylon (Roche D., 2008).

Ce test nous a permis de mettre en évidence une très bonne incorporation de la dig-UTP dans notre sonde. En effet, le signal de notre sonde Cldn16 est équivalent au signal témoin (fig.39).




Membrane de Nylon

← spots de 1µl de dilutions de la solution standard d'ARN controle marquée à la DIG

R : Témoin ARN pour réalisation de la gamme
A : Dépot de la sonde Col1
B : Dépot de la sonde Cld16 N°1
C : Dépot de la sonde Cld16 N°2

| Tube | Final Concentration |
|---|---|
| R1* | 10 ng/µl |
| R2 | 1 ng/µl |
| R3 | 10 pg/µl |
| R4 | 3 pg/µl |
| R5 | 1 pg/µl |
| R6 | 0.3 pg/µl |
| R7 | 0.1 pg/µl |

*Figure 39 : Estimation du niveau de marquage à la DIG par test colorimétrique après 2 heures de révélation au BCIP/NBT par fixation aux UV durant 5 min*

J'ai donc pu en déduire que notre problème résidait bien dans la limite de sensibilité de cette technique, ou dans la préparation des échantillons, et non dans la synthèse des sondes dont nous disposons.

## 3.4 Effets de la mutation des Claudines sur la structure des jonctions serrées

Afin d'étudier si l'ultrastructure des jonctions serrées était modifiée par la mutation des Claudines nous avons réalisé des analyses en microscopie éléctronique à transmission sur incisive de souris J3 post natal sauvage comparé à nos modèles *Cldn16*$^{-/-}$ et *Cldn3*$^{-/-}$. Les analyse ont montré une structure des jonctions serrées aux membranes attenantes des améloblastes comme formant une ligne mince à l'extrémité distales des cellules, donnant un aspect matelassé au complexe de jonction intercellulaire (Figure 40). La structure des jonctions serrées des améloblastes sécréteurs chez les souris *Cldn16*$^{-/-}$est irrégulière, plus épaisse et non linéaire. En outre, la coloration à la phalloïdine des filaments d'actine, connus pour être associés aux jonctions serrées rend plus aisée la visualisation de l'aspect irrégulier des jonctions serrées chez les souris mutées. Ces données viennent donc confirmer que le déficit en Cldn16 et Cldn3 altère bien la structure des jonctions serrées situées à l'extrémité apicale des améloblastes sécréteurs.

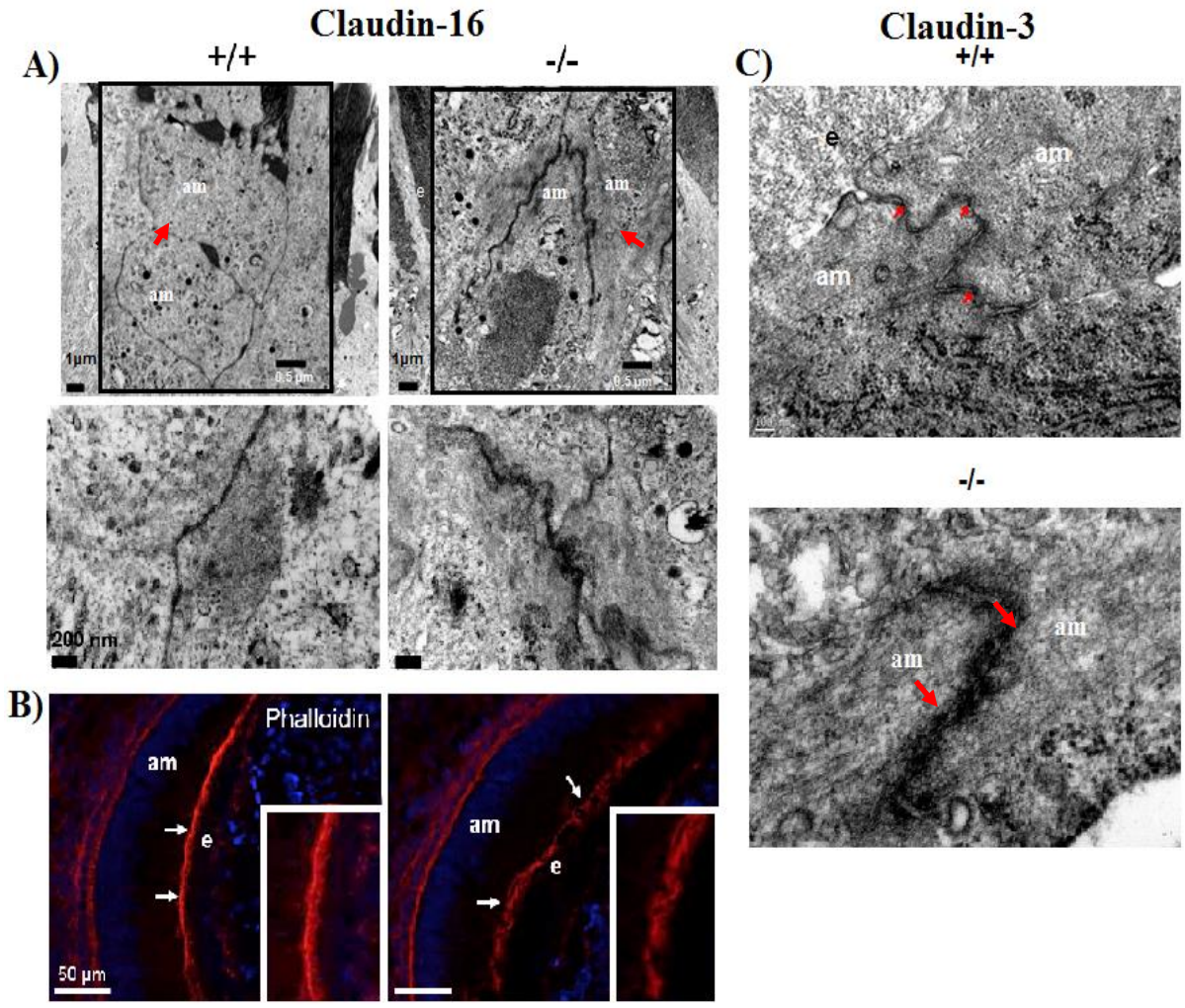



*Figure 40 : Microscopie électronique en transmission*
*A) Image de l'extrémité apicale des améloblastes sécrétoires de souris Cldn16$^{-/-}$ et sauvages. B) Coloration à la phalloïdine des filaments d'actine des améloblastes sécrétoires de souris Cldn16$^{-/-}$ et sauvages. C) Image de l'extrémité apicale des améloblastes sécrétoires de souris Cldn3$^{-/-}$ et sauvages. (flèche rouge = jonctions serrées), am = améloblastes. e = email*

## 3.5 Conséquences de la mutation de Cldn16 sur la matrice de l'émail

### 3.5.1 Les analyses en microscopie à balayage

L'émail présente une structure en SEM très caractéristique bien décrite dans la littérature (ref Khaddam et al…à vérifier), nous avons donc voulu examiner si l'émail de nos souris *Cldn16*$^{-/-}$ et *Cldn3*$^{-/-}$ présentait des défauts visibles en surface.

Ici on observe que les prismes sont différemment sectionnés selon l'orientation de la coupe qui est difficilement reproductible étant donné la petite taille de l'incisive (fig.41). On peut néanmoins constater que les souris sauvages présentent un email de structure caractéristique. L'émail est en effet organisé en prismes, constitués d'un empilement de cristaux d'hydroxyapatite en forme de bâtonnets séparés entre eux par la substance inter prismatique

(composés de cristallite), structure similaire retrouvée chez les souris invalidées pour les deux claudines.

Les images obtenues en SEM, montrent par conséquent que le déficit en claudines ne modifie en rien l'organisation prismatique de l'émail.

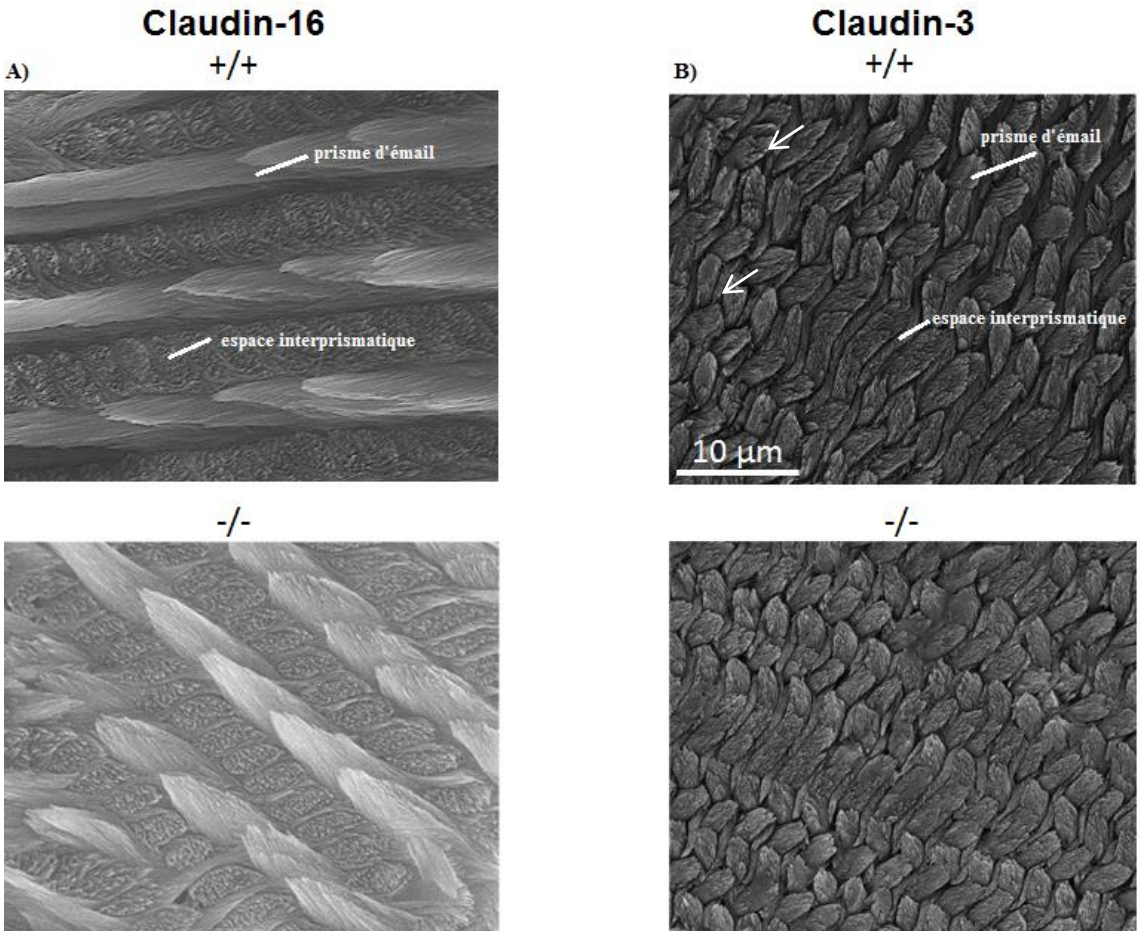



*Figure 41 : Microscopie électronique à balayage d'émail d'incisive de souris*
*A) structure des prismes d'émail chez les souris Cldn16$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages. B) structure des prismes d'émail chez les souris Cldn3$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages*

### 3.5.2 Analyse de l'activité protéolytique de la MMP-20 par zymographie

Nous nous sommes intéressés à l'activité protéolytique des MMPs.

Ces métalloprotéases matricielles constituent une famille multigénique (près de 25 membres à ce jour) de protéases dépendantes du zinc, sécrétées ou membranaires. Les MMPs contrôlent par clivage protéolytique l'activité de composants de la matrice extracellulaire, des molécules membranaires ou solubles impliquées dans la transmission des signaux intercellulaires. En effet, nous avons vu notamment que la MMP20, métalloprotéase matricielle (caséinase), est connue comme étant une protéase spécifique de l'email.

L'analyse par zymographie in situ de la caséine montre une intensité de fluorescence, donc une activité enzymatique, significativement diminuée pour les souris Cldn16-/- par rapport aux souris sauvages (Fig.42). En effet, plus la caséine (couplée à la fluorescéine et utilisée comme substrat sur la coupe), est dégradée par l'activité protéolytique des MMPs, et plus l'intensité du signal fluorescent est forte.

Nous pouvons donc en conclure que la perte de fonction de Claudine-16 altère l'activité protéolytique de la MMP-20.

Cependant, des quantités similaires de cette enzyme ont été révélés dans les extraits de germe par zymographie de caséine sur gel de Polyacrylamide, un procédé biochimique qui permet de d'évaluer les niveaux totaux de la protéase et son état d'activation. Ceci indique que la réduction de l'activité observée par une zymographie in situ serait plutôt due à un changement dans l'environnement de la matrice qui inhiberait l'activité de la MMP-20.

Ces investigations n'ont pour le moment pas été réalisées sur le modèle invalidé pour le gène *Cldn3*.

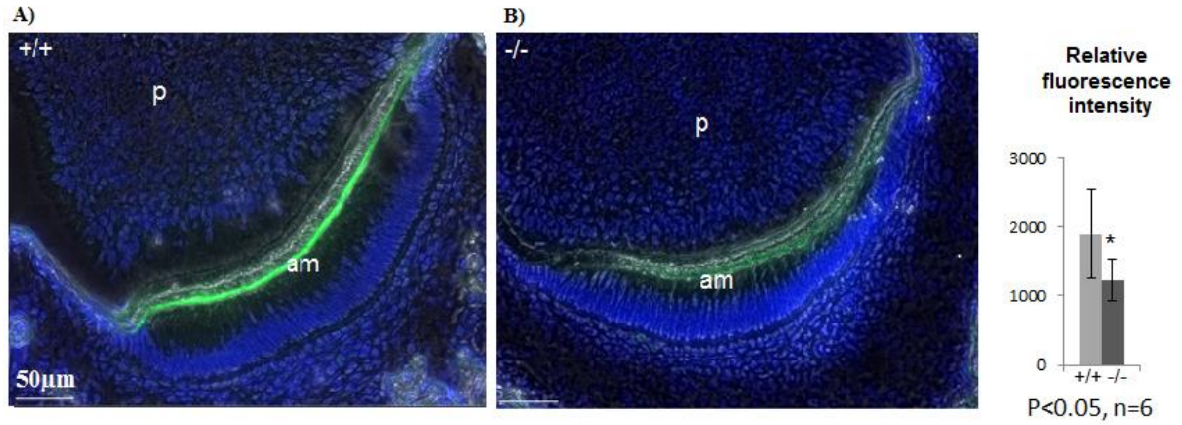



***Figure 42 : Zymographie in-situ de la caséine sur coupe cryostat frontale d'incisive de souris Cldn16$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages J3 post natal.***
***A) Sur souris sauvage. B) Sur souris Cld16 - /-. p = pulpe. am = ameloblastes. En vert la fluorescence de la fluoresceine. En bleu : marquage nucléaire au dapi.***

### 3.5.3 Effet de la perte de fonction de Claudine-16 sur le pH dans l'incisive

L'activité des protéinases type MMP20 étant dépendante du pH, nous nous sommes donc intéressés à mesurer le pH dans la matrice de l'email en formation. Nous savons que la matrice de l'émail, pendant la phase sécrétoire, est maintenue à un pH proche des conditions neutres (Lacruz et al., 2010). Nous pouvons constater que tel est le cas pour les souris sauvages pour lesquelles le pH se situe aux alentours de 7 (Fig.43), alors qu'il est possible d'observer une diminution significative du pH chez les souris invalidées pour le gène Cldn16. En effet, pour les souris *Cldn16*$^{-/-}$, le pH se situe plutôt aux alentours de 6.8 donc plus acide.

Nous pouvons donc en conclure que la perte de fonction de claudine-16 entrainerait la une diminution de la valeur de pH au cours de la sécrétion de l'émail

Ces investigations n'ont pour le moment pas été réalisées sur le modèle invalidé pour le gène *Cldn3*.

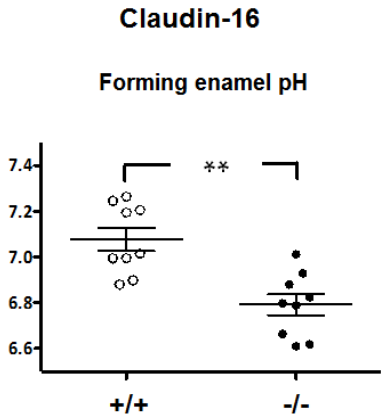



***Figure 43 : Mesure du pH dans la matrice de l'email en formation sur coupe d'incisive J3PN de souris Cldn16$^{-/-}$ comparées au souris sauvage.***
***(Valeurs de pH = 6.79+/- 0.05 versus 7.0+/-0.05, p<0.001) (n=9 par groupe).***

### 3.5.4 Conséquences de la mutation sur l'expression des protéines de la matrice de l'émail

#### *3.5.4.1 Par hybridation in situ*

L'amélogénine et l'énameline font parties des protéines majeures impliquées dans la minéralisation de l'émail. Nous avons voulu vérifier si l'expression au niveau des transcrits était modifiée par l'invalidation des claudines. Nous pouvons constater que l'expression de l'ARNm de ces deux gènes, localisée au niveau des améloblastes sécréteurs ne semble pas modifiée chez les souris KO par rapport aux souris sauvages (Fig.44). Suggérant peut-être qu'il pourrait y avoir une différence non pas au niveau de l'expression de ces gènes, mais plutôt que les processus contrôlant la synthèse de ces protéines pourraient être différents.

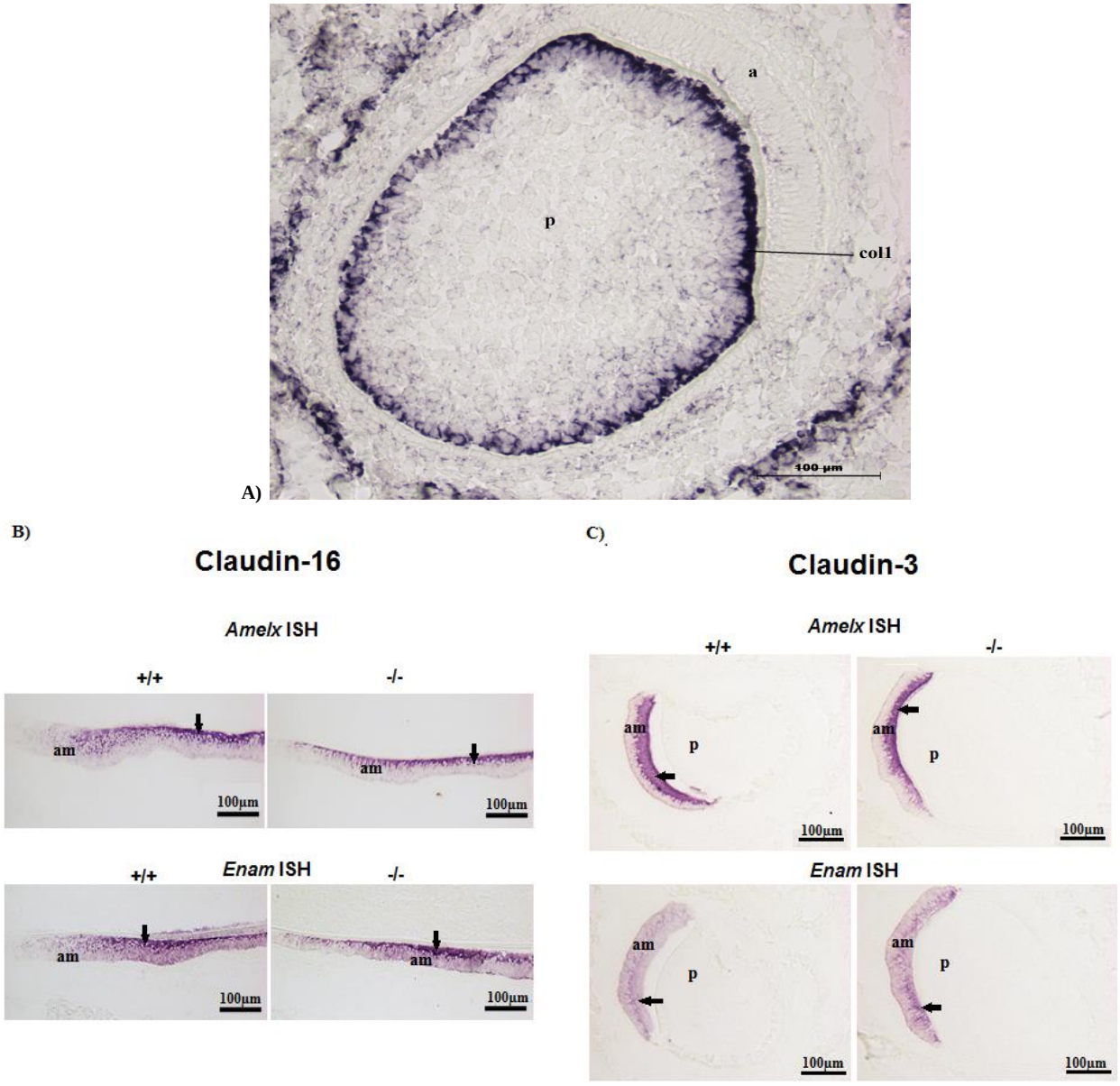



*Figure 44 : Hybridation in situ sur coupe d'incisive de souris deux jours après la naissance. A) Coupe frontale d'incisive de souris sauvage J2 post natal réalisée avec la sonde col1a utilisée comme témoin positif. B) Sur coupes longitudinales d'incisive de souris Cldn16 $^{-/-}$ et sauvage de même portée, et réalisées avec la sonde Amelx et Enam C) Sur coupes frontales d'incisive de souris Cld3 $^{-/-}$ et sauvage de même portée, et réalisées avec la sonde Amelx et Enam. Fleche noire : marquage HIS. p = pulpe. am = ameloblastes.*

### 3.5.4.2 Par analyses en Western Blot

Nous avons voulu vérifier de façon semi quantitative, si l'expression des protéines majeurs de l'émail Enamélin et Amelogénine, était modifiée par l'invalidation des claudines. Les analyses par western blot ont montré une expression de la protéine Enamélin (ENAM) significativement supérieure chez les souris Cldn16$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages (Fig.45). L'expression d'Amelogénine semble également augmentée chez les souris invalidées pour le gène *Claudine-16* par rapport aux souris sauvages mais ces résultats restent le reflet d'une tendance puisqu'ils ne sont pas considérés comme statistiquement significatifs.

Ces investigations ont également été réalisées sur le modèle invalidé pour le gène *Cldn-3* et montre une expression d'Amelogénine supérieure chez les chez les souris invalidées pour le gène *Cldn-3* par rapport aux souris sauvages. Ces résultats suggèrent donc une accumulation de ces protéines dans la matrice de l'émail suite à la perte de fonction des claudines.

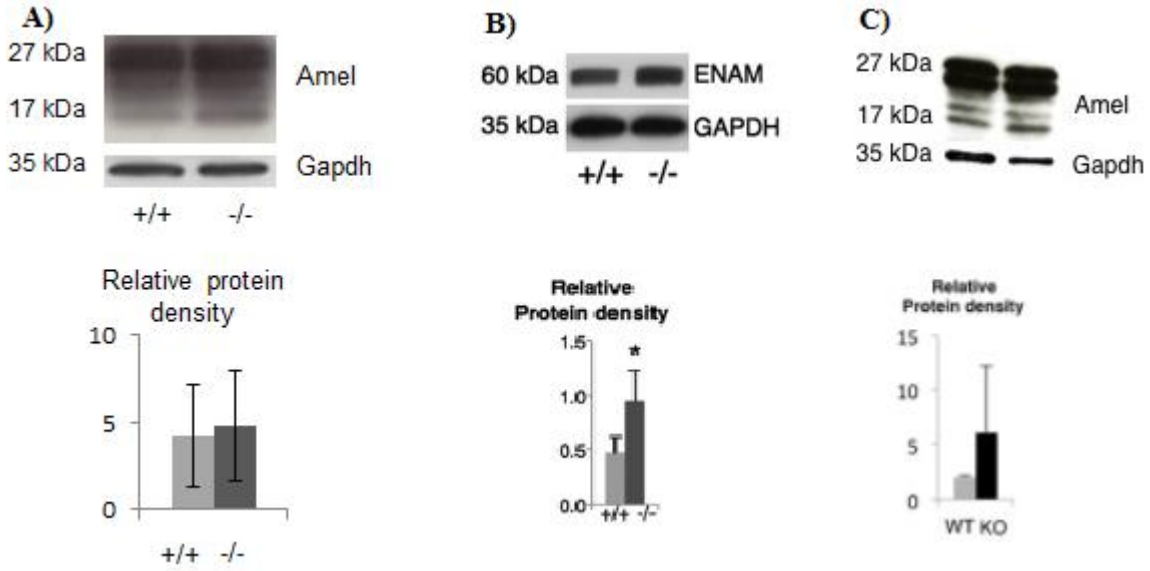



***Figure 45 : Western blot réalisé sur extraits protéiques d'incisive de souris adultes Cldn16$^{-/-}$ comparé au souris sauvage avec anticorps.***
***A) anti-Amelogenine. B) anti-enameline. p = 005 ; n = 10 par groupe. C) Souris adultes Cldn-3$^{-/-}$ comparé aux souris sauvages avec anticorps anti-Amelogenine (n= 3 par groupe).***

### *3.5.4.3 Par immunohistochimie*

Nous avons voulu vérifier de façon qualitative, si la localisation des protéines majeures de l'émail Enamélin et Amelogénine, était modifiée par l'invalidation des claudines en immunohistochimie.

Les résultats obtenus confirment que l'expression des protéines Enam et Amel, est bien localisée au niveau apicale des améloblastes sécréteurs. Cependant, bien que cette technique ne soit en aucun cas quantitative, leur expression ne semble cependant pas modifiée chez les souris KO par rapport aux souris sauvages. Il est cependant intéressant de noter, dans le compartiment supranucléaire des améloblastes, la présence plus importante pour le Ko, de ce qui semble être des vésicules renfermant les protéines de l'email. Ainsi, que ce soit pour la protéine ENAM ou AMEL, ce marquage spécifique n'est pratiquement pas retrouvé chez l'individu sauvage (Fig.46).

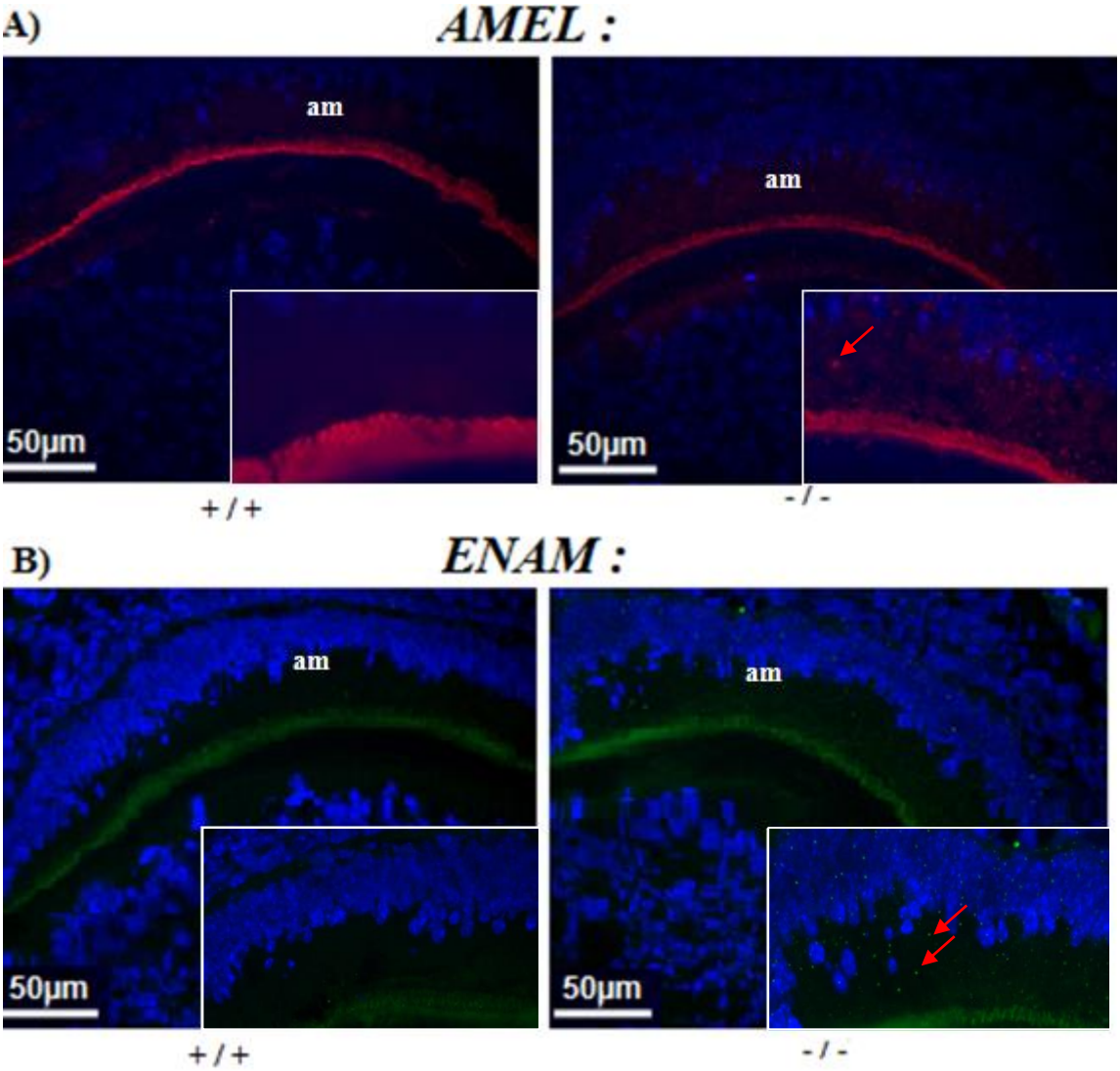



*Figure 46 : Immunohistochimie des protéines Amelogenin et Enamelin sur coupe cryostat d'incisive de souris des souris C57BL/6 sauvages comparée à des Cldn-3 Ko trois jours après la naissance.*
*A) Avec anticorps anti_Amelogenine (en rouge). B). Avec anticorps anti-Enameline (en vert). En bleu coloration des noyaux par le Dapi. Fleche rouge : zone de marquage. am = ameloblastes.*

# 4 Discussion

L'hypomagnésémie familiale avec hypercalciurie et néphrocalcinose (FHHNC) est une maladie héréditaire autosomique récessive rare qui a été investigué pour la première fois en 1999 (Simon et al., 1999).

Jusqu'ici il est communément admis que la FHHNC est associée à des mutations dans CLDN16 et CLDN19. Claudin-16 interagirait avec Claudine-19 pour former des hétéromultimères dans les jonctions serrées dans le tube ascendant de Henle dans le rein et forment des pores impliqués dans la réabsorption paracellulaire du calcium et du magnésium (Hou et al., 2009).

Dans cette étude, l'examen dentaire de 5 patients sans lien de parenté, et présentant une FHHNC due à des mutations du gène *CLDN16* a mis en évidence une AI chez tous ces patients. Alors que l'expression de claudin16 était principalement décrite dans le rein, nous avons recherché et identifié pour la première fois l'expression de *Cldn16* dans les jonctions serrées des améloblastes sécréteurs de germe dentaire par RT-PCR (Fig.34) et immunohistochimie (Fig.46). Les dents de souris étant de bons modèles pour étudier les mécanismes impliqués dans des pathologies dentaires humaines, nous avons utilisé le modèle murin de la pathologie, la souris KO *Cldn16*, afin étudier les effets de la perte de fonction de la protéine.

Nos observations dentaires ont montré un phénotype similaire à celui observé chez les patients. Les souris KO Cldn16 présentaient une perte sévère d'émail révélant sur les molaires la dentine sous-jacente, et un retard de minéralisation de l'émail sur les incisives inférieures (Fig.32).

La souris *Cldn16* $^{-/-}$ reproduisant bien le phénotype humain, nous avons donc recherché les mécanismes à l'origine des défauts de l'émail.

L'analyse par microscopie à transmission des jonctions serrées d'améloblastes sécréteurs montre une altération de la structure de ces jonctions chez les souris KO (Fig.40). Nos résultats suggèrent que les anomalies de l'émail observées chez les patients présentant une FHHNC et les souris *Cldn16* $^{-/-}$ souris ne peuvent pas être attribuées uniquement aux conséquences de la maladie rénale et aux troubles métaboliques qui ont suivi, mais seraient directement liées à la perte de fonction de CLDN16 au sein de l'émail en formation.

Les jonctions serrées ou étanches/imperméables/occlusives (dites zonula occludens) sont impliquées dans le maintien des propriétés des milieux au sein de compartiments donnés, comme par exemple la grande acidité (pH de 1 à 2) de l'intérieur de l'estomac. La structure de la jonction étant altérée dans les améloblastes *Cldn16* $^{-/-}$ nous nous sommes intéressé à l'impact de cette altération sur le pH de la matrice de l'émail en formation. Nous avons mis en évidence que la

mutation de *Cldn16* conduisait à une diminution de 0.3 unité de pH dans la matrice de l'email en formation (Fig.43). Nous savons que la croissance des cristaux d'émail implique une balance entre l'acidification et la neutralisation du pH de l'émail immature, ainsi que l'élimination des fragments protéiques.

Le traitement des protéines de matrice de l'émail par MMP20 et KLK4 est essentielle au processus normal d'amélogenèse. Or l'activité de la MMP-20, qui permet la dégradation des protéines de l'émail est sensible au pH (Fukae et al., 1998). Nous avons mis en évidence par zymographie in situ chez nos souris mutées pour le gène *Cldn16* une diminution significative de l'activité de la MMP20 (Fig.42). La diminution du pH dans la matrice amélaire en cours de formation altérerait donc directement l'activité protéolytique de la MMP20 des souris KO *Cldn16 -/-*.

Dans notre étude, nous avons constaté en Western blot (Fig.45), que synthèse de protéines telles que l'amélogénines et l'énaméline était augmentée. L'expression d'Amelogénin et d'enamelin par hybridation in situ (Fig.44) n'a pas montré de différence entre les individus sauvages et mutés, suggérant donc une accumulation des protéines de la matrice de l'email caractéristique de l'AI.

Grace au modèle KO Claudin-16, nous avons mis en évidence que la perte de la fonction de la proteine affectait la structure et avait un effet sur l'environnement local de l'émail en formation. Afin de mieux comprendre le rôle des claudines au cours de l'amélogenèse, nous avons étudier un deuxième modèle de souris invalidé pour un gène codant pour une autre protéine Claudine, la claudine-3, dont une fonction de barrière et non de pore est décrite dans la perméabilité paracellulaire au niveau de la jonction serrée (Günzel, D. et al; 2013).

L'imagerie obtenue grâce au micro CT m'a permis de mettre en évidence la présence de défauts de l'émail chez la souris KO pour le gène *Cldn3*. J'ai pu mettre en évidence une expression de cette protéine au niveau rénal et mais également à l'extrémité apicale des améloblastes sécréteurs, tout comme pour Cldn16. L'imagerie en TEM (Fig.40) et SEM (Fig.41) montre des résultats très similaires à ceux obtenus avec les souris ko pour le gène *Cldn16*, et soutiendrait l'hypothèse du rôle crucial des Claudines dans l'amélogenèse. Nous avons également pu confirmer sur ce modèle invalidé pour le gène Cldn-3, que la perte de fonction des Claudines entrainait une accumulation des protéines de l'email dans la matrice par analyses Western blot.

À ce jour, aucune maladie humaine n'a été signalée comme étant associée à la mutation *CLDN3*. Il est cependant intéressant de noter que la micro délétion chromosomique sur la région q11.23 d'un des chromosomes 7 humain, observée dans le syndrome de Williams-Beuren, entraine la suppression de plusieurs gènes dont *Cldn3* (Dutra et al., 2011). Etonnamment, cette maladie génétique rare, identifiable dès l'enfance, associe des anomalies dentaires et des désordres rénaux, en plus de malformations cardiaques, retard psychomoteur, dysmorphie du visage, hypercalcémie néonatale (Campos-Lara et al., 2012).

De façon intéressante, en utilisant ces deux modèles, nous avons mis en évidence que la structure des jonctions serrées était affectée par la déficience d'une claudine quelle que soit son rôle (barrière ou pore).

Les claudines sont associées à des protéines telles que ZO1 qui interagit avec la spectrine qui est reliée aux microfilaments d'actine du cytosquelette.

Les jonctions serrées sont requises dans l'établissement et le maintien de la polarité cellulaire. Des études ont émis l'hypothèse que les jonctions intercellulaires constituent un domaine préférentiel d'arrimage des vésicules de transport (Louvard, 1980). De plus, les protéines Rho et de Rac impliquées dans le maintien de l'intégrité des jonctions serrées jouent également un rôle crucial dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Ainsi, la présence de ce qui semblerait être des vésicules renfermant des protéines de l'email observée récemment pour les immunohistochimies chez nos souris invalidées pour les Claudins-16 et 3, pourrait confirmer ces observations. Ce qui mettrait en évidence une éventuelle perturbation du trafic des protéines de l'émail lorsque la structure des jonctions serrées est affectée par la perte de fonction des claudines.

# CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU GENE, TRIP10, IMPLIQUE DANS LA DYSPLASIE DENTINAIRE

## 1 Introduction

### 1.1 Le gène Trip 10

Le gène *Trip* 10 (Thyroid hormone receptor interactor 10) code pour la protéine CIP4 (CDC42-interacting protein 4). Elle est un membre de la famille des protéines à domaine F-BAR (Fes / CIP4 homologie-Bin / Amphiphysin / Rvs), qui fait elle-même partie de la super famille du domaine BAR (Bin / Amphiphysin / Rvs).

La localisation subcellulaire de CIP4 est la suivante : membrane cellulaire (Liu et al., 2015), cloche de phagocytose (Dombrosky-Ferlan et al., 2003), cytosquelette (Aspenström, 1997), cortex cellulaire (Leibfried et al., 2008), lysosome (Hu et al., 2009), appareil de Golgi (Larocca et al., 2004). Cette protéine serait requise dans de nombreux processus, notamment pour la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmatique en réponse à la signalisation de l'insuline. Sa translocation vers la membrane plasmique en réponse à la stimulation par l'insuline, pourrait nécessiter l'activation de RHOQ « *Ras Homolog Family* Member Q » (Cheng et al., 2005) (Saltiel and Pessin, 2003).

CIP4 favoriserait l'invagination de la membrane et la formation de tubules (Itoh et al., 2005). Elle coordonnerait la polymérisation de l'actine qui entrainerait la fission des tubules membranaires pour former des vésicules d'endocytose. En effet, cette protéine possède un domaine F-BAR (Bin–Amphiphysin–Rvs F). C'est ce domaine hautement conservé, constituant un dimère (Figure 47.A). Frost *et al.* (2008) ont montré que seulement 10 acides aminées sont localisé dans les sites de liaison entre le domaine F-BAR et la membrane cytoplasmique (Fig.47.B).

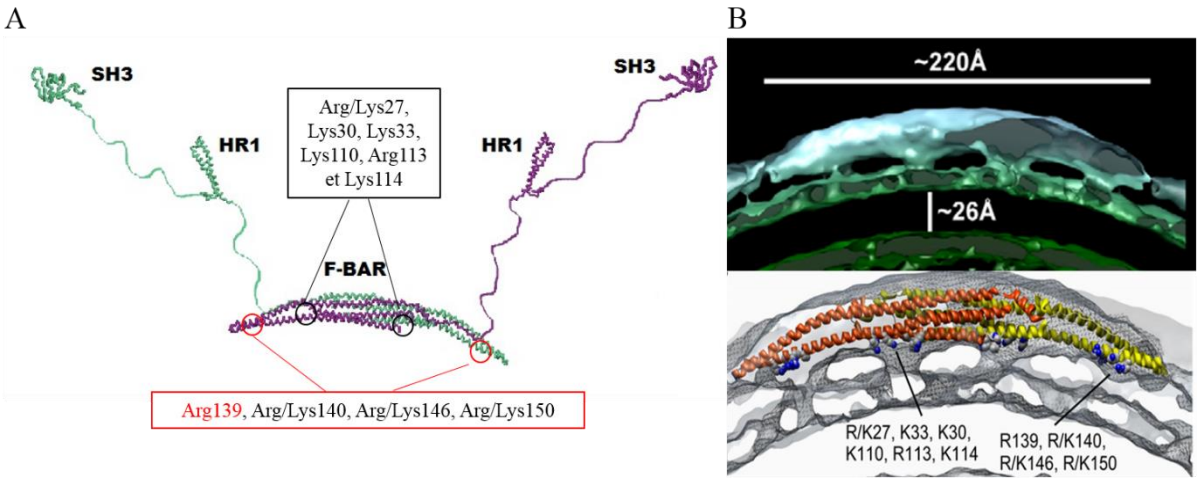



*Figure 47 : TRIP10*
*(A) Représentation de la structure quaternaire du TRIP10 (homodimère), (B) Image de microscopie cryo-électronique du domaine F-BAR et de la membrane cytoplasmique. Les acides aminés qui sont responsables de cette liaison sont présentés en couleur bleu dans la représentation schématique en bas (Frost et al. 2008).*

Ce domaine se lie avec la membrane cytoplasmique, ce qui initierait la courbure de la membrane (Liu et al., 2015) et la scission de la vésicule d'endocytose dépendante de la clathrine, par le domaine d'interaction entre SH3 (pour SRC Homology 3 Domain) et des protéines partenaires (Fig.48).

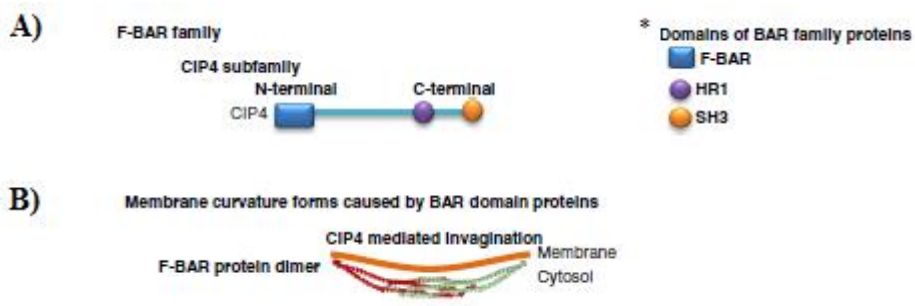



*Figure 48 : F-BAR*
*a) Structure du domaine F-BAR. b) Courbure de la membrane causée par les protéines du domaine F-BAR (D'après Liu et al., 2015).*

Ce processus entraînerait des changements dynamiques de la membrane et serait impliqué dans diverses fonctions biologiques cellulaires importantes (Fig.49.B), comprenant l'endocytose, mais également la phagocytose, la formation de filopodes, lamélipodes, la cytokinèse, l'adhérence, et la formation de podosomes, par l'intermédiaire de voies de signalisation distinctes

déterminées par des domaines de liaison spécifiques aux protéines partenaires (Fig.49.A).

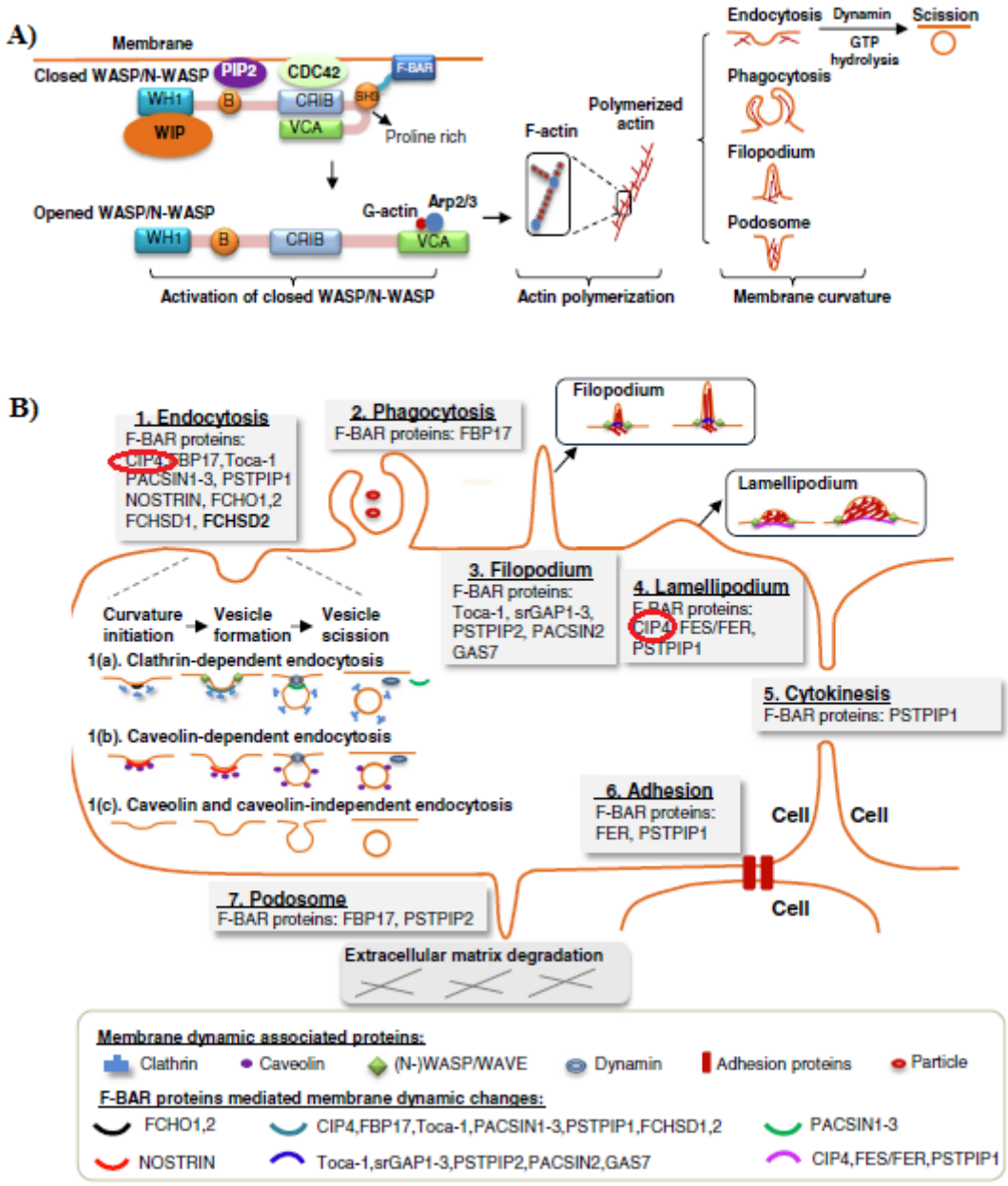



*Figure 49 : Fonctions biologiques F-BAR*
*A) Les différents intervenants dans le mécanisme de changement dynamique des membranes. B) L'accrochage de Cip4, protéine du domaine F-BAR, à la membrane cellulaire participerait à d'endocytose et la formation des lamellipodes (D'après Liu et al., 2015)*

La protéine WASP (pour protéine du syndrome de « Wiskott-Aldrich ») serait recrutée, via le domaine SH3 à l'extrémité C-terminale pour se lier à la dynamine GTPase et lancer la scission de la vésicule d'endocytose dépendante de la clathrine (Figure 57). En outre, il a été montré que Cdc42 interviendrait, avec Par6 et des protéines contrôlant la polymérisation de l'actine comme Wasp et Arp2/3, son partenaire Cip4 et la dynamine, dans la scission des vésicules lors de l'endocytose d'E-cadherin (Leibfried et al., 2008 ; Georgiou al., 2008). Grâce à ce domaine SH3,

CIP4 interagirait également avec ces protéines riches en proline tels que WASP, neural (N) – WASP, WAVE (pour WASP-family verprolin-homologous *protein)*, afin d'entrainer des changements de conformation de ces protéines, conduisant à la polymérisation de l'actine. Cette polymérisation provoquerait diverses courbures de la membrane cellulaire, induisant alors le trafic endosomal, et la formation de filopodes.

## 1.2 Implication du gène *Trip* 10 dans la forme autosomique récessive de la DD-I

Cherkaoui J. *et al.,* (2013) rapporte qu'une famille marocaine présentant une dysplasie dentinaire de type I avec microdontie qui touche les racines est clairement transmis sous un mode autosomique récessif (Fig.50). Quatre des membres de la famille, nés de parents apparentés sains, sont porteurs de caractéristiques typiques de la dysplasie dentinaire de type I. Les auteurs ont exclus le principal gène causal *DSPP*, tout comme le gène *SMOC2* qui a récemment été identifié (Bloch-Zupan et al., 2011b) comme un gène responsable de cette maladie avec une microdontie et déformation des dents**.**

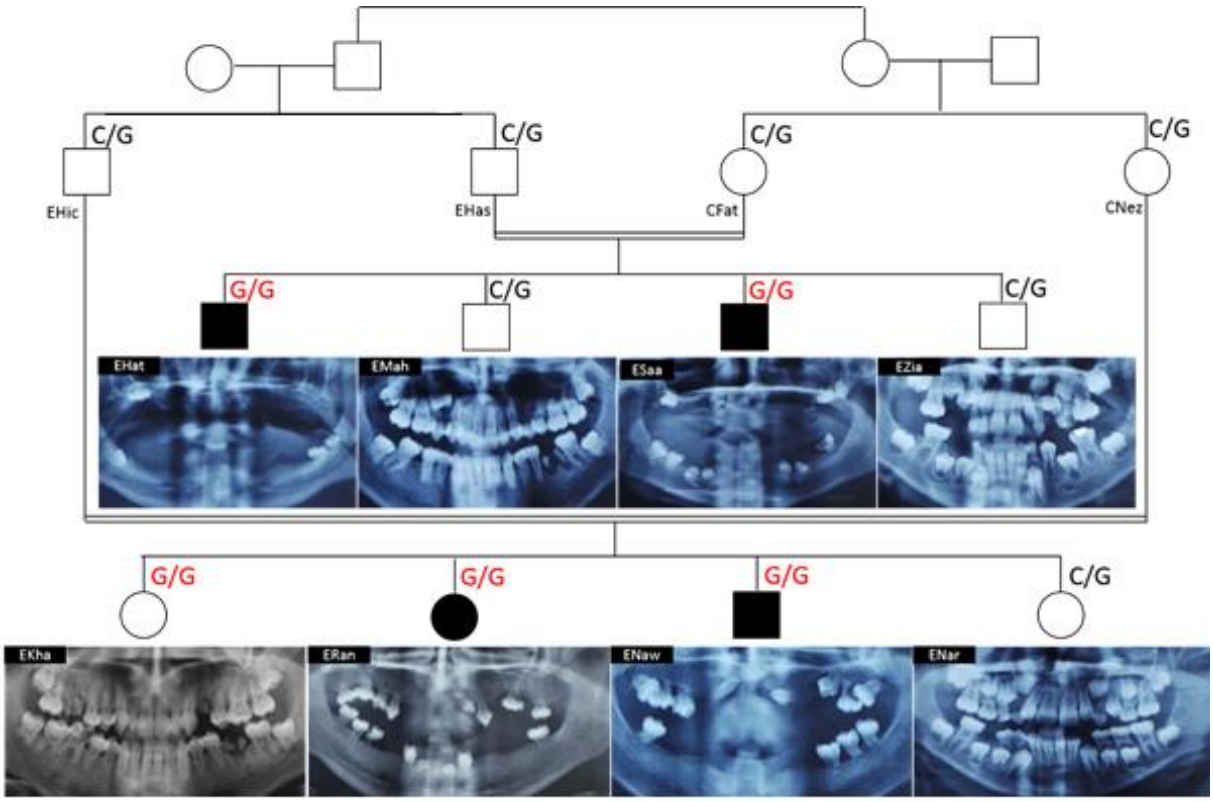



***Figure 50 : Arbre généalogique de la famille dont certains membres sont atteints par la dysplasie dentinaire de type I avec les radios panoramiques et le génotypage du variant c.415C>G du gène TRIP10.***

Cette famille représente une nouvelle description du mode autosomique récessif de la dysplasie dentinaire de type I, décrite pour la première fois.

Deux membres de la famille qui appartiennent à deux fratries différentes (ESaa et ERan, Figure 1) ont fait l'objet d'une approche de cartographie par homozygotie en utilisant une puce SNP.

Dans le but de déterminer la variation responsable de la maladie, un patient atteint de la première fratrie (ESaa) a été sélectionné pour un séquençage de l'exome (Cherkaoui Jaouad et al., 2013). L'analyse des résultats a abouti à mettre en évidence la variation c.415C>G du gène *TRIP10* qui se trouve dans un acide aminé conservé (Arg139). Les patients atteints sont homozygotes G/G et les patients sains sont hétérozygotes C>G sauf pour la patiente EKha qui est homozygote G/G avec un phénotype qui ressemble au patients non atteints (Fig.50). Cela nous permet de proposer une pénétrance incomplète de cette maladie chez la famille étudiée. Cette variation se trouve sur l'Arg 139, acide aminé substitué en Gly chez les patients atteints de la famille étudiée dans le domaine F-BAR de la protéine TRIP10 (Fig. 47).

Notre hypothèse vise à déterminer si le variant pArg139Gly altère la liaison du domaine F-BAR de la protéine TRIP10 avec la membrane cytoplasmique dans le but de proposer une piste permettant d'expliquer les manifestations dentaires.

# 2 Matériel et méthodes

## 2.1 Les patients

L'arbre généalogique (Fig.51) et l'histoire de la famille suggère une transmission autosomique récessive de cette forme de dysplasie.

L'examen clinique du patient III.1 (Fig.52.A), complété par une radiographie panoramique (Fig.52.B) révèle les traits caractéristiques d'une DDI, avec un aspect normal de la couronne, une perte précoce des dents primaires conduisant à une édentation et des racines courtes et une mobilité sévère pour les dents résiduelles.

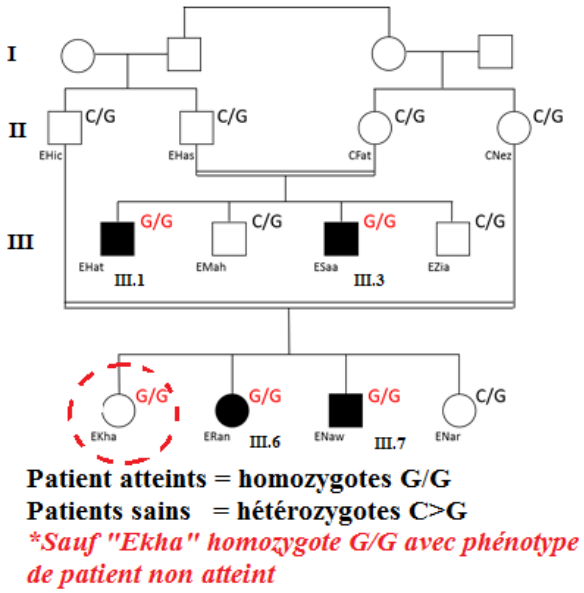



*Figure 32 : Représentation généalogique de la famille étudiée.*

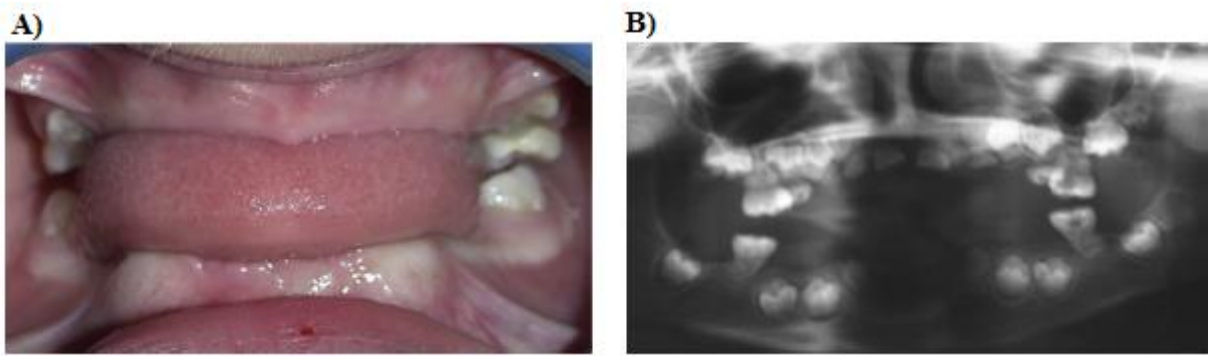



*Figure 52 : Phénotype dentaire du patient III.1 âgé de 10 ans.*
*A) Photographie orale. B) Radiographie panoramique*

## 2.2 Les techniques utilisées

### 2.2.1 Analyse micro CT d'une dent d'un des patients

La molaire d'un patient est recueillie après extraction au cours du traitement orthodontique avec son consentement selon les directives éthiques fixées par la loi française et avec une autorisation spécifique pour notre équipe (n°DC- 2009-927, Cellule Bioéthique DGRI / A5, Paris, France).

La dent a été numérisée à l'aide d'un dispositif à rayons X Micro -CT- haute résolution (Quantum FX Caliper Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA). Les acquisitions sont réalisées avec une taille de voxel de 20 µm (90 kV, 160 mA, 180s). Le rendu Tridimensionnel est ensuite réalisé en utilisant le logiciel open-source OsiriX imagerie (v3.7.1, distribué sous licence LGPL, Dr A. Rosset, Genève, Suisse).

### 2.2.2 Extraction des ARN totaux et RT-PCR

Se référer au chapitre 2 (2.2 p43).

L'estomac, le cœur ainsi que les germes de molaires de souris sauvages J3PN (n=3) sont récupérés et les ARN totaux extraits.

Pour l'amplification par PCR, des amorces sont définies afin d'amplifier les régions spécifiques du gène Trip10 humain et murin recherchés (Tableau 7). Les cycles de PCR consistent en une étape de pré-incubation initiale (94°C pendant 5 min), suivi par 28 cycles d'amplification (94°C pendant 30 s, 55°C pendant 45 s, 72°C pendant 30 s).

| Nom gene | N° Sequence reference NCBI | Primer Sens | Primer Antisens | Taille amplicon |
|---|---|---|---|---|
| *Trip10m* | Variant 1 : NM_001242389.1<br>Variant 2 : NM_001242390.1<br>Variant 3 : NM_134125.4<br>Variant 4 : NM_001242391.1 | 5'AGCAGAGAAAGC GACTTCAG3' | 5'TTGTCCTGGGAT CCACTGTT 3' | 380pb |
| *Trip10h* | Variant 1 : NM_001288962.1<br>Variant 2 : NM_004240.3<br>Variant 3 : NM_001288963.1 | 5'GTCCAAATTCAGC CAGCAAC 3' | 5'TTGGCTATTATG GGCACCAC 3' | 549pb |

*Tableau 7 : Séquences des amorces utilisees pour amplifier l'ADNc.*

### 2.2.3 Analyse de l'expression des ARNm Trip10 par Hybridation in situ

Se référer au chapitre 2 (2.3.3 p47).

Les extractions d'ARN sont effectuées à partir de germe de molaire J3PN de souris sauvages C57.

Les sondes d'ARN sont synthétisées par amplification par PCR de l'ADNc en utilisant des primers spécifiques de la séquence du gène Trip10 murin auxquels j'ajoute à chaque extrémité les séquences du promoteur (Tableau 8) :

Sp6 pour le primer Forward afin de générer la sonde sens 5' → 3'.

T7 pour le primer Forward afin de générer la sonde antisens 3' → 5'

| Nom gene | Expression | Primer For<br>Sens 5' → 3' | Primer Rev<br>Sens 3' → 5' | Taille amplicon |
|---|---|---|---|---|
| Trip10m | germe | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur Sp6<br>5'ATTTAGGTGACACTATAG AGCAGAGAAAGCGACTTC AG3' | Primers pour amplification du cDNA par PCR avec primers contenant le promoteur T7<br>5'TAATACGACTCACTATAGG GTTGTCCTGGGATCCACTGT T3' | 380pb |

*Tableau 8 : Récapitulatif des sondes synthétisées.*

Dans le but d'augmenter le niveau du signal en hybridation in situ, un Ac secondaire, dirigé contre l'Anticorps anti DIG UTP lui-même couplé à la phosphatase alkaline est ajouté dilué au 1/4000$^{ème}$ dans MABT et 2% Blocking Reagent (sans sérum de chèvre ni BSA) puis incubé durant une heure à température ambiante.

### 2.2.4 Culture de cellules souche de pulpe dentaire humaine (hDPSC)

Les cultures de cellules souches pulpaires humaines sont issues de la mise en culture de la troisième molaire d'un patient sain. Ces cellules m'ont été fournies au 3$^{ème}$ passage (au-delà du 5$^{ème}$ passage elles perdent leur potentiel de différenciation et dérivent vers un phénotype fibroblastique) à 37°C avec 5 % de CO2 dans du milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) avec 1 g de glucose / litre, supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin et 1% de pénicilline/streptomycine.

### 2.2.5 Transfection transitoire sur cellules hDPCS d'un plasmide contenant le gène Trip10 muté

La construction du vecteur plasmidique GFP-TRIP10 (Fig.53) a été fournie par le Pr. James R. Goldenring (École de médecine de l'Université Vanderbilt, Nashville, États-Unis). Cette construction a été élaborée de la manière suivante : la séquence complète du cDNA de TRIP10 qui avait été clonée dans le plasmide pRK5, comme décrit dans l'article de (Tian L. et al. 2000), a été utilisée comme matrice pour cloner TRIP10 dans le vecteur pEGFP-N1 (Clontech) en utilisant les sites de restriction enzymatiques EcoR1 et SalI fusionné à l'extrémité N-terminale de la GFP (green fluorescent protein). Par la suite, à partir de cette construction, une mutation sur le gène Trip 10 sauvage (415C> G) a été introduite par la technique de mutagenèse dirigée par PCR classique. Les constructions contenant la version sauvage et mutante de GFP-TRIP10 m'ont été fournies amplifiées et purifiées.

Elles sont exprimées chez les cellules DPSC humaines par transfection transitoire de 20,5 µg d'ADN plasmidique en utilisant 8µl Lipofectamine LTX (Invitrogen par Life Technologies) en suivant les instructions du fabricant (fig.54) après optimisation des conditions de transfections.

Les cellules sont transfectées à 70% de confluence dans des puits de 35mm puits et la fluorescence est détectée 24 heures après en utilisant un microscope confocal « IX 81 Spinning disque microscope confocal » (OlympusZeiss) à l'objectif 63X. Les acquisitions sont faites avec ORCA R2 (HAMAMATSU). Des paramètres d'imagerie identiques sont utilisés pour toutes les acquisitions. L'analyse de l'intensité de fluorescence est réalisée à l'aide de «ImageJ homemade routines « (http://imagej.nih.gov/ij/). Des niveaux de seuil identiques sont utilisés pour les images réalisées sur les transfections de plasmide sauvages et mutants.

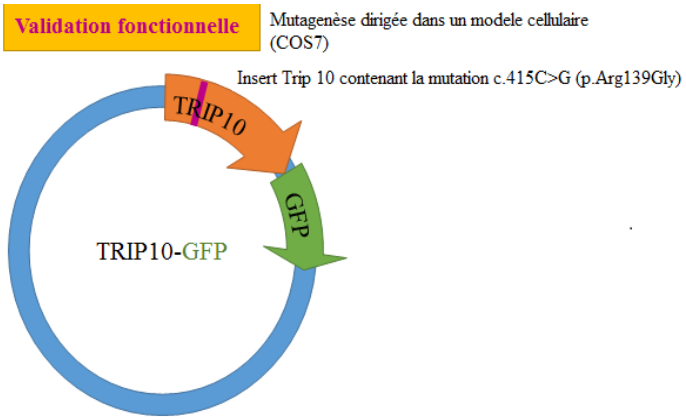



*Figure 53 : Représentation schématique du vecteur plasmidique Plasmide : pEGFP-N1-TRIP10. (Pr James Goldenring (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN, USA) transfécté dans les cellules DPSC humaines*

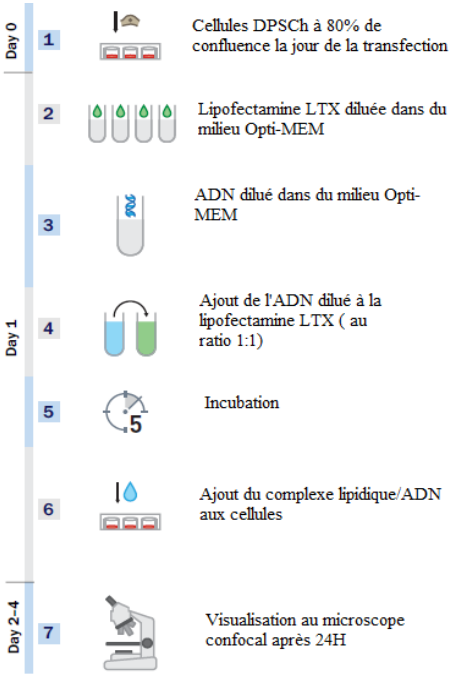



*Figure 54 : Représentation schématique du protocole de transfection avec la lipofectamine LTX.*

### 2.2.6 L'immunohistochimie sur cellules hDPCS

L'immunofluorescence est réalisée sur dDPSC humaine afin de détecter la protéine Trip 10.

Pour cela les cellules sont cultivées sur des lamelles. Après rinçage au PBS1X, elles sont fixées avec 4 % de formaldéhyde 15 minutes.

Après rinçage dans du PBS, je bloque ensuite la fixation non spécifique des anticorps aux tissus par incubation à température ambiante pendant 60 min dans 10% de sérum de chèvre et 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) dans du PBS. Je procède ensuite à l'incubation avec

l’anticorps monoclonal de lapin Trip10 (anti-cip4 réf. ab108313 Abcam) à 1/100, une nuit dans une chambre humide à 4°C. Après rinçage au PBS, les lames sont ensuite incubées pendant 60 min en chambre humide à l’obscurité avec anticorps secondaire de chèvre anti - Ig G de lapin couplé à l’Alexa Fluor (réf. A21429 Invitrogen) au 1/500 PBS contenant 1% de BSA.

Pour exclure une liaison non spécifique, les contrôles sont effectués en omettant l'anticorps primaire. Enfin, après rinçage au PBS 1X et coloration DAPI pour marquer les noyaux par une incubation 10min à température ambiante, les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle au Mowiol (permet conserver la fluorescence dans le temps).

# 3 Résultats

## 3.1 Analyse de la dentine de patients par imagerie en micro tomographie à rayon X

Afin vérifier si des modifications anatomiques de la dentine et des racines étaient induites par la mutation, nous avons caractérisé par analyse micro CT la structure dentinaire de dents de patients atteints par la mutation Trip10

L'analyse micro CT révèle une dentine fortement endommagée au niveau de la couronne et des racines anormalement courtes (Fig.55). Ces données suggèrent que la dentine et l'ancrage de la dent dans le parodonte ont été modifiés chez les patients homozygotes pour la mutation TRIP10 Arg139Gly.

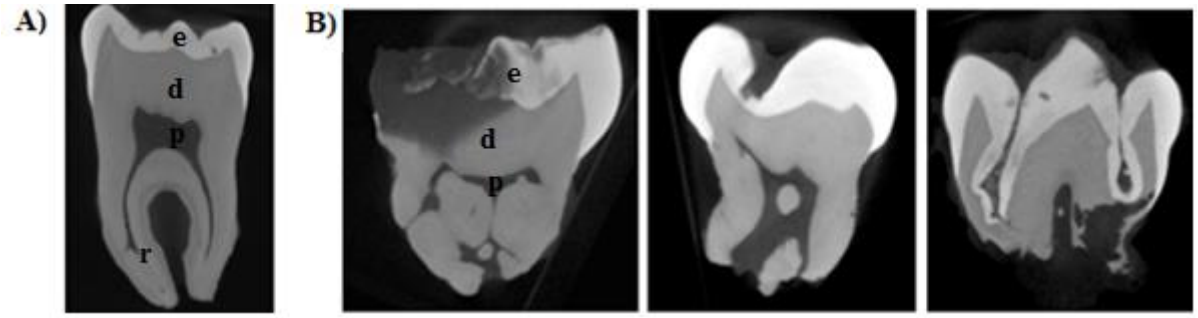



*Figure 33 : Phénotype dentaire de la molaire de patients Trip10 par imagerie au micro CT. A) Patient sain B) Atteint par la mutation Trip10 par imagerie au micro CT. e = émail ; d = dentine ; p = pulpe ; r = racine.*

## 3.2 Analyse de l'expression de TRIP10 dans la dent

### 3.2.1 Analyse de l'expression Trip10 par RT- PCR

J'ai voulu vérifier l'expression de Trip 10, que ce soit pour la dent humaine ou chez la souris (puisque ce modèle est ensuite utilisé pour l'analyse en hybridation in situ. En effet, les coupes en cryostat seront plus aisées sur des dents de souris non décalcifiées plutôt que des dents humaines nécessitant une décalcification et par conséquent des risques de décollement des tissus augmentés en hybridation in situ, avec les nombreuses étapes d'incubation en bain à des températures élevées).

Trip 10 est connu être fortement exprimé dans le cœur chez la souris, je l'utilise donc comme témoin positif.

Il n'est pas exprimé dans l'estomac, qui me sert de contrôle négatif.

L'expression de l'ARNm de Trip10 par RT-PCR est confirmée aussi bien dans la dent humaine, (au niveau de la pulpe et de la racine), que sur le germe dentaire murin (Fig.56).

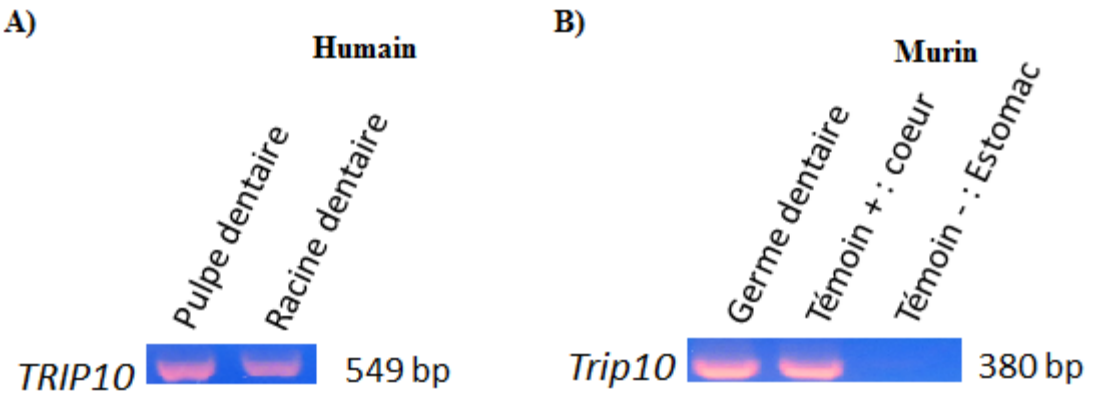



*Figure 56 : Expression de Trip10 par RT-PCR réalisée sur différents tissus.*
*A) humains (dent patient sain) B) De souris sauvage C57.*

### 3.2.2 Analyse de l'expression par Hybridation in situ

J'ai voulu étudier la localisation de l'expression de Trip10, au niveau du transcrit, par hybridation in situ. L'ARN messager de Trip10 a été localisée dans les odontoblastes et la gaine épithéliale de Hertwig dans le germe de souris sauvage C57 (Fig.57). Trip 10 est donc bien exprimé pendant la formation de la racine dentaire.

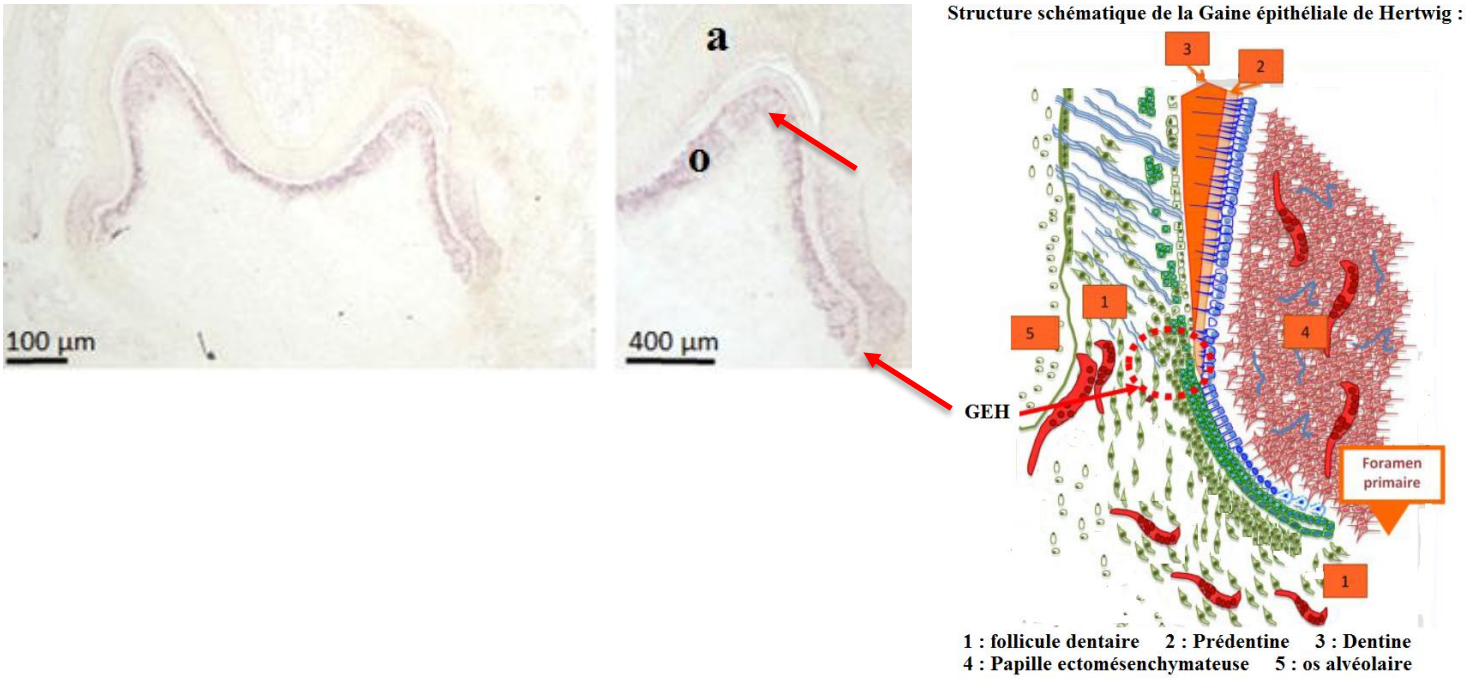



*Figure 57 : HIS coupes frontales cryostats mandibule sur des souris C57BL/6 sauvages deux jours après la naissance. Fleche rouge : localisation des ARNm de Trip10.*
*a = ameloblastes. o = odontoblastes.*

## 3.3 Effet de la mutation p.Arg139Gly sur la protéine Trip10

### 3.3.1 Localisation de la protéine Trip 10 sauvage par immunohistochimie sur cellules DPSCh sauvages

Afin de confirmer la localisation de la protéine Trip10 sur notre modèle cellulaire, nous avons réalisé une immunohistochimie. Le marquage nucléaire au dapi permet de mettre en évidence les noyaux cellulaires.

Localisation de la protéine est observée au niveau du cytosquelette et des filopodes des DPSCh (Fig.58).

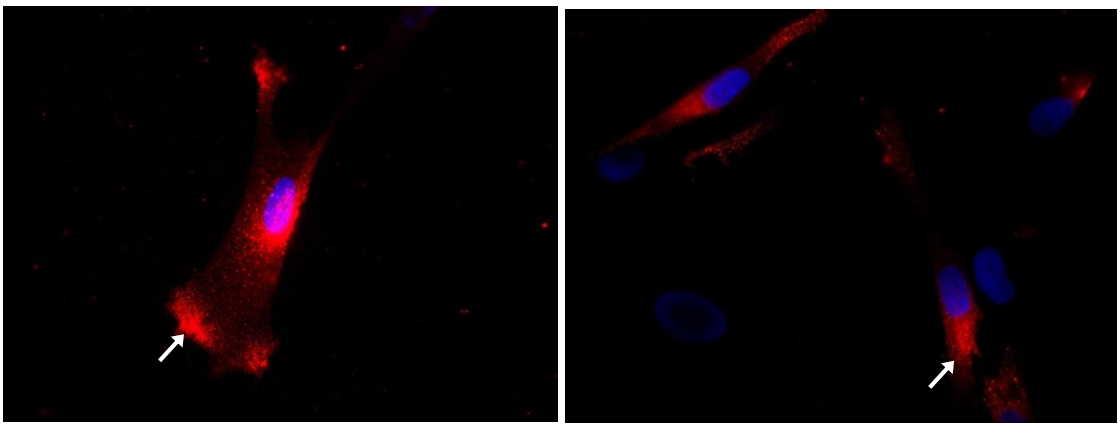


*Figure 58 : Immunohistochimie sur cellules DPSCh sauvages (cellules souches de la pulpe dentaire humaine). Avec anticorps anti-Trip10 (en rouge). En bleu coloration des noyaux par le Dapi. Fleche blanche : zone de marquage.*

### 3.3.2 Localisation de la protéine Trip 10 après transfection de la version sauvage et mutée de Trip 10 sur cellules DPSCh

Afin d'évaluer l'implication potentielle de la mutation sur la délocalisation de la protéine à la membrane, j'ai réalisé des transfections transitoires de la version mutée et sauvage de Trip 10 dans les cellules souches de la pulpe dentaire.

Pour les cellules DPSCh transfectées avec la forme sauvage, la localisation de la protéine est retrouvée au niveau du cytosquelette et des filopodes alors que pour la forme mutée la localisation est complétement perturbée et semble d'avantage nucléaire (Fig.59). Ce qui suggère donc que la surexpression de la forme mutée du gène Trip 10 après transfection transitoire sur des cellules DPSCh altère nettement la localisation de la protéine.

Nous démontrons pour la première fois sur des cellules souches de la pulpe dentaire l'abolition de la localisation membranaire de la protéine liée à la mutation p.Arg139Gly. Résultats obtenus par Frost et al, en 2008, sur des cellules COS7 montrant cette même abolition liée à une mutation de la protéine Cip4.

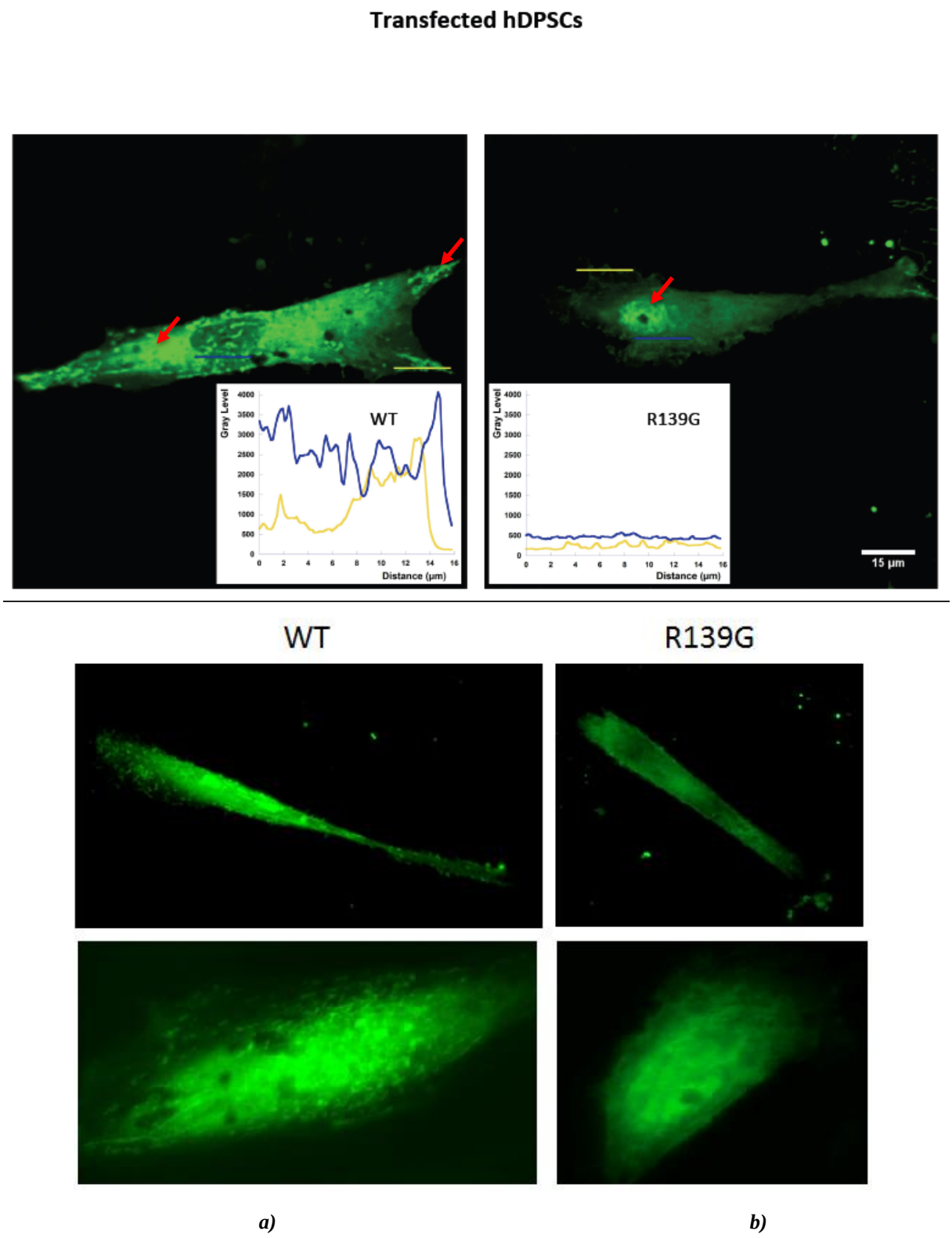



*Figure 59 : Localisation de la protéine Trip 10 après transfection de la version sauvage et mutée de Trip 10 sur cellules DPSCh.*
*a) Après transfection du plasmide contenant la forme sauvage du gène Trip 10 il y a formation tubulaire homogène et localisation membranaire de la protéine. b) Après transfection du plasmide contenant la forme mutée du gène Trip 10 il y a altération de la formation tubulaire et modification de la localisation de la protéine.*

# 4 Discussion

La DD-I est une maladie héréditaire autosomique dominante rare qui porte gravement atteinte à la formation de la dentine au niveau des racines dentaires, ce qui provoque la perte de dents. Jusqu'à présent seule des mutations sur la protéine SMOC2 (qui régulerait les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire et jouerait un rôle majeur dans le développement dentaire) avait été rapportée dans des cas de DD-I, selon un mode de transmission autosomique récessive inhabituelle associée à une microdontie et des dents difformes dans une famille hautement consanguine (A. Bloch-Zupan et al., 2011).

Pour ce projet, nous avons identifié un nouveau gène impliqué dans la DD-I, le gène TRIP10, en identifiant une mutation homozygote 415C> G (p.Arg139Gly) dans une grande famille consanguine marocaine. Cette variation c.415C>G du gène *TRIP10*, se trouve dans un acide aminé conservé (Arg139) pour lequel 2 logiciels de prédiction *in silico* (SIFT et PolyPhen) suggère un effet délétère de la protéine.

Afin d'élucider l'effet de cette substitution sur le gène TRIP10, j'ai donc comparé la localisation de la protéine TRIP10 mutée et fusionnée à la GFP, à la localisation de la protéine sauvage dans les cellules hDPSC. J'ai montré que la mutation Arg139Gly semblait abolir la localisation membranaire de la protéine TRIP10 (figure 58B). Il serait intéressant de confirmer ces observations, par des techniques de colocalisations par exemple, avec des anticorps spécifiques de la membrane cellulaire, tel qu'un anticorps anti_STRO1 ou CD146, sur nos cellules transfectées. Un fractionnement subcellulaire par centrifugation en gradient de densité (sucrose par exemple) sur nos cellules transfectées sauvages comparées aux mutées, nous permettrait de regarder si nous parvenons encore à détecter Trip 10 dans une fraction membranaire de nos cellules mutées.

Nous avons vu que CIP4 jouerait un rôle clé dans la régulation la courbure de la membrane cellulaire (Liu et al., 2015) et que la capacité de la membrane cellulaire à atteindre ces dynamiques est serait fortement déterminée par la collaboration entre le cytosquelette d'actine et les protéines en interaction avec la membrane (figure 48).

Nous avons pu démontrer par immunohistochimie sur cellules DPSCh sauvages la localisation de la protéine CIP4, au niveau du cytosquelette et des filopodes des DPSCh.

Dans une étude de Tsuji E et al, en 2006, il a été rapporté que CIP4 pourrait jouer un rôle déterminant dans l'adhérence cellule-cellule médiée par la β-caténine. En effet, un variant d'épissage alternatif de la protéine CIP4, a pu être identifié chez les patients atteints d'un carcinome à cellules rénales. Ce variant code pour un codon d'arrêt prématuré, qui entraînerait la

formation d'agrésomes ubiquitinylées et la perte du site de phosphorylation de la tyrosine de la β-caténine, proposée comme un mécanisme de régulation de la stabilité des jonctions adhérentes cellules – cellules. Il serait donc intéressant de regarder si le transport des β-caténine, de la membrane cellulaire vers les agrésomes cytoplasmiques (de Tsuji E et al, 2006), serait également endommagé dans le cas d'une mutation Arg139Gly de Trip 10, et pourrait avoir un impact sur la formation de la dentine au niveau des racines en induisant de ce fait une DDI.

D'autant plus que dans la littérature, il a été montré que la ß-Caténine serait impliquée dans la formation de la dentine (Kim et al. 2011; Bae et al. 2013) en particulier au niveau des racines (Kim et al. 2013). De façon intéressante, nos résultats mettent en évidence l'expression de *Trip10* spécifiquement localisée dans les odontoblastes et la gaine de Hertwig par hybridation in situ. Nous avons également identifié l'expression de l'ARNm de TRIP10 dans la pulpe dentaire humaine ainsi que dans la racine dentaire humaine par RT-PCR.

La formation des racines est liée à la gaine épithéliale de Hertwig, qui est un élément central de l'édification radiculaire. Il a été montré que la voie de signalisation Wnt / β-caténine dans le mésenchyme dentaire pourrait être essentielle pour la formation des racines et que l'inactivation de la β-caténine dans les odontoblastes en développement produit des molaires dépourvues de racines et incisives excessivement minces (Kim et al., 2013). De plus, d'autres études montrent que la stabilisation constitutive de la β-caténine dans le mésenchyme dentaire, liée à l'activation de la signalisation médiée par SMAD4 (Son of Mothers Against Decapentaplegic protein 4), conduit à la formation de racines anormalement courtes avec un cément épais associée à une différenciation des odontoblastes et une homéostasie du phosphate perturbées (Bae CH et al., 2013). La signalisation épithéliale SMAD4 serait également essentielle pour l'élongation HERS et régulerait le sort du mésenchyme dentaire. Cette étude souligne la complexité de ce dialogue moléculaire entre la voie de signalisation Wnt / β-caténine et les autres voies mentionnées et leur rôle majeur dans la formation des racines.

Nos résultats suggèrent ainsi un mécanisme potentiel de dérégulation la localisation membranaire de la protéine TRIP10 dans un cas DD-I récessive, induit par le variant de la protéine CIP4. Aujourd'hui afin d'investiguer plus avant sur l'implication de la mutation dans la dérégulation de la voie Wnt / β-caténine, il nous faudrait envisager par exemple de réaliser de la RT-PCR quantitative sur nos cellules transfectées et de regarder l'impact de la mutation sur l'expression de gènes tels que Ctnnb1 (Catenin Beta 1) gène codant pour la β-caténine, ou Axin2, Wnt10a tous deux intervenants dans la voie wnt et connus pour être impliquées dans la maturation des odontoblastes et la formation des racines (Bae et al. 2015). Il serait intéressant de

compléter nos données par de l'immunocytochimie en utilisant des anticorps dirigés contre la β-caténine ou Wnt10a sur nos cellules transfectées, et en immunohistochime sur des coupes réalisées sur des souris mutées c.415C>G sur le gène *TRIP10*.

Enfin, le modèle murin dont nous ne disposions pas pour cette étude, est une approche complémentaire, qu'il faudrait envisager pour la suite de ce travail.

# CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de mettre en évidence l'implication de deux gènes dans deux pathologies dentaires affectant la minéralisation de la dent, et cela, sur deux tissus différents : l'émail et la dentine. Ces tissus sont très complémentaires, puisqu'ils interagissent à la jonction email-dentine. Lors de l'odontogenèse les odontoblastes sécréteurs déclencheraient l'amelogenèse, l'améloblaste pré-sécréteur pouvant devenir sécréteur et sécréter la première couche d'émail au contact de la dentine.

Mais du fait leur origine embryologique différente, l'épithélium odontogène (dérivé de l'ectoderme pour l'émail) et le mésenchyme (dérivé des crêtes neurales céphaliques) pour la dentine, les mécanismes de formation de l'émail et la dentine sont cependant spécifiques.

Il était très intéressant pour moi de pouvoir travailler sur ces deux types de tissus dentaires minéralisés pour lesquels j'ai pu adapter différentes démarches expérimentales.

La première démarche a associé une étude *in vivo* au diagnostic clinique, en bénéficiant d'un modèle murin de pathologie humaine pertinent, souris cldn16 -/-. Cette première partie de mon projet a permis d'étudier plus en profondeur les mécanismes impliqués dans des anomalies de formation de l'émail, afin de d'expliquer l'AI diagnostiquée chez des patients atteints de FHHNC dues à des mutations du gène *CLDN16.* De plus, c'est la première fois qu'une protéine de jonctions serrées est mise en cause dans une pathologie dentaire. Nos résultats suggèrent que la perte de fonction de Claudine-16, en modifiant des facteurs extracellulaires tels que le pH, altèrerait l'activité enzymatique de la MMP-20 affectant ainsi le traitement des protéines de la matrice de l'émail et la formation de l'émail. Ce mécanisme expliquerait les défauts observés à la fois chez les patients atteints de FHHNC et les souris *Cldn16* $^{-/-}$. Il serait intéressant de réaliser des analyses complémentaires et d'étudier plus en détail la perméabilité paracellulaire et le transport transcellulaire, en particulier les protéines impliquées dans le transport du bicarbonate et la régulation du pH, pour comprendre les mécanismes impliqués dans la diminution de pH chez la souris *Cld16*$^{-/-}$.

Afin d'étudier le transport transcellulaire de l'ion H + dans l'épithélium de l'émail des souris déficientes en claudines, nous sommes actuellement en train d'étudier en Western blot, le niveau d'expression de transporteurs ioniques telles que la V-ATPase. Cette enzyme est en effet connue pour intervenir dans l'acidification de la matrice extracellulaire en libérant des protons

au niveau du pole apical des améloblastes (Josephsen et al., 2010). De plus, nous envisageons d'étudier l'activité de cette pompe à proton en utilisant un inhibiteur de cette pompe, la vinblastine, qui a été montré comme dérégulant le pH de l'émail en surface durant la maturation dans les ameloblastes chez le rat (Damkier et al., 2014).

La microdissection laser, est également une technique envisagée afin de réaliser des transcriptomes et étudier l'expression des gènes impliqués dans la régulation du pH qui serait modifiée par l'invalidation du gène Cldn16. Ces résultats nous permettront d'identifier des nouvelles cibles impliquées dans ces mécanismes.

D'un point de vue clinique, nos travaux ont permis d'associer l'AI à l'FHHNC, et de souligner l'importance d'un suivi dentaire précoce et rigoureux pour les enfants atteints de FHHNC mais aussi de toutes maladies génétiques affectant la fonction rénale. Suite à notre travail, Yamaguti et al. (2017) a mis en évidence une association de l'AI à la FHHNC chez des patients porteurs d'une mutation sur CLDN19. Ce travail va permettre aux praticiens une meilleure prise en charge du patient (réhabilitation esthétique, restauration de l'efficacité masticatoire, prise en charge de la douleur dû par exemple à une hypersensibilité dentaire liée à l'AI) et de mettre en place des moyens préventifs (scellement des sillons, apport de fluor pour prévenir des caries), améliorant ainsi la préservation du capital dentaire. De plus, cette prise en charge va avoir des répercussions psychosociales pour les patients. En effet, l'émail fait la beauté du sourire, qui au-delà de la santé joue un rôle important dans la construction et la stabilité de l'estime de soi.

Enfin, l'analyse du phénotype dentaire d'un modèle de souris invalidé pour un second gène de la famille des claudines, le gène *Claudin-3,* nous a permis de montrer l'importance de du rôle des claudines dans l'amélogenèse. En effet la souris KO présente un phénotype dentaire similaire à celui observé chez les cldn16-/- avec une diminution du volume de l'email, un retard de la minéralisation de l'émail sur l'incisive à croissance continue.

Cependant, selon les Claudines, une fonction de barrière ou de canal ionique, est assurée au sein de la jonction serrée. Claudin-16 assure un rôle de canal (Bronckers, 2017), alors que Claudin-3, joue une fonction de barrière (Günzel, D. et al; 2013). Or dans les deux cas, le défaut de structure des jonctions serrées en TEM est associé à une accumulation des protéines de l'émail et à une amélogenèse imparfaite. De plus en TEM les amas denses suggèreraient une accumulation actine, or chez la souris claudin 16 -/- le réseau de filament d'actine est perturbé au pôle sécréteur (Bardet et al, 2015). Ce résultat suggère un rôle prépondérant de la structure de

la jonction serrée. Il serait intéressant de regarder comment la perturbation de l'organisation du cytosquelette impact la fonction de l'améloblaste en particulier le trafic cellulaire associé.

La seconde démarche expérimentale a permis d'étudier les anomalies de minéralisation de la dentine en se basant sur une approche *in vitro*. Nous avons identifié un nouveau gène impliqué dans la dysplasie dentinaire de type 1, le gène TRIP10, alors que deux gènes seulement avaient été identifiés jusque-là. En effet dans notre étude, nous montrons qu'une mutation du gène Trip 10 homozygote 415C> G (p.Arg139Gly) serait liée à une dysplasie dentinaire de type 1. Cette mutation interviendrait dans l'adressage de la protéine TRIP10 à la membrane cellulaire (Frost et al. 2008). Lorsque la protéine est mutée, la protéine n'est pas bien adressée à la membrane et se retrouve dans le cytoplasme des cellules.

Cependant, outre une bonne reproductibilité des résultats et une facilité de mise en œuvre, l'approche *in vitro* présente des limites en particulier pour modéliser et être représentative de situations *in vivo*. Les régulations physiologiques ne sont pas prises en compte comme les conditions environnementales. Pour notre modèle expérimental, il aurait fallu prendre en compte l'environnement hypoxique de la dent qui influence le phénotype des cellules : pour cela envisager des cultures en incubateur à hypoxie. De plus, la culture des cellules a été réalisée en monocouche, alors qu'une culture en 3 dimensions aurait été essentielle, puisqu'elle permet de replacer les cellules dans des conditions proches des conditions physiologiques.

De plus, dans cette étude, une seule famille a été étudiée. Afin de confirmer nos résultats il serait intéressant de tester en diagnostic génétique le gène TRIP10 sur d'autres familles de patients présentant une dysplasie dentinaire de type 1 n'impliquant ni DSPP ni SMOC. Il serait également intéressant d'envisager l'étude du phénotype dentaire d'un modèle murin, approche complémentaire qui permettrait de supporter le rôle de Trip10 dans la DD-I et d'investiguer d'avantage le lien possible entre la famille de protéine de TRIP10 et la voie β-caténine. En effet, la voie β-caténine jouerait un rôle important lors de la formation de la dentine (Kim et al. 2011; Bae et al. 2013) au niveau des racines (Kim et al. 2013). Ainsi, pourrons-nous par la suite envisager de mettre en évidence l'impact potentiel de la perte du site de phosphorylation de la tyrosine de la β-caténine, dû à la mutation Arg139Gly de la protéine Trip10, sur la dentinogenèse radiculaire.

# CONCLUSION

Mon projet de recherche, en étudiant les mécanismes impliqués dans les défauts de la minéralisation de l'émail et de la dentine a permis 1) d'identifier des nouveaux gènes et/ou leur implication dans des pathologies dentaires 2) d'apporter des éléments permettant une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans ces pathologies et 3) un meilleur accompagnement du diagnostic associé à une meilleure prise en charge des patients. Les résultats obtenus au cours de ces deux projets, ouvrent de nombreuses perspectives de travail.

D'un point de vue plus personnel, ce projet m'a donné l'opportunité de me former à de nouvelles techniques : l'hybridation in situ, technique que j'ai pérennisé au sein du laboratoire et dont des résultats utilisant cette technique sont présentés dans ce mémoire.

# BIBLIOGRAPHIE


Bae, C.H., Kim, T.H., Ko, S.O., Lee, J.C., Yang, X., and Cho, E.S. (2015). Wntless regulates dentin apposition and root elongation in the mandibular molar. J. Dent. Res. *94*, 439–445.

Bae, C.H., Lee, J.Y., Kim, T.H., Baek, J.A., Lee, J.C., Yang, X., Taketo, M.M., Jiang, R., and Cho, E.S. (2013). Excessive Wnt/β-catenin signaling disturbs tooth-root formation. J. Periodontal Res. *48*, 405–410.

Bardet, C., Courson, F., Wu, Y., Khaddam, M., Salmon, B., Ribes, S., Thumfart, J., Yamaguti, P.M., Rochefort, G.Y., Figueres, M.-L., et al. (2016). Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *31*, 498–513.

Barron, M.J., McDonnell, S.T., MacKie, I., and Dixon, M.J. (2008). Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. Orphanet J. Rare Dis. *3*, 31.

Barron, M.J., Brookes, S.J., Kirkham, J., Shore, R.C., Hunt, C., Mironov, A., Kingswell, N.J., Maycock, J., Shuttleworth, C.A., and Dixon, M.J. (2010). A mutation in the mouse Amelx tri-tyrosyl domain results in impaired secretion of amelogenin and phenocopies human X-linked amelogenesis imperfecta. Hum. Mol. Genet. *19*, 1230–1247.

Bloch-Zupan, A., Jamet, X., Etard, C., Laugel, V., Muller, J., Geoffroy, V., Strauss, J.-P., Pelletier, V., Marion, V., Poch, O., et al. (2011a). Homozygosity Mapping and Candidate Prioritization Identify Mutations, Missed by Whole-Exome Sequencing, in SMOC2, Causing Major Dental Developmental Defects. Am. J. Hum. Genet. *89*, 773–781.

Bronckers, A.L.J.J. (2017). Ion Transport by Ameloblasts during Amelogenesis. J. Dent. Res. *96*, 243–253.

Butler, W.T., Brunn, J.C., and Qin, C. (2003). Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. Connect. Tissue Res. *44 Suppl 1*, 171–178.

C. Berlioz-Torrent, G. Blot, R. Benarous. Contrôle du trafic intracellulaire de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH1 par le domaine cytoplasmique de la TMgp41. Virologie. 2002 ;6(4):293-302.

Campos-Lara, P., Santos-Diaz, M.A., Ruiz-Rodríguez, M.S., Garrocho-Rangel, J.A., and Pozos-Guillén, A.J. (2012). Orofacial findings and dental management of Williams-Beuren syndrome. J. Clin. Pediatr. Dent. *36*, 401–404.

Cetrullo, N., Guadagni, M.G., and Piana, G. (2006). Two cases of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: dental findings. Eur. J. Paediatr. Dent. Off. J. Eur. Acad. Paediatr. Dent. *7*, 146–150.

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

Cheng, J., Wang, H., and Guggino, W.B. (2005). Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Trafficking and Protein Expression by a Rho Family Small GTPase TC10. J. Biol. Chem. *280*, 3731–3739.

Cherkaoui Jaouad, I., El Alloussi, M., Laarabi, F.Z., Bouhouche, A., Ameziane, R., and Sefiani, A. (2013). Inhabitual autosomal recessive form of dentin dysplasia type I in a large consanguineous Moroccan family. Eur. J. Med. Genet. *56*, 442–444.

Crawford, P.J.M., Aldred, M., and Bloch-Zupan, A. (2007). Amelogenesis imperfecta. Orphanet J. Rare Dis. *2*, 17.

Damkier, H.H., Josephsen, K., Takano, Y., Zahn, D., Fejerskov, O., and Frische, S. (2014). Fluctuations in surface pH of maturing rat incisor enamel are a result of cycles of H+-secretion by ameloblasts and variations in enamel buffer characteristics. Bone *60*, 227–234.

De la Dure-Molla, M., Quentric, M., Yamaguti, P.M., Acevedo, A.-C., Mighell, A.J., Vikkula, M., Huckert, M., Berdal, A., and Bloch-Zupan, A. (2014). Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. Orphanet J. Rare Dis. *9*, 84.

De La Dure-Molla, M., Philippe Fournier, B., and Berdal, A. (2015). Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: revision of the classification. Eur. J. Hum. Genet. *23*, 445–451.

Denker, B.M., and Sabath, E. (2011). The Biology of Epithelial Cell Tight Junctions in the Kidney. J. Am. Soc. Nephrol. *22*, 622–625.

Depprich, R.A., Ommerborn, M.A., Handschel, J.G., Naujoks, C.D., Meyer, U., and Kübler, N.R. (2007). Dentin dysplasia type I: a challenge for treatment with dental implants. Head Face Med. *3*, 31.

Dombrosky-Ferlan, P., Grishin, A., Botelho, R.J., Sampson, M., Wang, L., Rudert, W.A., Grinstein, S., and Corey, S.J. (2003). Felic (CIP4b), a novel binding partner with the Src kinase Lyn and Cdc42, localizes to the phagocytic cup. Blood *101*, 2804–2809.

Dong, J., Gu, T., Jeffords, L., and MacDougall, M. (2005). Dentin phosphoprotein compound mutation in dentin sialophosphoprotein causes dentinogenesis imperfecta type III. Am. J. Med. Genet. A. *132A*, 305–309.

Dutra, R.L., Pieri, P. de C., Teixeira, A.C.D., Honjo, R.S., Bertola, D.R., and Kim, C.A. (2011). Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. Clin. Sao Paulo Braz. *66*, 959–964.

Fjeld, K., Kettunen, P., Furmanek, T., Kvinnsland, I.H., and Luukko, K. (2005). Dynamic expression of Wnt signaling-related Dickkopf1, -2, and -3 mRNAs in the developing mouse tooth. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *233*, 161–166.

Frost A, Perera R, Roux A, Spasov K, Destaing O, Egelman EH, De Camilli P, Unger VM. 2008. Structural basis of membrane invagination by F-BAR domains. Cell 132: 807-817

Fukae, M., Tanabe, T., Uchida, T., Lee, S.K., Ryu, O.H., Murakami, C., Wakida, K., Simmer, J.P., Yamada, Y., and Bartlett, J.D. (1998). Enamelysin (matrix metalloproteinase-20):

localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. J. Dent. Res. *77*, 1580–1588.

Gage G.J., Kipke D.R , and Shain W., (2012). "Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 65.

Georgiou, M., Marinari, E., Burden, J., and Baum, B. (2008). Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. Curr. Biol. CB *18*, 1631–1638.

Günzel, D., and Yu, A.S.L. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol. Rev. *93*, 525–569.

Hata, M., Kawamoto, T., Kawai, M., and Yamamoto, T. (2010). Differential expression patterns of the tight junction-associated proteins occludin and claudins in secretory and mature ameloblasts in mouse incisor. Med. Mol. Morphol. *43*, 102–106.

Helfrich, M.H. (2005). Osteoclast diseases and dental abnormalities. Arch. Oral Biol. *50*, 115–122.

Holt, R., Roberts, G., and Scully, C. (2000). Oral health and disease. BMJ *320*, 1652–1655.

Hu, J., Troglio, F., Mukhopadhyay, A., Everingham, S., Kwok, E., Scita, G., and Craig, A.W.B. (2009). F-BAR-containing adaptor CIP4 localizes to early endosomes and regulates Epidermal Growth Factor Receptor trafficking and downregulation. Cell. Signal. *21*, 1686–1697.

Hu, Y., Smith, C.E., Richardson, A.S., Bartlett, J.D., Hu, J.C.C., and Simmer, J.P. (2016). MMP20, KLK4, and MMP20/KLK4 double null mice define roles for matrix proteases during dental enamel formation. Mol. Genet. Genomic Med. *4*, 178–196.

Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. Dev. Cell *9*, 791–804.

Jedeon, K., Marciano, C., Loiodice, S., Boudalia, S., Canivenc Lavier, M.-C., Berdal, A., and Babajko, S. (2014). Enamel hypomineralization due to endocrine disruptors. Connect. Tissue Res. *55*, 43–47.

Josephsen, K., Takano, Y., Frische, S., Praetorius, J., Nielsen, S., Aoba, T., and Fejerskov, O. (2010). Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. *299*, C1299–C1307.

Karcher-Djuricic, V., Staubli, A., Meyer, J.M., and Ruch, J.V. (1985). Acellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. Differ. Res. Biol. Divers. *29*, 169–175.

Kim, T.H., Bae, C.H., Lee, J.C., Ko, S.O., Yang, X., Jiang, R., and Cho, E.S. (2013). β-catenin is required in odontoblasts for tooth root formation. J. Dent. Res. *92*, 215–221.

Kim, T.-H., Lee, J.-Y., Baek, J.-A., Lee, J.-C., Yang, X., Taketo, M.M., Jiang, R., and Cho, E.-S. (2011). Constitutive stabilization of ß-catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *412*, 549–555.

Kooij, G., Kopplin, K., Blasig, R., Stuiver, M., Koning, N., Goverse, G., Pol, S.M.A. van der, Hof, B. van het, Gollasch, M., Drexhage, J.A.R., et al. (2014). Disturbed function of the blood–cerebrospinal fluid barrier aggravates neuro-inflammation. Acta Neuropathol. (Berl.) *128*, 267–277.

Krause, G., Protze, J., and Piontek, J. (2015). Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. Semin. Cell Dev. Biol. *42*, 3–12.

Lacruz, R.S., Nanci, A., Kurtz, I., Wright, J.T., and Paine, M.L. (2010). Regulation of pH During Amelogenesis. Calcif. Tissue Int. *86*, 91–103.

Larocca, M.C., Shanks, R.A., Tian, L., Nelson, D.L., Stewart, D.M., and Goldenring, J.R. (2004). AKAP350 interaction with cdc42 interacting protein 4 at the Golgi apparatus. Mol. Biol. Cell *15*, 2771–2781.

Leibfried, A., Fricke, R., Morgan, M.J., Bogdan, S., and Bellaiche, Y. (2008). Drosophila Cip4 and WASp define a branch of the Cdc42-Par6-aPKC pathway regulating E-cadherin endocytosis. Curr. Biol. CB *18*, 1639–1648.

Linder, S., Hüfner, K., Wintergerst, U., and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. J. Cell Sci. *113 Pt 23*, 4165–4176.

Liu, S., Xiong, X., Zhao, X., Yang, X., and Wang, H. (2015). F-BAR family proteins, emerging regulators for cell membrane dynamic changes-from structure to human diseases. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol *8*, 47.

Louvard D. Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 4132–6.

Magloire, H., and Couble, M.-L. (2011). L'implant dentaire biologique : mythe ou réalité ? Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac. *112*, 240–248.

Mitchell, L.A., and Koval, M. (2010). Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. Toxins *2*, 1595–1611.

Naderi, A.S.A., and Reilly, R.F. (2008). Hereditary etiologies of hypomagnesemia. Nat. Clin. Pract. Nephrol. *4*, 80–89.

Ohazama, A., and Sharpe, P.T. (2007). Expression of claudins in murine tooth development. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *236*, 290–294.

Park, J.-J., and Cunningham, M.G. (2007). Thin Sectioning of Slice Preparations for Immunohistochemistry. J. Vis. Exp. JoVE.

Patel, A., Jagtap, C., Bhat, C., and Shah, R. (2015). Bilateral nephrocalcinosis and amelogenesis imperfecta: A case report. Contemp. Clin. Dent. *6*, 262–265.

Phan, M., Conte, F., Khandelwal, K.D., Ockeloen, C.W., Bartzela, T., Kleefstra, T., van Bokhoven, H., Rubini, M., Zhou, H., and Carels, C.E.L. (2016). Tooth agenesis and orofacial clefting: genetic brothers in arms? Hum. Genet. *135*, 1299–1327.

Pugach, M.K., and Gibson, C.W. (2014). Analysis of enamel development using murine model systems: approaches and limitations. Front. Physiol. *5*, 313.

Qian, J., Chen, W., Lettau, M., Podda, G., Zörnig, M., Kabelitz, D., and Janssen, O. (2006). Regulation of FasL expression: a SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL. Cell. Signal. *18*, 1327–1337.

Rajpar, M.H., Koch, M.J., Davies, R.M., Mellody, K.T., Kielty, C.M., and Dixon, M.J. (2002). Mutation of the signal peptide region of the bicistronic gene DSPP affects translocation to the endoplasmic reticulum and results in defective dentine biomineralization. Hum. Mol. Genet. *11*, 2559–2565.

Roche D., (2008). DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization, 4$^{e}$ edition, ROCHE DIAGNOSTICS GmbH, Allemagne, Manuel scientifique, 202 p.

Saengsawang, W., Mitok, K., Viesselmann, C., Pietila, L., Lumbard, D.C., Corey, S.J., and Dent, E.W. (2012). The F-BAR protein CIP4 inhibits neurite formation by producing lamellipodial protrusions. Curr. Biol. CB *22*, 494–501.

Saltiel, A.R., and Pessin, J.E. (2003). Insulin signaling in microdomains of the plasma membrane. Traffic Cph. Den. *4*, 711–716.

Segawa, H., Onitsuka, A., Furutani, J., Kaneko, I., Aranami, F., Matsumoto, N., Tomoe, Y., Kuwahata, M., Ito, M., Matsumoto, M., et al. (2009). Npt2a and Npt2c in mice play distinct and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. Am. J. Physiol. Renal Physiol. *297*, F671-678.

Shields, E.D., Bixler, D., and el-Kafrawy, A.M. (1973). A proposed classification for heritable human dentine defects with a description of a new entity. Arch. Oral Biol. *18*, 543–553.

Shimada A, Niwa H, Tsujita K, Suetsugu S, Nitta K, Hanawa-Suetsugu K, Akasaka R, Nishino Y, Toyama M, Chen L, Liu ZJ, Wang BC, Yamamoto M, Terada T, Miyazawa A, Tanaka A, Sugano S, Shirouzu M, Nagayama K, Takenawa T, Yokoyama S. 2007. Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. Cell 129: 761-772

Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., et al. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption. Science *285*, 103–106.

Stokes, M.B., Holler, S., Cui, Y., Hudkins, K.L., Eitner, F., Fogo, A., and Alpers, C.E. (2000). Expression of decorin, biglycan, and collagen type I in human renal fibrosing disease. Kidney Int. *57*, 487–498.

Sun, Y., Yu, H., Zheng, D., Cao, Q., Wang, Y., Harris, D., and Wang, Y. (2011). Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue. Arch. Pathol. Lab. Med. *135*, 1335–1342.

Ten Cate, A.R. (1996). The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. Oral Dis. *2*, 55–62.

Thesleff, I., and Jernvall, J. (1997). The enamel knot: a putative signaling center regulating tooth development. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *62*, 257–267.

Thesleff, I., Vaahtokari, A., and Partanen, A.M. (1995). Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. Int. J. Dev. Biol. *39*, 35–50.
Thomas, H.F. (1995). Root formation. Int. J. Dev. Biol. *39*, 231–237.

Tian, L., Nelson, D.L., and Stewart, D.M. (2000). Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules. J. Biol. Chem. *275*, 7854–7861.

Tsuji, E., Tsuji, Y., Fujiwara, T., Ogata, S., Tsukamoto, K., and Saku, K. (2006). Splicing variant of Cdc42 interacting protein-4 disrupts beta-catenin-mediated cell-cell adhesion: expression and function in renal cell carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. *339*, 1083–1088.

Tucker, A., and Sharpe, P. (2004). The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. Nat. Rev. Genet. *5*, 499–508

Tummers, M., and Thesleff, I. (2009). The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol. *312B*, 309–319.

Wang, S.K., Reid, B.M., Dugan, S.L., Roggenbuck, J.A., Read, L., Aref, P., Taheri, A.P.H., Yeganeh, M.Z., Simmer, J.P., and Hu, J.C.-C. (2014). FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome. J. Dent. Res. *93*, 42–48.

Watters, A.K., Rom, S., Hill, J.D., Dematatis, M.K., Zhou, Y., Merkel, S.F., Andrews, A.M., Cena, J., Potula, R., Skuba, A., et al. (2015). Identification and dynamic regulation of tight junction protein expression in human neural stem cells. Stem Cells Dev. *24*, 1377–1389.

White, S.N., Paine, M.L., Ngan, A.Y.W., Miklus, V.G., Luo, W., Wang, H., and Snead, M.L. (2007). Ectopic expression of dentin sialoprotein during amelogenesis hardens bulk enamel. J. Biol. Chem. *282*, 5340–5345.

Will, C., Breiderhoff, T., Thumfart, J., Stuiver, M., Kopplin, K., Sommer, K., Günzel, D., Querfeld, U., Meij, I.C., Shan, Q., et al. (2010). Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca2+ and Mg2+ wasting. Am. J. Physiol. Renal Physiol. *298*, F1152-1161.

Wise, G.E. (2009). Cellular and molecular basis of tooth eruption. Orthod. Craniofac. Res. *12*, 67–73.

Xie, X., Liu, C., Zhang, H., Jani, P.H., Lu, Y., Wang, X., Zhang, B., and Qin, C. (2016). Abrogation of epithelial BMP2 and BMP4 causes Amelogenesis Imperfecta by reducing MMP20 and KLK4 expression. Sci. Rep. *6*.

Yamaguti, P.M., Neves, F. de A.R., Hotton, D., Bardet, C., Dure-Molla, M. de L., Castro, L.C., Scher, M. do C., Barbosa, M.E., Ditsch, C., Fricain, J.-C., et al. (2017). Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. J. Med. Genet. *54*, 26–37.

Yan, S.J., and Blomme, E. a. G. (2003). In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. Vet. Pathol. *40*, 227–236.

Yin, K., Lei, Y., Wen, X., Lacruz, R.S., Soleimani, M., Kurtz, I., Snead, M.L., White, S.N., and Paine, M.L. (2015). SLC26A Gene Family Participate in pH Regulation during Enamel Maturation. PloS One *10*, e0144703.

Yokose, S., and Naka, T. (2010). Lymphocyte enhancer-binding factor 1: an essential factor in odontoblastic differentiation of dental pulp cells enzymatically isolated from rat incisors. J. Bone Miner. Metab. *28*, 650–658.2013, Bae CH et al

Zeichner-David, M., Diekwisch, T., Fincham, A., Lau, E., MacDougall, M., Moradian-Oldak, J., Simmer, J., Snead, M., and Slavkin, H.C. (1995). Control of ameloblast differentiation. Int. J. Dev. Biol. *39*, 69–92.

Zhang, X., Zhao, J., Li, C., Gao, S., Qiu, C., Liu, P., Wu, G., Qiang, B., Lo, W.H., and Shen, Y. (2001). DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. Nat. Genet. *27*, 151–152.

# ANNEXES : Liste des communications

**Liste des publications :**

- Bardet, C., Courson, F., Wu, Y., Khaddam, M., Salmon, B., **Ribes, S**., Thumfart, J., Yamaguti, P.M., Rochefort, G.Y., Figueres, M.-L., et al. (2016). "Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation". J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *31*, 498–513.

- Bardet, C., Ribes, S., Wu, Y., Diallo, M.T., Salmon, B., Breiderhoff, T., Houillier, P., Müller, D., and Chaussain, C. (2017). Claudin Loss-of-Function Disrupts Tight Junctions and Impairs Amelogenesis. Front. Physiol. *8*, 326.

- Hicham Filali, Claire Bardet, **Sandy Ribes**, Jeremy Sadoine, Thomas Guilbert, Imane Cherkaoui Jaouad, Lekbir Baala, Abdelaziz Sefiani, Agnes Bloch Zupan, Mustapha El Aloussi, Stanislas Lyonnet, C Chaussain. "Homozygous TRIP10 mutation results in dentin dysplasia type I (DD-I)" (soumis)

**Communications affichées :**

- S. Ribes, S. Demignot, C. Chaussain, C. Bardet (2014). « Etude de l'expression des gènes impliqués dans les maladies rares du métabolisme phosphocalcique et dans la minéralisation par Hybridation in Situ » (poster).

**Communications orales :**

- S. Ribes, S. Demignot, C. Chaussain, C. Bardet (2015). « Etude du rôle des protéines Claudines, composants des jonctions serrées, au cours du développement dentaire ».

- S. Ribes, S. Demignot, C. Chaussain, C. Bardet (2015). « Study of *CLDN* genes expression, involved in disorders of calcium and phosphorus metabolism, and mineralization ».

- **ANNEXE 1** : Bardet, C., Courson, F., Wu, Y., Khaddam, M., Salmon, B., **Ribes, S.,** Thumfart, J., Yamaguti, P.M., Rochefort, G.Y., Figueres, M.-L., et al. (2016). "Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation". J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. *31*, 498–513.

ORIGINAL ARTICLE

JBMR®

# Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation

Claire Bardet,[1] Frédéric Courson,[2*] Yong Wu,[1,3*] Mayssam Khaddam,[1] Benjamin Salmon,[1,2] Sandy Ribes,[1] Julia Thumfart,[4] Paulo M Yamaguti,[5] Gael Y Rochefort,[1] Marie-Lucile Figueres,[6] Tilman Breiderhoff,[4] Alejandro Garcia-Castaño,[7] Benoit Vallée,[8] Dominique Le Denmat,[1] Brigitte Baroukh,[1] Thomas Guilbert,[9] Alain Schmitt,[10] Jean-Marc Massé,[10] Dominique Bazin,[11] Georg Lorenz,[12] Maria Morawietz,[12] Jianghui Hou,[13] Patricia Carvalho-Lobato,[14] Maria Cristina Manzanares,[14] Jean-Christophe Fricain,[15] Deborah Talmud,[16] Renato Demontis,[17] Francisco Neves,[18] Delphine Zenaty,[19] Ariane Berdal,[6] Andreas Kiesow,[12] Matthias Petzold,[12] Suzanne Menashi,[8] Agnes Linglart,[20] Ana Carolina Acevedo,[5] Rosa Vargas-Poussou,[7] Dominik Müller,[4] Pascal Houillier,[6,21] and Catherine Chaussain[1,2]

[1]EA 2496, Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies, Dental School Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, France
[2]Department of Odontology, AP-HP, and Reference Center for Rare Diseases of the Metabolism of Calcium and Phosphorus, Nord Val de Seine Hospital, Bretonneau, France
[3]Department of Oral and Cranio-maxillofacial Science, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai, China
[4]Department of Pediatric Nephrology, Charité University School of Medicine, Berlin, Germany
[5]Division of Dentistry, Oral Care Center for Inherited Diseases, University Hospital of Brasilia, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia (UnB), Brasilia, Brazil
[6]INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, Paris-Diderot, Pierre et Marie Curie and Paris Descartes Universities, CNRS ERL 8228, Paris, France
[7]Department of Genetics, AP-HP, and Reference Center of Children and Adult Renal Hereditary Diseases (MARHEA), European Hospital Georges Pompidou, Paris, France
[8]Laboratory CRRET, Paris-Est University, CNRS, Créteil, France
[9]Cochin Institute, Plate-Forme d'Imagerie Photonique, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris Descartes University Sorbonne Paris Cité, Paris, France
[10]Cochin Institute, Transmission Electron Microscopy Platform, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris Descartes University Sorbonne Paris Cité, Paris, France
[11]Laboratoire de Physique des Solides, CNRS, Paris Sud University, Orsay, and LCMCP-UPMC, Collège de France, Paris, France
[12]Fraunhofer Institute for Mechanics of Materials IWM, Halle, Germany
[13]Division of Renal Diseases, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA
[14]Human Anatomy and Embryology, Health University of Barcelona Campus-Bellvitge, University of Barcelona, Barcelona, Spain
[15]CHU Bordeaux, Dental School, U1026 Tissue Bioengineering, University of Bordeaux/Inserm, Bordeaux, France
[16]Department of Pediatrics, Centre Hospitalier Régional (CHR) d'Orléans, Orleans, France
[17]GHPSO, Creil, France
[18]Laboratory of Molecular Pharmacology, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia (UNB), Brasilia, Brazil
[19]Department of Pediatric Endocrinology, AP-HP, Paris Diderot University, Robert Debré Hospital, Paris, France
[20]Department of Pediatric Endocrinology, AP-HP, Paris Sud University, School of Medicine, and Reference Center for Rare Diseases of the Metabolism of Calcium and Phosphorus, Paris, France
[21]Department of Physiology, AP-HP, and Reference Center of Children and Adult Renal Hereditary Diseases (MARHEA), Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

**ABSTRACT**

Claudin-16 protein (CLDN16) is a component of tight junctions (TJ) with a restrictive distribution so far demonstrated mainly in the kidney. Here, we demonstrate the expression of CLDN16 also in the tooth germ and show that claudin-16 gene (*CLDN16*) mutations result in amelogenesis imperfecta (AI) in the 5 studied patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis (FHHNC). To investigate the role of CLDN16 in tooth formation, we studied a murine model of FHHNC and showed

Received in original form May 15, 2015; revised form September 28, 2015; accepted September 29, 2015. Accepted manuscript online October 1, 2015.
Address correspondence to: Catherine Chaussain, DDS, PhD, EA 2496, Dental School University Paris Descartes, 1 Rue Maurice Arnoux 92120, Montrouge, France. E-mail: catherine.chaussain@parisdescartes.fr; Pascal Houillier, MD, PhD, Cordeliers Research Center, 15 Rue de l'École de Médecine 75006, Paris, France. E-mail: pascal.houillier@inserm.fr
*FC and YW contributed equally to this work.
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.
Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 31, No. 3, March 2016, pp 498–513
DOI: 10.1002/jbmr.2726
© 2015 American Society for Bone and Mineral Research

that CLDN16 deficiency led to altered secretory ameloblast TJ structure, lowering of extracellular pH in the forming enamel matrix, and abnormal enamel matrix protein processing, resulting in an enamel phenotype closely resembling human AI. This study unravels an association of FHHNC owing to *CLDN16* mutations with AI, which is directly related to the loss of function of CLDN16 during amelogenesis. Overall, this study indicates for the first time the importance of a TJ protein in tooth formation and underlines the need to establish a specific dental follow-up for these patients. © 2015 American Society for Bone and Mineral Research.

**KEY WORDS:** AMELOGENESIS IMPERFECTA (AI); FAMILIAL HYPOMAGNESEMIA WITH HYPERCALCIURIA AND NEPHROCALCINOSIS (FHHNC); SECRETORY AMELOBLASTS; pH; MMP-20

## Introduction

The claudin (CLDN) components of the tight junctions (TJ) were shown to determine the size and ion specificity of individual TJ.[1] Among them, claudin-16 (CLDN16, initially called paracellin-1)[2] is expressed primarily in the thick ascending limb of Henle's loop in the kidney, where, in association with claudin-19, it forms cation-selective pores allowing reabsorption of $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$.[1–3] Mutations in the claudin genes *CLDN16* or *CLDN19* were shown to cause familial hypomagnesemia with hypercalciuria (HC) and nephrocalcinosis (NC) (FHHNC; OMIM 248250 and OMIM 248190, respectively), a rare kidney condition characterized by renal $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$ wasting evolving to renal insufficiency.[2,4]

Clinical cases describing the association of kidney disease and amelogenesis imperfecta (AI) have been described as early as 1972.[5,6] AI is defined as a group of genetic disorders that affect to varying degrees tooth enamel formation of all or nearly all the teeth in either the primary or permanent dentition or both.[7] The resulting enamel can be classified as hypoplastic (thin but normally calcified), hypocalcified (soft), or hypomatured (reduced mineral density and brown discolorations).[7,8] AI may occur as an isolated condition that only affects enamel (nonsyndromic AI) or in association with abnormalities in other tissues (syndromic conditions associated with AI).[9] In 2006, the association between FHHNC and enamel disorder has been reported based on the oral examination of two Chinese sisters with FHHNC, who both showed marked AI with severe enamel hypoplasia.[10] This important finding had not been pursued since, whereas another association of kidney condition and AI, the enamel renal syndrome (ERS), has recently raised a great interest.[11–13] ERS, which is caused by bi-allelic mutations in *FAM20A* encoding a Golgi kinase,[14,15] was first described as a distinct phenotypic entity (ERS, OMIM 204690) but was later associated with gingival fibromatosis syndrome (AIGFS, OMIM 614253).[16,17] Unlike the association of FHHNC and AI reported by Cetrullo and colleagues,[10] ERS is characterized by ectopic calcifications of the dental pulp and gingiva attesting the difference between these two disorders.

During enamel development, ameloblasts progress through defined developmental stages requiring cell-cell contact, detachment, cell reattachment, and intercellular communication and TJ have been shown to be essential in these processes.[18,19] Several *CLDN* genes are expressed at various developmental stages in the tooth germ where they were proposed to modulate TJ properties.[1,18,20] However, to date, *CLDN16* expression has not yet been reported in the tooth. Because AI has already been associated with FHHNC,[10] we thought to determine whether *CLDN16* mutations were responsible for abnormal enamel formation in this disorder. In that purpose, we characterized the oral phenotype of 5 unrelated patients with autosomal recessive FHHNC owing to *CLDN16* mutations,[4,21,22] as well as *Cldn16*$^{-/-}$ mice, the murine model of the disorder.[23] We demonstrate the expression of CLDN16, so far mainly described in the kidney, in the forming tooth and show that mutations in this gene resulted in enamel abnormalities both in FHHNC patients and in *Cldn16*$^{-/-}$ mice.

## Materials and Methods

### Genetic studies

Genomic DNA was extracted by standard methods from peripheral blood samples after informed consent was obtained from each participating subject (or the parents of the younger children). For patients 1 to 4, ethical agreement was received in the frame of the diagnosis Centre for Molecular Diagnosis of Familial Hypomagnesemia and Hypercalciuria by the Laboratory of Molecular Genetics (CHU Paris IdF Ouest - HEGP Hôpital Européen Georges Pompidou, France) accredited by the French Agency of Biomedecine (agreement AFSB1330617S for RVP), and for patient 5 by the Oral Care Center for Inherited Diseases, Brasilia-Brazil (CONEP 1440/2001). Mutation analyses was performed based on PCR amplification followed by sequencing as previously described[21,24] (primers available on request) on an ABI Prism 3730XL DNA Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mutations were interpreted, and the degree of amino acid conservation between orthologs and Grantham distance was assessed with Alamut v.2.0 software (Interactive Biosoftware, Rouen, France; http://www.interactivebiosoftware.com/). Complementary analyses were performed with: SIFT (http://www.Blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html), PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/), MutationTaster (http://www.mutationtaster.org/).

### Oral examination of patients with FHHNC owing to *CLDN16* mutations

Clinical examination was performed by senior dental practitioners and completed by intraoral X-rays and panoramic radiograph. The presence of enamel defects was determined by visual examination of tooth surfaces and the abnormalities were classified according to AI classifications.[7,8] For patients with unerupted permanent teeth, a 3D cone beam CT (CBCT) exam was performed.

### *Cldn16*$^{-/-}$ mice

*Cldn16*$^{-/-}$ mice were obtained as previously described.[23] Heterozygous breeding was carried out and tail snips were collected for genotyping. DNA was extracted from the snips using DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Paris, France) and the genotype was determined by PCR using primers for *Cldn16* gene.[23] Offspring with the *Cldn16* gene null mutant (*Cldn16*$^{-/-}$) phenotype were maintained under the same conditions as those for the wild-type (WT) mice. Postnatal day 3 (PN3), postnatal day 4 (PN4), and 3-month-old littermate *Cldn16*$^{+/+}$ (WT) and

*Cldn16*$^{-/-}$ mice were examined in this study. Before death, blood pH was measured in vigil 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 8$ per group) using epoc pH Reader device (Alere, Atlanta, GA, USA) (ethical agreement number: CE5/2012/084). Chemical methods were used for mice euthanization according to the ethical protocol approved by the Animal Care Committee of French Veterinary Services (DPP Haut de Seine, France: agreement number C-9204901).

All mice were housed in standard conditions of temperature ($23 \pm 2$°C) in a light-controlled environment, with unlimited access to water and standard pelleted food (rodent diet 3800PMS10, Provimi Kliba, Kaiseraugst, Switzerland).

### Transmission electron microscopy (TEM)

Mandibles of PN3 WT and *Cldn16*$^{-/-}$ littermate mice ($n = 3$ per group) were analyzed by conventional transmission electron microscopy (TEM). Heads were fixed in 2% (w/v) glutaraldehyde in 0.15 M cacodylate buffer, pH 7.4, overnight at 4°C. After post-fixation in 2% $OsO_4$ for 1 hour and dehydration in graded ethanol series at 4°C, the samples were embedded in Epon 812 (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Semithin sections were stained with toluidine blue and fuchsine. After washing, the sections were dried and mounted in Eukitt. Ultrathin sections of undecalcified mandibles were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined with a JEOL 1011 electron microscope.

### Immunofluorescence analysis

Lower jaws of PN3 WT and *Cldn16*$^{-/-}$ littermate mice ($n = 6$ per group) were embedded in OCT compound before frozen sectioning. Seven-micrometer-thick undecalcified frozen tissue sections were prepared. For CLDN16 and ZO-1 immunolocalization, rabbit polyclonal CLDN16 antibody[3] and goat monoclonal ZO-1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) were used at 1/200 and 1/50 dilution, respectively. Background activity was blocked at room temperature for 90 minutes in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. A goat anti-rabbit immunoglobulin-G alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and a donkey anti-goat immunoglobulin-G TRITC (Abcam, Cambridge, MA, USA) were used, respectively, 1 hour at room temperature in a dark chamber. Nuclei were stained with Dapi solution at 1/4000 (Invitrogen) for 3 minutes. Images were merged using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA).

To examine the signal distribution of CLDN16 immunostaining in WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice, a Yokogawa csu X1 Spinning Disk coupled with a DMI6000B Leica microscope and oil objectives (Olympus) were used. Acquisitions were made with MetaMorph 7 software. Identical imaging settings were used for all acquisitions. Analyses were performed using ImageJ Colocalization plugin (http://imagej.nih.gov/ij/). Same threshold levels were used for both WT and *Cldn16*$^{-/-}$ cases.

### Immunohistochemistry

The mandibles of PN3 and PN4 WT and *Cldn16*$^{-/-}$ littermate mice ($n = 6$ per group) were fixed overnight in a 4% paraformaldehyde solution. PN4 samples were decalcified overnight at 4°C in 4.13% EDTA. The PN3 and PN4 samples were then progressively dehydrated and embedded in Paraplast (Oxford Labware, St. Louis, MO, USA). Seven-micrometer-thick paraffin tissue sections were prepared (sagittal sections of PN3 mandibles for incisor analysis, frontal sections of PN4 mandibles for molar germ analysis), deparaffined, and rehydrated. Endogenous peroxidases were blocked in 0.4% hydrogen peroxide in methanol. After extended rinsing in PBS, background activity was blocked at room temperature for 90 minutes in 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Goat polyclonal enamelin antibody (Santa Cruz Biotechnology) and rabbit polyclonal amelogenin (Santa Cruz Biotechnology) and MMP-20 (N-terminal MMP-20 antibody, Sigma-Aldrich) antibodies were used at 1/50, 1/200, and 1/100 dilution, respectively. Sections were treated overnight in a moist chamber at 4°C and further incubated for 90 minutes with a polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulin-G peroxidase conjugate or a polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulin-G peroxidase conjugate (Dako, Glostrup, Denmark). Peroxidase labeling was revealed (1 to 10 minutes according to the antibody) in a dark chamber using 3-3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) with hydrogen peroxide in buffered solution (PBS). To exclude nonspecific binding, controls were carried out by omitting the primary antibody.

### Phalloidin staining

Lower jaws of PN3 WT and *Cldn16*$^{-/-}$ littermate mice ($n = 6$ per group) were embedded in OCT compound before frozen sectioning. Phalloidin staining was performed using the Alexa Fluor 647 Phalloidin (Invitrogen) as F-actin probe. Seven-micrometer-thick undecalcified frozen tissue sections were prepared, defrozen, and treated for 1/200 phalloidin in 1× PBS for 10 minutes in a dark chamber at room temperature. The sections are rinsed twice with 1× PBS for 2 minutes, stained with 0.1 μg/mL Dapi solution for 10 minutes, and rinsed twice with 1× PBS for 2 minutes. Sections are mounted in Mowiol (Sigma-Aldrich) and observed with a Yokogawa csu X1 Spinning Disk coupled with a DMI6000B Leica microscope. Acquisitions were made with MetaMorph 7 software. Identical imaging settings were used for all acquisitions.

### Total protein extraction from incisor

Intra-bony parts of the growing lower incisor were dissected from 3-month-old WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 10$ per group). The samples were homogenized in ice-cold extraction buffer (2 samples in 100 μL buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 5 mM EDTA, 0.9% NaCl, and 0.2% Triton X-100), supplemented with 1/100 Protease Inhibitor Cocktail Set V EDTA free (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). The resulting homogenates were then briefly sonicated on ice (3 times 5 sec), cleared by centrifugation at 10,000*g* for 15 minutes at 4°C and stored at −80°C.

### Western blot analysis

Homogenates (20 μg) were subjected to SDS-PAGE on 4% to 20% precast gels (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were incubated with anti-amelogenin (1/750) and anti-enamelin (1/500, Santa Cruz Biotechnology) antibodies overnight at 4°C. The membranes were incubated with a 1/1000 dilution of a peroxidase-linked anti-rabbit IgG (amelogenin) or anti-goat (enamelin) secondary antibody for 1 hour at room temperature and developed by means of BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). As a control for protein loading, the membranes were carefully washed and stripped with

stripping buffer (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) and processed with a rabbit monoclonal anti-GAPDH antibody (Epitomics, Burlingame, CA, USA). The relative intensity of bands was digitalized and quantified using image J software.

### Gel zymography

Homogenates (5 μg) were analyzed by casein zymography to identify MMP-20. Electrophoresis was carried out using a miniprotean II system (Bio-Rad). Samples ($n = 6$ per group) were half-diluted in 1 M Tris, pH 6.8, containing 50% glycerol and 0.4% bromophenol blue, and gels were run under Laemmli conditions. Casein Zymograms were run on Novex 4% to 16% casein zymogels (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), incubated at 37°C for 48 hours in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, containing 5 mM $CaCl_2$ to allow MMP activity. After electrophoresis, gels were washed twice (30 minutes each) in 200 mL 2.5% Triton X-100 under constant mechanical stirring and incubated in 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$ and 0.05% Brij 35, for 24 hours at 37°C. Gels were stained with 0.25% Coomassie brilliant blue G-250 (50% methanol, 10% acetic acid) and destained appropriately (40% methanol, 10% acetic acid). Proteinase activity was evidenced as cleared (white) bands. Bands were digitalized and compared using image J software.

### In situ zymography

Lower jaws of PN3 WT and *Cldn16*$^{-/-}$ littermate mice ($n = 6$ per group) were embedded in OCT compound before frozen sectioning. Seven-micrometer-thick undecalcified frozen frontal sections were prepared. The casein (Sigma-Aldrich) fluorescein conjugate protein (concentration of 1 mg/mL) was used for in situ zymography as a substrate for MMP following. Serial frozen sections were air-dried for 10 minutes. DQ-casein was diluted at 1/20 in 1% (w/v) low gelling temperature agarose in PBS. The mixture was put on top of the sections and covered with a coverslip. 10 mM EDTA and 1 mM 1,10-phenanthrolin (Sigma-Aldrich), two MMP activity inhibitors, were used as controls.[25] After the agar was gelled, the incubation was performed at 4°C overnight. Gels without DQ-casein were processed in the same way as described above as negative controls. Examination of the substrate lysis was assessed using I× 81 microscope (Olympus) and 20× objective. Acquisitions were made with ORCA R2 (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan). Identical imaging settings were used for all acquisitions. Intensity of fluorescence analyses was performed using ImageJ homemade routines (http://imagej.nih.gov/ij/). Same threshold levels were used for both WT and *Cldn16*$^{-/-}$ cases.

### pH measurement in the enamel matrix of the PN3 mouse incisor

The lower jaws of *Cldn16*$^{-/-}$ mice and their littermate WT mice were collected at PN3 ($n = 9$ per group), embedded in OCT without decalcification, and cut in the frontal axis in a cryostat at −20°C (CM 3050S, Leica, Nanterre, France) using the first cusp of the first molar (M1) as a landmark. Sections located at the same level ahead of M1 for *Cldn16*$^{-/-}$ and WT mice were defrozen and treated for 15 minutes in a dark chamber at room temperature with 5 μM acid free BCECF (2′,7′-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein, Life Sciences) diluted in saline. Sections were rinsed three times with saline. Samples were transferred to the stage of an inverted microscope (AxiovisionA1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). pH was measured with imaging-based, dual excitation-wavelength fluorescence microscopy: extracellular dye was excited alternatively at 500 and 440 nm with a light-emitting diode (Optoled, Cairn Research, Faversham, UK). Emitted light was collected through a dichroic mirror, passed through a 530 nm filter, and focused onto an EM-CCD camera (iXon, Andor Technology, Belfast, Ireland) connected to a computer. The measured light intensities were digitized with 14-bit precision (16384 gray level scale) for further analysis. For each sample, 28 adjacent regions of interest were analyzed and the mean gray was measured with the Andor IQ software (Andor Technology, Belfast, Ireland). Background fluorescence was subtracted from fluorescence intensity to obtain intensity of intracellular fluorescence. Extracellular dye was calibrated at the end of each experiment. Samples were treated by a BCECF-containing 100 mM HEPES-buffered saline solution. Three different calibration solutions, titrated to 6.3, 6.8, or 7.3, were used.

### Enamel staining with GBHA and pH measurement in the adult mouse incisor

The lower incisors of 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 6$ per group) were carefully dissected from the alveolar bone and the enamel organ firmly pulled off with a sterile gaze. In each mouse, one tooth was used for GBHA staining and one for pH measurement.[26] For GBHA staining,[27–29] each incisor was stained under permanent stirring at room temperature for 2 minutes by immersion in 10 mL solution containing 3.75% GBHA (Sigma-Aldrich) and 1.275% sodium hydroxide dissolved in 75% ethanol. Subsequently, the incisors were briefly rinsed in 75% ethanol, rinsed in absolute ethanol, and air-dried. For pH measurement, the incisors were treated for 5 minutes in a dark chamber at room temperature with 5 μM acid-free BCECF and processed as described above. pH measurements were performed as previously reported by Damkier and colleagues.[26]

### Micro-X-ray computed tomography (micro–CT) analysis

Mandibles from 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 6$ per group) were scanned using a high-resolution X-ray micro-CT device (Quantum FX Caliper, Life Sciences, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) hosted by the PIPA Platform, EA2496 (Montrouge, France). 3D acquisitions were performed with an isotropic voxel size of 20 μm (90 kV, 160 mA, 180s). Enamel volume was measured using the open-source OsiriX imaging software (v3.7.1, distributed under LGPL license, Dr A Rosset, Geneva, Switzerland) from stack of 2D images. Binary thresholds were applied to isolate the enamel from the surrounding tissue. Incisor enamel thickness was assessed by measuring enamel surface under M1 (mesial and distal roots) and under M2 (mesial and distal roots) from micro-CT images using CTAn software (Skyscan, Aartselaar, Belgium) as previously reported.[30]

### Nanoindentation analysis

Cross-section samples incisors from 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice were prepared by cutting the resin-embedded samples perpendicular to the sagittal axis of the jaw at the level of the mesial cusp of the first molar ($n = 8$ per group). To achieve an appropriate flatness and surface quality for the nanoindentation experiments, all surfaces of the cross sections were grinded using a Presi Mecapol P230 polishing machine. For

the grinding procedure, SiC paper was applied starting with mesh size of 120, which was subsequently decreased to 4000. After cleaning, the nanoindentation measurements were performed using a G200 Nanoindenter (Agilent Technologies, Inc., Vista, CA, USA) equipped with a Berkovich-shaped diamond indenter tip. Samples were tested in dry condition. For all nanoindentation measurements, the displacement-controlled continuous stiffness mode (csm) technique was applied. In this mode, small oscillations of the indenter tip are superposed to the overall indenter displacement of the loading and unloading testing cycle. Using the csm mode allows determining material parameters such as hardness and Young's modulus values as a function of depth for the complete range of indentation. For the experiments, a maximum indentation depth of 3000 nm was chosen while the loading speed was set to result in a strain rate (averaged within the locally loaded sample region) of 0.05 1/s. Typically, 15 single indentation tests were performed for each of the specimen enamel to be investigated. A representative indentation depth of 500 nm was chosen for determining the nanoindentation data on hardness and Young's modulus (modulus of elasticity). This value was found well suitable to compare all different enamel samples while minimizing effects resulting from surface microstructure.

### Scanning electron microscopy (SEM)

Cross sections at the level of the mesial cusp of the first molar from 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice were performed with a saw equipped with a diamond disk (Struers, Champigny sur Marne, France) under a continuous water spray for SEM analyses ($n = 6$ per group). After thorough polishing, surfaces were cleaned with 5% sodium hypochlorite for 2 minutes, rinsed twice with distilled water, etched with 2% nitric acid for 10 seconds, and then thoroughly rinsed with distilled water. Gold sputter-coated surfaces were observed under a scanning electron microscope (Cambridge S260 SEM, Cambridge, UK), equipped with an Everhart-Thornley and BSE electron detector.

### Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)

Cross-section sample incisors from 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice were performed with a saw equipped with a diamond disk (Struers) under a continuous water spray for EDX analyses ($n = 8$ per group). Uncoated surfaces, as prepared for the nanoindentation, were observed under a scanning electron microscope (Zeiss Supra55VP), equipped with a VPSE detector, and EDX analyses system (EDAX Genesis). All samples were evaluated for Ca/P ratio (% atom).

### Laser ablation–inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICPMS)

LA-ICPMS was used for analyses of elemental composition, in particular to compare the magnesium concentration of WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 3$ per group). For the laser ablation, a device LSX 213 from Cetac (Omaha, NE, USA) was used. The ICPMS was performed with the device Element XR from Thermo Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Germany). The samples were prepared as for the nanoindentation and SEM. The enamel were precisely ablated by a Nd:YAG-Laser with wavelength of 213 nm and a spot diameter of 50 μm and analyzed in the ICPMS.

### RT-PCR analysis

*Cldn16* gene expression was analyzed after extraction of total RNA from PN3 molar germs for secretory ameloblasts ($n = 6$ per group). RNA extractions were performed using RNeasy Micro Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). An amount of 250 ng total RNA (Nanovue Plus, GE Healthcare Life Sciences, UK) was reverse-transcribed with (cDNA kit VersoTM, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA). For semiquantitative RT-PCR, cDNAs were amplified with specific primer (Go Tag Hot Start polymerase, Promega, Fitchburg, WI, USA). The PCR cycles consisted of an initial preincubation step (94°C for 5 minutes), followed by 30 cycles of amplification (95°C for 5 seconds, 55°C for 5 seconds, 70°C for 10 seconds). cDNA expressions were compared with *Gapdh* expression using: forward primer 5′-GGT CTG GAC TGT GTG AAG TT-3′ and reverse primer 5′-GGC ATA AGG GTA GTT CCT CT-3′ for *Cldn16*, and forward primer 5′-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3′ and reverse primer 5′-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3′ for *Gapdh*.

### qPCR analysis

Enamel matrix gene expression *Enam* and *Amelx* were analyzed after extraction of total RNA from the last 4 mm of mandibular incisor (soft part) from 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 6$ per group). RNA extractions were performed using RNeasy Micro Kit (Qiagen). An amount of 200 ng total RNA (Nanovue Plus, GE Healthcare Life Sciences) was reverse-transcribed with (cDNA kit VersoTM, Thermo-Fischer). cDNAs were amplified with specific primers (Eurofins mwg operon, Ebersberg, Germany) in a SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Basel, Switzerland). Each primer pair was chosen for best efficiency and controlled for specificity using forward primer 5′-TAG ACA CCA GAT AGA TCA TAG AGC-3′ and reverse primer 5′-ATG ACA CAG TAC AGT GAG AGT CTT-3′ for *Enam*, forward primer 5′-GAT GGC TGC ACC ACC AAA TC-3′ and reverse primer 5′-CTG AAG GGT GTG ACT CGG G-3′ for *Amelx*, and forward primer 5′-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3′ and reverse primer 5′-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3′ for *Gapdh*. Quantitative real-time PCR (qPCR) analyses was carried out using LigthCycler 480.[31] The PCR cycles consisted of an initial preincubation step (95°C for 5 minutes), followed by 45 cycles of amplification (95°C for 5 seconds, 55°C for 5 seconds, 70°C for 10 seconds). *Gapdh* was used as housekeeping gene. Relative gene expression levels were estimated using the deltaCq method.[32]

### In situ hybridization (ISH) analysis

RNA extractions were performed using RNeasy Plus mini kit (Qiagen), and cDNAs were synthetized using the Verso cDNA synthesis kit (Thermo-Fischer). RNA probes were designed using SP6 and T7-tailed oligonucleotides for *Amelx* (forward primer 5′-GCA ACC AAT GAT GCC AGT TC-3′ and reverse primer 5′-AGA GGC AGC TCA GGA AGA AT-3′) and *Enam* (forward primer 5′-ATG TGG CCT GGT ACC AAA TG-3′ and reverse primer 5′-CAT GGT GGT TGT GGA TAG GG-3′). Sense and antisense RNA probes were synthesized and labeled with Digoxigenin-UTP (Roche) using the Riboprobe Combination System SP6/T7 RNA Polymerase kit (Promega) following the manufacturer's instructions. Lower jaws of PN3 WT and *Cldn16*$^{-/-}$ littermate mice ($n = 3$ per group) were embedded in OCT compound before frozen sectioning. Twelve-micrometer-thick undecalcified frozen tissue sections were prepared and fixed in 4% PFA for 10 minutes. ISH was carried out according to standard protocols with sense probes as control.[33]

### Statistical analysis

Values were presented as means and standard deviations. Statistical tests were performed with XLSTAT (v7.5.3, Addinsoft

Software, New York, NY, USA). According to the normality of the distribution, unpaired *t* test or Mann-Whitney's test were used. Welch's *t* test was used when equal variance was not assumed. Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

## Results

### Identification of AI in patients with FHHNC

In this study, we were able to examine five unrelated patients with FHHNC owing to *CLDN16* mutations (Fig. 1*A*). These patients were referred by the national Reference Center for Rare Disorders of Calcium and Phosphorus Metabolism and the Reference Center of Children and Adult Renal Hereditary Disorders (MARHEA), or by the Oral Care Center for Inherited Diseases, Brasilia-Brazil. Their main clinical and biological characteristics are summarized in Table 1. Patient 1 presented with leg bowing from the age of 1 year requiring two osteotomies of lower limbs. At the age of 13 years, she was referred to Robert-Debré University Hospital (Paris, France), where bilateral NC, hypocalcemia, hyperphosphatemia, low 1,25 dihydroxyvitamin D concentration, and hypomagnesemia were first diagnosed with an atypical bone phenotype (bowing of the leg, brachymetacarpy but no sequelae of rickets at the ribs and at the skull). AI was diagnosed at the age of 15 years. She is from a nonconsanguineous family, and *CLDN16* analyses showed that she is compound heterozygous for a novel frameshift variant inherited from the mother and a known missense mutation inherited from the father. Patients 2 and 3 have been previously described by Blanchard and colleagues.[24] Patient 2 had seizures at the age of 8 years, leading to the discovery of severe hypocalcemia, hypomagnesemia, HC, and NC; AI was diagnosed at the age of 26 years. In patient 3, NC was discovered at the age of 8 years during the workup of abdominal pain;

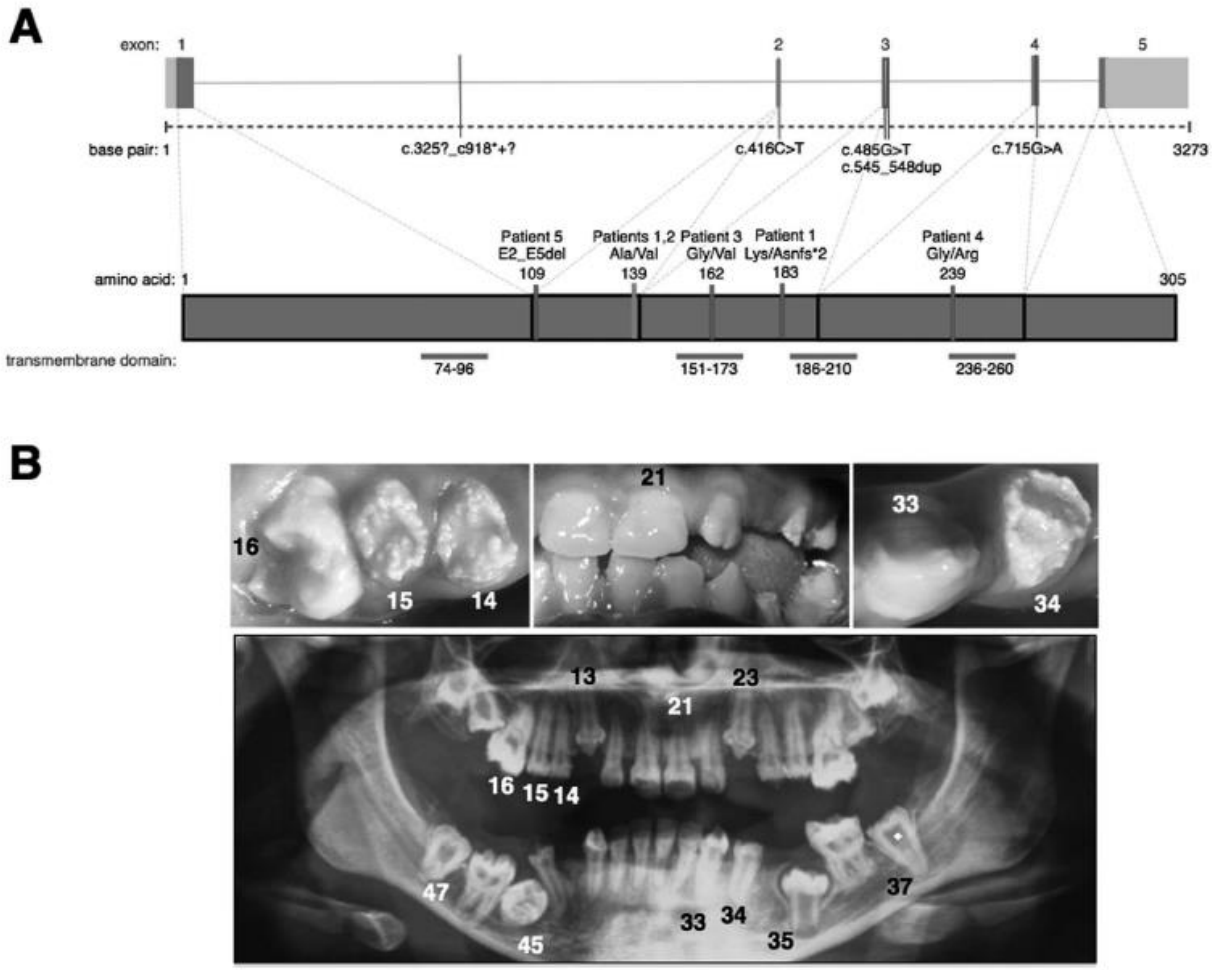



**Fig. 1.** *CLDN16* mutations of the studied patients and dental phenotype of patient 1. (*A*) The coding regions of *CLDN16* (NG_008149.1) are represented in dark blue and non-coding regions in light blue. The horizontal bars are introns. The mutations identified in the 5 patients are localized on the gene sequence as green and red vertical lines. Exons are associated by dotted lines to the schematic representation of the protein where corresponding mutations in the gene sequence are indicated as green and red vertical lines. (*B*) Clinical views and panoramic radiograph images from patient 1. The clinical crowns were shorter with hypoplastic and pitted enamel. Clinical views showed failed eruption, lateral infraclusion associated with abnormal swallowing. The panoramic radiograph highlighted multiple impacted teeth. The second molars showed concave occlusal surface without enamel. Pulp chamber enlargement (◆) was observed in the lower second molars.

hypomagnesemia and HC were first noticed at the age of 20 years. She currently has end-stage renal disease (on renal replacement therapy). AI was diagnosed at the age of 45 years. Patient 4 presented with an episode of gross hematuria at the age of 4 years; abdominal ultrasonography revealed bilateral NC and biological data showed hypomagnesemia and HC. At the age of 6 years, AI was diagnosed and renal function evaluation showed stage 2 chronic kidney disease (CKD). He is from a consanguineous family; accordingly, he is homozygous for a known missense mutation with in vitro confirmed pathogenicity.[22] Patient 5 is a Brazilian patient diagnosed with FHHNC, stage 3 CKD, and AI at the age of 20 years.[34] At 25 years, she reached end-stage renal disease and started dialysis. Her parents are first-degree cousins and she harbors a homozygous *CLDN16* deletion of exons 2 to 5 detected by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Altogether, described and novel mutations detected in these patients are potentially pathogenic. They affect highly conserved residues and in silico analyses of nonexpressed in vitro missense mutations predict these changes as pathogenic (Supplemental Table S1). Furthermore, novel mutations (one frameshift and the large deletion) were not present in either the 1000 Genomes Project database (http://browser.1000genomes.org/index.html) or the NHLBI Exome Variant Server (EVS, http://evs.gs.washington.edu/EVS/) and could result in the production of unstable mRNAs or truncated proteins.

The dental examination revealed that all the patients presented enamel defects (Fig. 1, Supplemental Figs. S1 and S2, and Table 1), including demarcated and diffuse opacities, reduced amount of enamel with pitted defects, and/or horizontal grooves. According to the AI classifications,[7,8] four had hypoplastic enamel (patients 1 to 4) and one had hypomaturation (patient 5). Noteworthy, several permanent teeth had failed to erupt in patients 1 and 2, with persistence of deciduous teeth in the latter. In these patients, cone beam computed tomography (CBCT) revealed reduced follicular space around unerupted teeth, indicating tooth ankylosis (Supplemental Figs. S1 and S2). However, unlike *FAM20A*-associated ERS,[14] no gingival hyperplasia was observed in all the patients with *CLDN16* mutations, and X-ray examination revealed no pulp chamber stone or ectopic gingival calcification.

## Enamel defects in *Cldn16*$^{-/-}$ mice

Dental observations of 3-month-old *Cldn16*$^{-/-}$ mice showed enamel fractures and coronal dentin exposition on molars, especially visible on the lingual cusps of the lower molars (Figs. 2*A* and 3*A*). Quantitative analyses from high-resolution micro-CT of mandible samples demonstrated a significant lower enamel volume in molars of *Cldn16*$^{-/-}$ mice when compared with WT mice ($p < 0.001$; Fig. 2*A*). The phenotype change of the lower incisor, although less obvious than in the molars possibly owing to the continuously growing process, showed a delayed mineralization of enamel surface layer, resulting in a slightly lower enamel volume (Fig. 2*B*). Furthermore, the measure of the incisor enamel surface under M1 and M2 showed that enamel thickness was significantly lower in *Cldn16*$^{-/-}$ under M2 (Fig. 2*C*). SEM analyses showed well-formed enamel rods in *Cldn16*$^{-/-}$ and WT mice (Fig. 3*A*). Using EDX, no difference was detected for calcium content in the enamel of *Cldn16*$^{-/-}$ and WT incisors and a similar calcium-to-phosphorus ratio was found (Fig. 3*B*). Because the detection of magnesium value was below or in the range of the detection limit for the EDX method, LA-ICPMS was used and showed no difference between *Cldn16*$^{-/-}$ and WT ($1140153 \pm 125797$ versus $1002010 \pm 147078$ intensity [cps], respectively). However, nanoindentation analyses revealed a lower Young's modulus, which indicates higher enamel elasticity in *Cldn16*$^{-/-}$ versus WT incisors ($p = 0.040$) (Fig. 3*C*).

## CLDN16 is an integral component of secretory ameloblasts' TJ, and its absence in *Cldn*16$^{-/-}$ mice impairs TJ structure

In the WT mice, *Cldn16* mRNA was found in the kidney as well as in the molar germ (Fig. 4*A*). Immunostaining of the incisor and molar germs revealed that CLDN16 protein was localized in the TJ at the apical end of secretory ameloblasts (Fig. 4*B, C*), where it colocalized with zonula occludens-1 protein (ZO-1) (Fig. 5*A*), but it was not detected in maturation ameloblasts (Supplemental Fig. S3*B*). As expected, CLDN16 was not found by immunostaining in *Cldn16*$^{-/-}$ mice. However, ZO-1 staining appeared diffuse when compared with WT, suggesting alteration in the secretory ameloblasts' TJ in *Cldn16*$^{-/-}$ mice (Fig. 5*A*). When comparing *Cldn16*$^{-/-}$ and WT mice, no difference could be observed in either *Fam20A* or *Cldn19* gene expression in the ameloblasts (secretory and maturation) (Supplemental Fig. S4). Furthermore, histological staining showed that secretory ameloblasts were well polarized and elongated in the forming molar and incisor in both groups (Fig. 5*A*, Supplemental Figs. S3*A* and S5). TEM analyses of WT PN3 incisor showed TJ as adjoining ameloblast membranes converging to form a thin line at the distal end of the cells, giving a quilted appearance to the intercellular junction complex (Fig. 5*B*). The TJ structure appeared different in *Cldn16*$^{-/-}$ secretory ameloblasts, with nonlinear and irregular structures (Fig. 5*B*). Furthermore, phalloidin staining of actin filaments, which are known to be associated with TJ,[35] was irregular in *Cldn16*$^{-/-}$ incisor germs compared with WT (Fig. 5*B*). Altogether, these data indicate that TJ located at the apical end of secretory ameloblasts are impaired in *Cldn16*$^{-/-}$ mice.

## Consequences of CLDN16 deficiency on enamel matrix

We examined the effect of *Cldn16* knockout on the activity of the enamel-specific proteinase MMP-20[36] (enamelysin), which is known to be a major actor of early enamel maturation.[37,38] In situ casein zymographic analyses of MMP-20, performed directly on PN3 incisor sections, clearly evidenced a significantly lower enzymatic activity ($p = 0.015$) in the enamel matrix of *Cldn16*$^{-/-}$ mice when compared with WT (Fig. 6*A*; Supplemental Fig. S6*A*). However, similar expression amounts of this enzyme were revealed in the germ extracts by casein polyacrylamide gel zymography (Supplemental Fig. S6*B*), a biochemical method that measures protease total levels and activation state. Furthermore, immunohistochemistry for MMP-20 revealed a similar labeling in the enamel matrix of *Cldn16*$^{-/-}$ and WT PN3 incisors (Supplemental Fig. S6*B*). Taken together, these data indicate that the reduced activity observed by in situ zymography in the *Cldn16*$^{-/-}$ mice PN3 incisors is not because of defect in either enzyme synthesis or proform activation but rather to a change in the enamel matrix environment, which can inhibit MMP-20 activity.

Because proteinases activity is affected by pH,[39] we measured pH in the forming enamel matrix using the pH-sensitive dye BCECF. A significant lower pH value ($6.79 \pm 0.05$ versus $7.08 \pm 0.05$ pH units, $p < 0.001$) was measured in the enamel matrix of *Cldn16*$^{-/-}$ mice when compared with WT mice

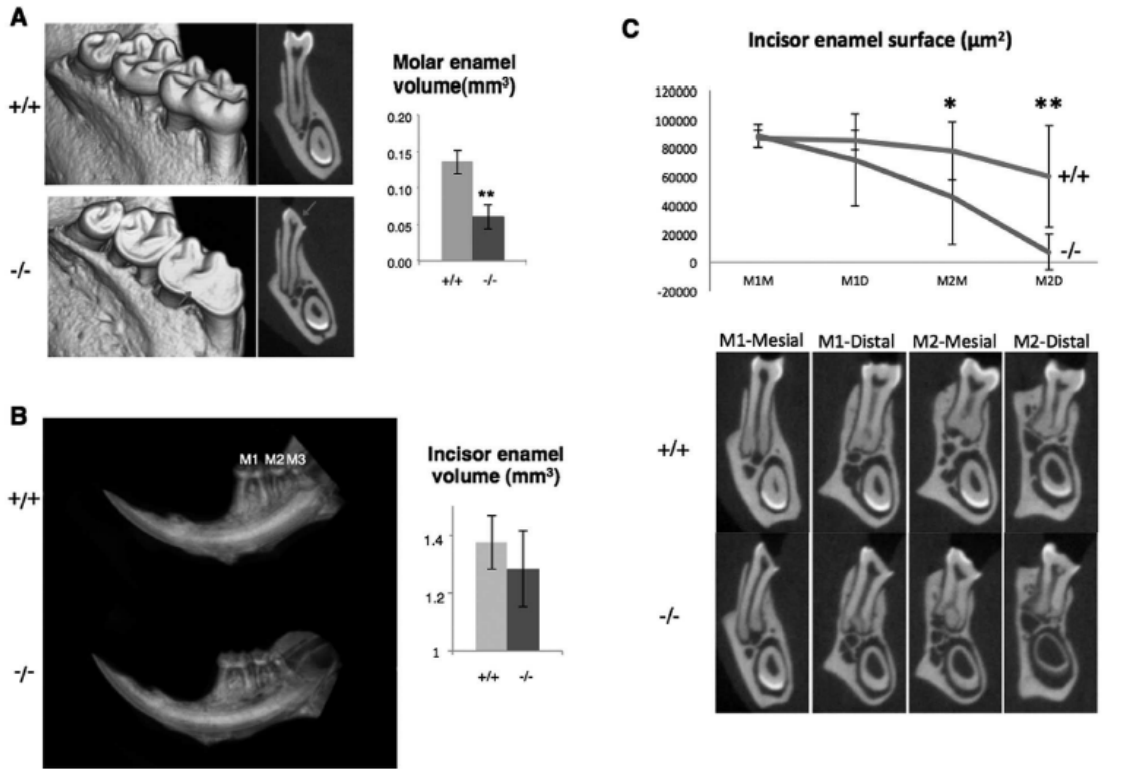



**Fig. 2.** Dental phenotype of 3-month-old *Cldn16*$^{-/-}$ mice. (*A*) 3D volume rendering from micro–CT data and micro–CT sections showed severe enamel loss on lingual molar cusps in *Cldn16*$^{-/-}$ mice (arrow). Quantitative analyses showed a significant lower enamel volume in *Cldn16*$^{-/-}$ mice when compared with WT ($0.061 \pm 0.017$ versus $0.136 \pm 0.016$ mm$^3$, respectively, $p < 0.001$) ($n = 6$ per group). (*B*) Quantitative analyses from high-resolution micro–CT of mandible samples showed a nonsignificant lower enamel volume in incisors of *Cldn16*$^{-/-}$ mice when compared with WT ($n = 6$ per group). In WT mice, incisor mineralization is observed under the third molar (M3), whereas in *Cldn16*$^{-/-}$ mice it is detected under the second molar (M2). (*C*) Quantitative analyses from high-resolution micro–CT of mandible samples showed a significant lower enamel surface in incisors under M2 of *Cldn16*$^{-/-}$ mice when compared with WT ($n = 6$ per group). $^*p < 0.005$, $^{**}p < 0.0001$ WT versus *Cldn16*$^{-/-}$ mice. M1 = first molar.

(Fig. 6*B*). We, therefore, sought to determine whether the modification in the proteolytic activity impaired the processing of enamel proteins in the *Cldn16*$^{-/-}$ PN3 incisors. Western blot analyses of the protein extracts of the soft part of the growing incisor showed significantly higher levels of enamelin in *Cldn16*$^{-/-}$ enamel; a similar, albeit nonsignificant, trend was found with amelogenin (Fig. 6*C* and Supplemental Fig. S7*C*), whereas no difference was observed in gene expression (Supplemental Fig. S7*A, B*). Therefore, our data suggest that the lower pH of the forming enamel matrix and the resulting decreased MMP-20 activity in *Cldn16*$^{-/-}$ mice induced an accumulation of enamel proteins within the matrix.

We then assessed whether the absence of CLDN16 in *Cldn16*$^{-/-}$ mice was associated with a lower pH also during enamel matrix maturation stage. GBHA staining showed two red bands, reflecting the position of smooth-ended maturation ameloblasts (SA).[26,27,40] These bands had a similar profile in both the 3-month-old WT and the *Cldn16*$^{-/-}$ mandibular incisors (Fig. 7). pH measurement across these bands using BCECF fluorescence clearly showed that the pH was significantly lower in the *Cldn16*$^{-/-}$ enamel at the early part of the maturation zone (proximal band). It was similar in the distal band of both groups, albeit slightly lower in the central areas in *Cldn16*$^{-/-}$. These data suggest that impaired amelogenesis in *Cldn16*$^{-/-}$ mice may mainly result from locally disturbed pH control detected during enamel secretion and early maturation.

## Discussion

A great interest has recently been given to kidney diseases associated with the dental disorder amelogenesis imperfecta (AI).[13,41] Here, we described AI in 5 unrelated patients with the kidney disorder FHHNC owing to *CLDN16* mutations. The clinical observations of AI in our patients were supported by the dental examination of *Cldn16*$^{-/-}$ mice, the mouse model of FHHNC, which, similarly to patients, displayed hypercalciuria and hypomagnesemia with normal concentrations of calcium and phosphorus in blood[23] and normal phosphorus level in urine (unpublished data). Adult *Cldn16*$^{-/-}$ mice showed severe enamel loss, easily breakable enamel with underlying dentin exposure in molars, and decreased mineralization in continuously growing lower incisors. The altered dental phenotype of *Cldn16*$^{-/-}$ mice may not be surprising in view of our demonstration that CLDN16 expression is not limited to the kidney as previously thought but is also localized in the TJ of

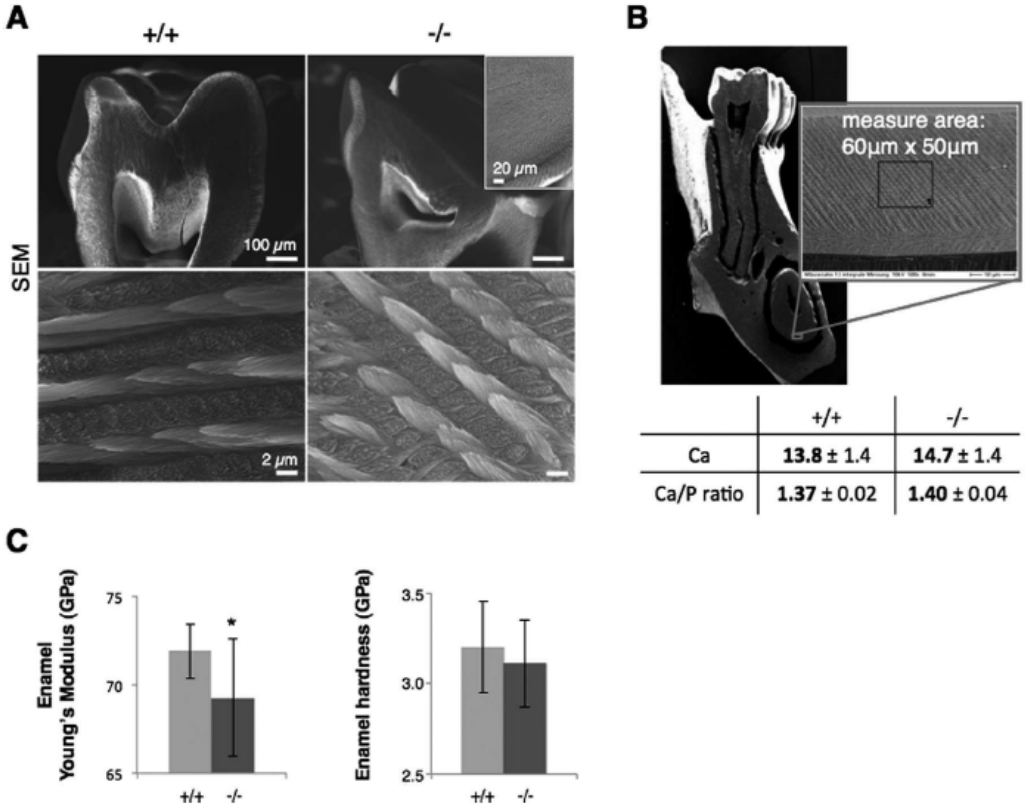



**Fig. 3.** Enamel structure analyses of 3-month-old *Cldn16*$^{-/-}$ mice. (*A*) SEM analyses at the first molar (M1) level showed enamel loss and coronal dentin exposition in *Cldn16*$^{-/-}$ molars when compared with WT. Enamel prisms seemed normally constituted in *Cldn16*$^{-/-}$ incisor when compared with WT ($n = 6$ per group). (*B*) EDX analyses was performed on enamel of the incisor at M1 level and similar calcium (Ca) content and calcium-to-phosphorus (Ca/P) ratio were observed in *Cldn16*$^{-/-}$ and WT mice ($n = 8$ per group). (*C*) Enamel analyses by nanoindentation of the growing lower incisor at the level of M1 showed a decrease in enamel Young's modulus (showing increased enamel elasticity) in *Cldn16*$^{-/-}$ when compared with WT (69.3 ± 3.30 versus 71.9 ± 1.5 GPa, respectively, $p = 0.040$) ($n = 8$ per group). $^{*}p \leq 0.05$, $^{**}p < 0.001$ WT versus *Cldn16*$^{-/-}$ mice. No significant difference was observed in enamel hardness between *Cldn16*$^{-/-}$ and WT mice ($n = 8$ per group).

secretory ameloblasts in the tooth germ. In addition, CLDN16 deficiency resulted in altered TJ structure in *Cldn16*$^{-/-}$ mice. This suggests that the enamel defects observed in patients with FHHNC and *Cldn16*$^{-/-}$ mice cannot be attributable only to the consequences of the kidney disease and the ensuing metabolic disorder but are also directly related to loss of function of CLDN16 within the forming enamel.

Despite the fact that all the mutations detected in our patients are predicted to be pathogenic (Table 1 and Supplemental Table S1), the enamel phenotypes of the 5 studied patients were variable, indicating that different stages of amelogenesis were affected. This phenotype heterogeneity may result from a combination of 1) altered TJ in secretory ameloblasts that affect enamel secretion and concomitant early maturation by MMP-20; 2) calcium and magnesium wasting ensuing from renal impairment early in childhood; and iii) age of onset of renal insufficiency. However, the fact that the latter two conditions were variable between our studied FHHNC patients (Table 1) and the findings that at least patients 1, 2, and 5 (who presented a late onset of the kidney disease) did not present renal insufficiency during enamel formation but nevertheless had severe enamel defects are consistent with the idea that *CLDN16* mutation is per se a direct cause of AI in these patients. Consistently, no dental abnormality has been described in patients with other causes of primary hypomagnesemia, particularly in patients with hypomagnesemia with secondary hypocalcemia caused by mutations of the *TRPM6* gene.[42,43] However, low blood levels of calcium and vitamin D found in patient 1 may have contributed to the abnormal enamel formation in this particular patient, as enamel defects have been reported in patients with vitamin D-dependent rickets and in 1α(OH)ase-null mice and VDR-null mice.[44]

CLDN16 was detected in the TJ at the apical ends of secretory WT ameloblasts, where it colocalized with ZO-1.[45] TJ are known to create suitable microenvironments for enamel deposition and concomitant early maturation by determining the paracellular permeability and selectivity to solutes.[45,46] Our data suggest therefore that, along with ZO-1 and F-actin filaments, CLDN16 is important for TJ assembly process and its loss impairs

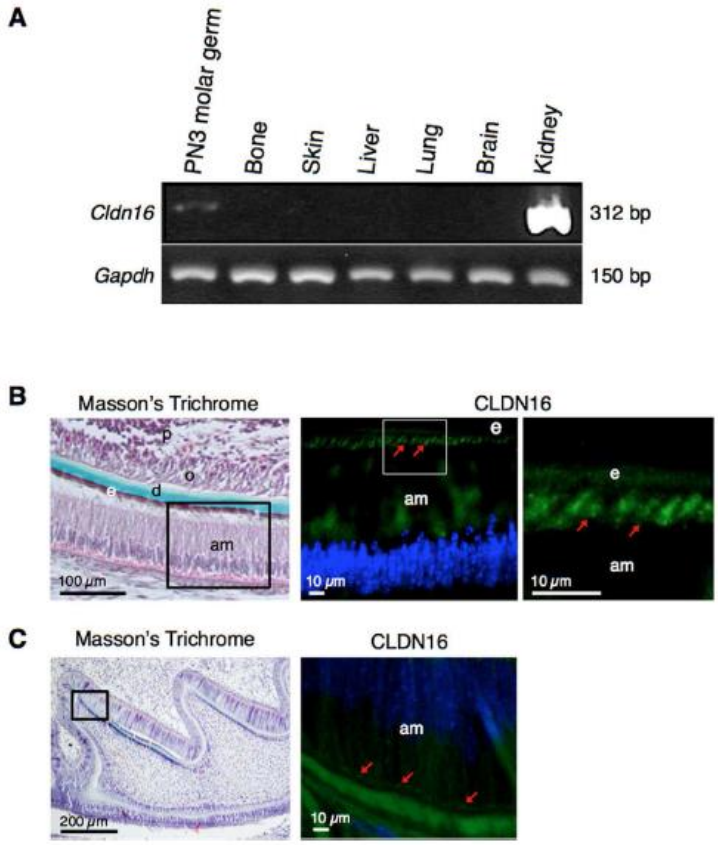



**Fig. 4.** *Cldn16* expression profiling and identification of the protein in secretory ameloblasts. (*A*) *Cldn16* mRNA expression was analyzed in mouse tissues by RT-PCR. A representative gel image of the selected tissues shows *Cldn16* expression in mouse PN3 molar germ and kidney, whereas no mRNA was detected in bone, skin, liver, lung, and brain. (*B*) Identification of CLDN16 in the incisor by immunofluorescence. Masson's Trichrome staining of a sagittal section of PN3 WT incisor showing well-polarized ameloblast layer actively secreting enamel matrix. CLDN16 was expressed at the distal end of secretory ameloblasts (arrows) ($n = 6$ per group). (*C*) Identification of CLDN16 in the PN3 molar germ by immunofluorescence. Masson's Trichrome staining of a sagittal section of PN3 WT molar germ showing the secretory ameloblast layer. CLDN16 was expressed at the distal end of secretory ameloblasts (arrows). am = ameloblasts; e = enamel matrix; o = odontoblasts; d = dentin; p = pulp.

TJ organization in secretory ameloblasts and consequently disturbs enamel formation.

In the kidney, CLDN16 is known to play a central role in reabsorption of divalent cations, but data on its exact mechanism of action are still conflicting.[1,23] Of note, our data suggest that lack of CLDN16 in the tooth may not impair calcium transport across the epithelium because the Ca/P ratio in enamel appears not altered in *Cldn16*$^{-/-}$ mice. The absence of CLDN16 in the secretory ameloblasts resulted in a significantly lower pH in the forming enamel matrix. This lower pH in enamel matrix did not result from systemic acidosis *Cldn16*$^{-/-}$ mice because serum pH was similar in both *Cldn16*$^{-/-}$ mice and WT (Supplemental Fig. S8), suggesting that it resulted from impaired local pH regulation.

The proteolytic activity of MMP-20 during early enamel maturation was shown to be critically dependent on pH values because the ability of MMP-20 to degrade amelogenin substrate at pH 6.4 or pH 8 was almost negligible when compared with that observed at pH 7.2.[47] The drastic effect of pH reported in this study suggests that even the smaller drop of pH observed here (6.8 versus 7.1) is expected to result in a significantly lower MMP-20 activity within the enamel matrix of the *Cldn16*$^{-/-}$ mice. We further report that the lower MMP-20 activity observed in the *Cldn16*$^{-/-}$ forming enamel is associated with the accumulation of enamel matrix proteins, as supported by Western blot analyses and the delay of mineralization observed in the continuously growing incisor. Alterations in these proteins have been shown to affect enamel formation. Amelogenin or enamelin gene mutations were identified in patients with AI with varying clinical phenotypes.[48,49] Furthermore, altered levels of enamelin were shown to impair enamel production.[50] Taken together, these data suggest that CLDN16 loss of function, by modifying environmental factors such as pH, impairs the processing of enamel matrix proteins and disturbs enamel formation, explaining the defects observed both in patients with FHHNC and in *Cldn16*$^{-/-}$ mice.

The importance of a tight control of the extracellular pH on enamel mineralization has been previously emphasized.[51,52]

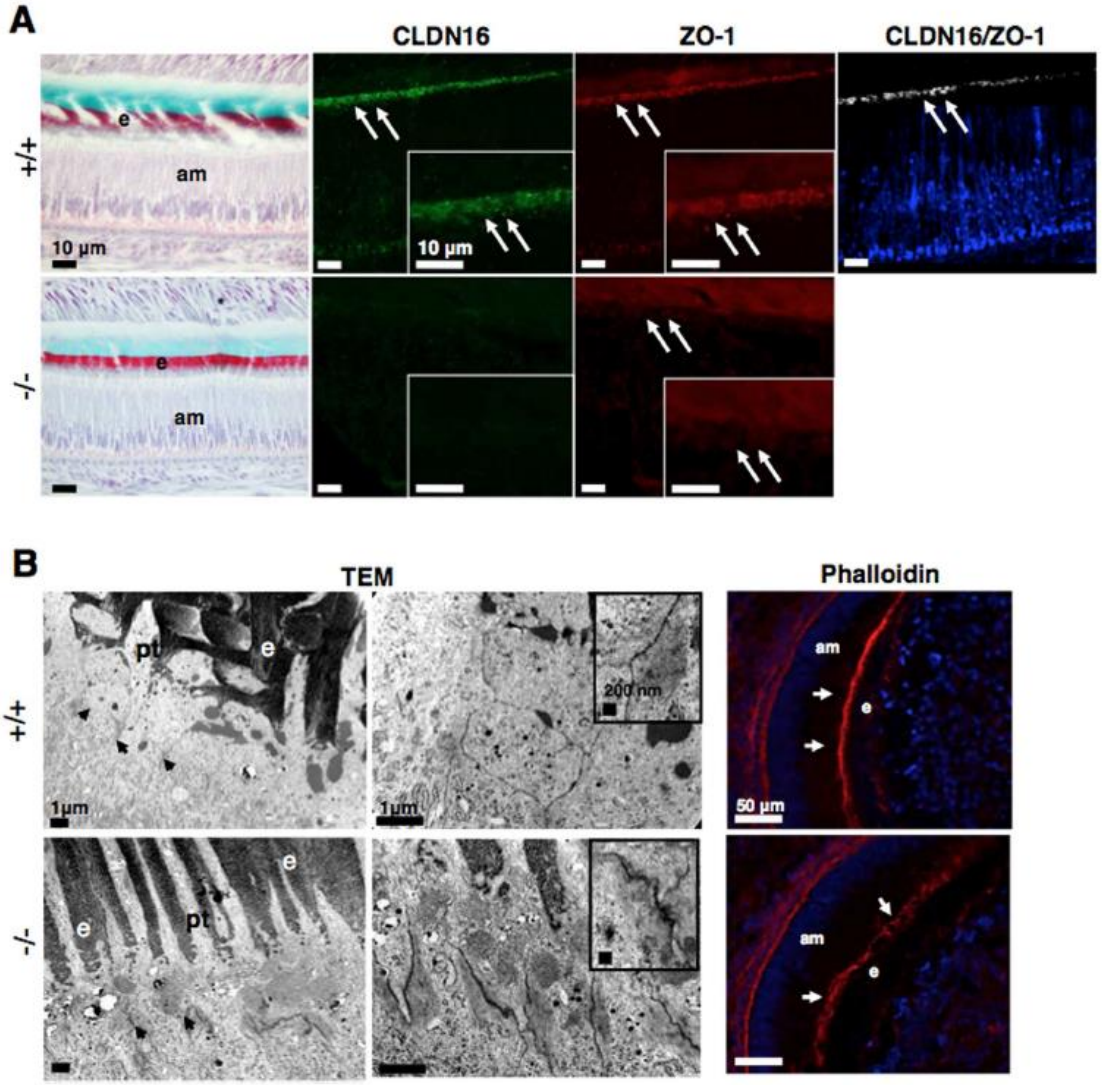



**Fig. 5.** Analysis of secretory ameloblast intercellular junctions in *Cldn16*$^{-/-}$ mice. (*A*) Masson's Trichrome staining of sagittal sections of PN3 incisor showing secretory stage ameloblasts (am) associated at their apical end with the forming enamel matrix (e) stained in red, in *Cldn16*$^{-/-}$ and WT mice. Ameloblasts appeared polarized in both groups with nucleus located at the basal end of the cells. CLDN16 protein was localized at the apical end (arrows) of secretory ameloblasts in WT mice, whereas no signal was observed in *Cldn16*$^{-/-}$ mice. The TJ-associated protein zonula occludens-1 (ZO-1) was localized at the apical end (arrows) of the cells. ZO-1 labeling appeared more diffused in the *Cldn16*$^{-/-}$ mice. CLDN16 colocalized with ZO-1 protein in WT mice (arrows). No colocalization was observed in *Cldn16*$^{-/-}$ mice using identical imaging settings in the two panels ($n = 6$ per group). (*B*) Imaging by TEM at the apical end of secretory ameloblasts of *Cldn16*$^{-/-}$ and WT mice. The adjoining cell membranes in WT mice converged to form a thin line (arrows) in contrast to nonlinear, thicker, and packed structures in *Cldn16*$^{-/-}$ mice (arrows) ($n = 3$ per group). Phalloidin staining of the F-actin filaments located at the distal end (arrows) of ameloblasts showed a linear and continuous network in WT compared with an irregular and disrupted organization in *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 6$ per group). pt = Tomes' process.

Mutations of SLC4 family bicarbonate transporters expressed by ameloblasts (eg, AE2 and NBCe1) result in altered enamel structure in mice and humans.[51,53,54] Recent analyses have demonstrated that repeated pH cycling during the maturation stage allowed the progressive formation of enamel made of near-perfect hydroxyapatite crystals.[26] Phenotype modulation between ruffle-ended (RA) and SA ameloblasts was shown to be associated with removal and restoration of their apical TJ, a mechanism that has been proposed to contribute to local extracellular pH cycling.[18] The lack of CLDN16 protein did not prevent pH cycling but lowered the pH value of the enamel surface. Our finding that the lower pH in *Cldn16*$^{-/-}$ mice was

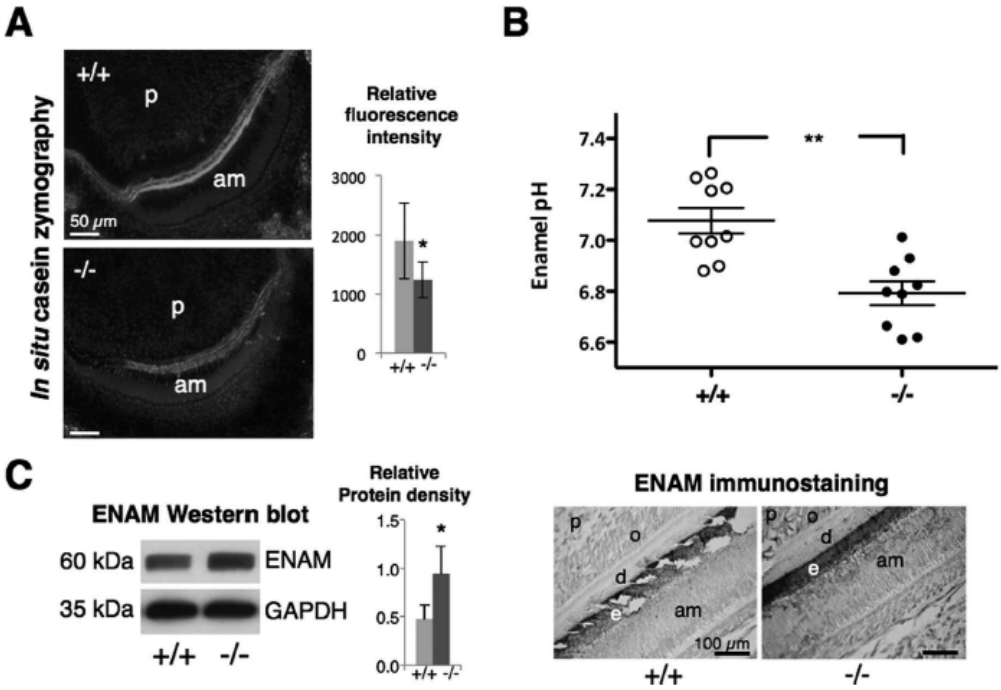



**Fig. 6.** Consequences of *Cldn16* mutation on enamel. (*A*) In situ casein zymographic analyses on PN3 incisor frontal sections showed a decreased enzymatic activity in *Cldn16*$^{-/-}$ when compared with WT enamel (relative intensity: $1233 \pm 303$ in *Cldn16*$^{-/-}$ versus $1895 \pm 645$ in WT, $p = 0.015$) ($n = 6$ per group). (*B*) pH values in the forming enamel matrix associated with secretory ameloblasts were lower in PN3 *Cldn16*$^{-/-}$ incisors than in WT ($6.79 \pm 0.05$ versus $7.08 \pm 0.05$ pH units, $p < 0.001$) ($n = 9$ per group). (*C*) Consequences of the mutation on enamel protein expression. Western blot analyses showed that enamelin (ENAM) was significantly increased in *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($p = 0.05$; $n = 10$ per group). Enamelin immunostaining showed a stronger labeling in the forming enamel matrix of *Cldn16*$^{-/-}$ mice when compared with WT ($n = 6$ per group). am = ameloblasts; e = enamel matrix; o = odontoblasts; d = dentin; p = pulp. $^{*}p \leq 0.05$; $^{**}p < 0.001$ WT versus *Cldn16*$^{-/-}$ mice.

measured in the proximal part of the maturing incisor (less mature), but not in the more distal (more mature) part of the tooth, may explain the attenuated enamel defects found in the continuously growing incisor. Moreover, the fact that CLDN16 protein was detected in the apical TJ of secretory ameloblasts but not of maturation ameloblasts supports the importance of CLDN16 to set the pH gradient across the ameloblast layer during the secretory and early maturation stages.

Recent studies have deciphered ion transporters expression in secretory and maturation ameloblasts and unraveled their role in the cycling of pH necessary for normal enamel formation.[55,56] Further thorough molecular studies are mandatory to understand the mechanisms responsible for the lower enamel pH in the *Cldn16*$^{-/-}$ mice and whether it involves changes in TJ function as previously shown for claudin-18 deficiency in the stomach[57] or changes in the expression of plasma membrane transporters.

In conclusion, this study reports enamel abnormalities in patients with FHHNC owing to *CLDN16* mutations, disclosing for the first time a defect in a TJ protein as a cause of a dental disorder. The examination of more patients with *CLDN16* mutations will be necessary to establish a reliable genotype/phenotype association. Assessing whether patients harboring mutations in genes encoding other TJ proteins or ion transporters present in AI also appears mandatory. Our study also suggests that a professional dental examination of patients affected by renal disorders should become a standard to accelerate proper molecular diagnosis, phenotyping, and appropriate care.

## Disclosures

All authors state that they have no conflicts of interest.

## Acknowledgments

We thank Jérémy Sadoine (EA2496 and PIPA, Paris Descartes University, France) for his help producing micro–CT data; Stefanie Wahl and Sylke Meyer (Fraunhofer Institute for Mechanics of Materials IWM, Germany) for their help producing LA-ICPMS data; Plateforme Genomique (INSERM U1016, Paris, France) for their help producing qPCR data; Prof Lionel Moisan (UFR de Mathématique, Paris Descartes University, France) for his help with biostatistics; Lydie Cheval (INSERM UMRS 1138, Cordeliers Research Center, Paris-Diderot, Pierre et Marie Curie and Paris Descartes Universities, CNRS ERL 8228, Paris, France) for measuring blood pH in mice; and Gilles Carpentier for imaging sessions (CRRET, Paris-Est University, France). We thank

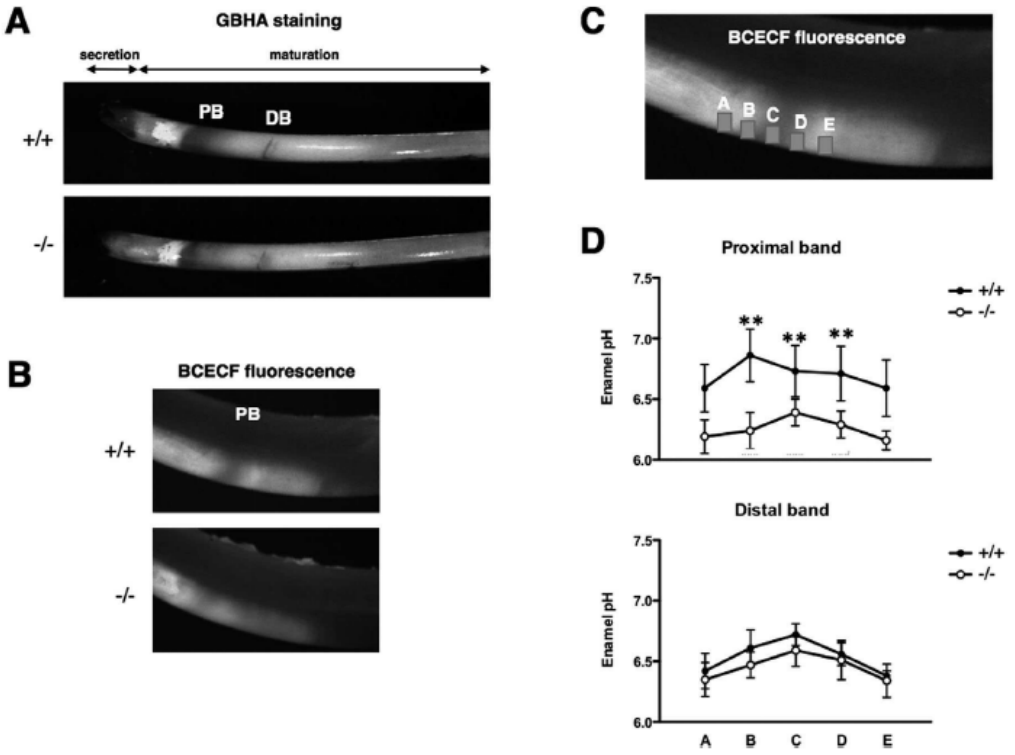



**Fig. 7.** pH measurement in maturation zone enamel. (*A*) Labial views of lower incisors stained with GBHA showing a proximal band (PB) and a distal band (DB) in the maturation zone of 3-month-old littermate WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice ($n = 6$ per group). These bands correspond to the region of smooth-ended (SA) maturation ameloblasts. (*B*) Opposite lower incisors of WT and *Cldn16*$^{-/-}$ mice treated with the fluorescent dye BCECF. (*C*) For each band, pH values were measured in the 5 areas A–E indicated in the upper panel by the squares according to Damkier and colleagues.[26] (*D*) Graphs showing the distribution of pH values across the SA bands. In the proximal band (close to the secretory stage), a significant lower pH was measured in *Cldn16*$^{-/-}$ mice in B, C, and D areas. In the distal band, no significant difference was detected between WT and KO. $^{**}p < 0.001$ WT versus *Cldn16*$^{-/-}$ mice.

Prof Marc McKee (McGill University, Canada) and Prof Yoshiro Takano (Tokyo Medical and Dental University, Japan) for their help regarding the study of enamel maturation stage.

This work was supported by grants from Paris Descartes University, from Fondation pour la Recherche Médicale for EA2496 and PIPA (FRM DGE20111123012), and the grant IDEX Sorbonne Paris Cité "Once upon a tooth." YW (postdoctoral position) was supported by the French Chinese Foundation for Science and Applications (FFSCA), Académie des Sciences, and the China Scholars Council (CSC). DM and TB were supported by the Berlin Institue of Health. Parts of this study (nanoindentation, EDX, and LA-ICPMS) were financially supported by the Investitionsbank Sachsen-Anhalt, Germany (ZWB 1304/00006). CAPES-COFECUB supported PMY, AB, FN, and ACA.

Authors' roles: Study design: CB, AL, RVP, DM, PH, and CC. Study conduct: CC and PH. Data collection: CB, FC, WY, MK, BS, SR, JT, PMY, GR, MLF, TB, AGC, BV, DLM, BB, TG, AS, JMM, DB, GL, MM, JH, PCL, MCM, JCF, DT, RD, FN, DZ, ACA, RVP, PH, and CC. Data analysis: CB, FC, WY, MK, BS, SR, PMY, AGC, TG, AS, GL, MM, AK, MP, SM, ACA, RVP, DM, PH, and CC. Data interpretation CB, FC, WY, SM, RVP, DM, PH, and CC. Drafting manuscript: CB, SM, RVP, DM, PH, and CC. Revising manuscript content: CB, FC, BS, PMY, AB, AK, MP, SM, AL, ACA, RVP, DM, PH, and CC. Approving final version of manuscript: CB, FC, WY, MK, BS, SR, JT, PMY, GR, MLF, TB, AGC, BV, DLM, BB, TG, AS, JMM, DB, GL, MM, JH, PCL, MCM, JCF, DT, RD, FN, DZ, AB, AK, MP, SM, AL, ACA, RVP, DM, PH, and CC. CC and PH take responsibility for the integrity of the data analysis.

## References

1. Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev. 2013;93(2):525–69.
2. Simon DB, Lu Y, Choate KA, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg2+ resorption. Science. 1999;285(5424):103–6.
3. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, et al. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(36):15350–5.
4. Weber S, Schneider L, Peters M, et al. Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. J Am Soc Nephrol. 2001;12(9):1872–81.
5. MacGibbon D. Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. Aust Dent J. 1972;17(1):61–3.
6. Lubinsky M, Angle C, Marsh PW, Witkop CJ Jr. Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal

concentration, and possible abnormality of calcium metabolism. Am J Med Genet. 1985;20(2):233–43.

7. Wright JT. The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. Am J Med Genet A. 2006;140(23):2547–55.
8. Poulsen S, Gjorup H, Haubek D, et al. Amelogenesis imperfecta—a systematic literature review of associated dental and oro-facial abnormalities and their impact on patients. Acta Odontol Scand. 2008;66(4):193–9.
9. Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. Orphanet J Rare Dis. 2007;2:17.
10. Cetrullo N, Guadagni MG, Piana G. Two cases of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: dental findings. Eur J Paediatr Dent. 2006;7(3):146–50.
11. Jaureguiberry G, De la Dure-Molla M, Parry D, et al. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations. Nephron Physiol. 2012;122(1–2):1–6.
12. Wang SK, Aref P, Hu Y, et al. FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS). PLoS Genet. 2013;9(2):e1003302.
13. Wang SK, Reid BM, Dugan SL, et al. FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome. J Dent Res. 2014;93(1):42–8.
14. De la Dure-Molla M, Quentric M, Yamaguti PM, et al. Pathognomonic oral profile of enamel renal syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. Orphanet J Rare Dis. 2014;9(1):84.
15. Kantaputra PN, Kaewgahya M, Khemaleelakul U, et al. Enamel-renal-gingival syndrome and FAM20A mutations. Am J Med Genet A. 2014;164A(1):1–9.
16. O'Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, et al. Whole-exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. Am J Hum Genet. 2011;88(5):616–20.
17. Cho SH, Seymen F, Lee KE, et al. Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. Hum Mutat. 2012;33(1):91–4.
18. Bartlett JD, Smith CE. Modulation of cell-cell junctional complexes by matrix metalloproteinases. J Dent Res. 2013;92(1):10–7.
19. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. Crit Rev Oral Biol Med. 1998;9(2):128–61.
20. Ohazama A, Sharpe PT. Expression of claudins in murine tooth development. Dev Dyn. 2007;236(1):290–4.
21. Godron A, Harambat J, Boccio V, et al. Familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: phenotype-genotype correlation and outcome in 32 patients with CLDN16 or CLDN19 mutations. Clin J Am Soc Nephrol. 2012;7(5):801–9.
22. Hou J, Renigunta A, Konrad M, et al. Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. J Clin Invest. 2008;118(2):619–28.
23. Will C, Breiderhoff T, Thumfart J, et al. Targeted deletion of murine Cldn16 identifies extra- and intrarenal compensatory mechanisms of Ca2+ and Mg2+ wasting. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;298(5):F1152–61.
24. Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, et al. Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. Kidney Int. 2001;59(6):2206–15.
25. Yamakoshi Y, Richardson AS, Nunez SM, et al. Enamel proteins and proteases in Mmp20 and Klk4 null and double-null mice. Eur J Oral Sci. 2011;119(Suppl 1):206–16.
26. Damkier HH, Josephsen K, Takano Y, Zahn D, Fejerskov O, Frische S. Fluctuations in surface pH of maturing rat incisor enamel are a result of cycles of H(+)-secretion by ameloblasts and variations in enamel buffer characteristics. Bone. 2014;60:227–34.
27. Takano Y, Crenshaw MA, Bawden JW, Hammarstrom L, Lindskog S. The visualization of the patterns of ameloblast modulation by the glyoxal bis(2-hydroxyanil) staining method. J Dent Res. 1982;Spec No:1580–7.
28. McKee MD, Warshawsky H. Modification of the enamel maturation pattern by vinblastine as revealed by glyoxal bis(2-hydroxyanil) staining and 45calcium radioautography. Histochemistry. 1986;86(2):141–5.
29. McKee MD, Warshawsky H. Effects of various agents on staining of the maturation pattern at the surface of rat incisor enamel. Arch Oral Biol. 1986;31(9):577–85.
30. Khaddam M, Huet E, Vallee B, et al. EMMPRIN/CD147 deficiency disturbs ameloblast-odontoblast cross-talk and delays enamel mineralization. Bone. 2014;66:256–66.
31. Roche PC, Ryan RJ, McCormick DJ. Identification of hormone-binding regions of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor using synthetic peptides. Endocrinology. 1992;131(1):268–74.
32. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.
33. Bardet C, Vincent C, Lajarille MC, Jaffredo T, Sire JY. OC-116, the chicken ortholog of mammalian MEPE found in eggshell, is also expressed in bone cells. J Exp Zool B Mol Dev Evol. 2010;314(8):653–62.
34. Yamaguti PM, dos Santos PA, Leal BS, et al. Identification of the first large deletion in the CLDN16 gene in a patient with FHHNC and late-onset of chronic kidney disease: case report. BMC Nephrol. 2015;16:92.
35. Fanning AS, Ma TY, Anderson JM. Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. FASEB J. 2002;16(13):1835–7.
36. Turk BE, Lee DH, Yamakoshi Y, et al. MMP-20 is predominately a tooth-specific enzyme with a deep catalytic pocket that hydrolyzes type V collagen. Biochemistry. 2006;45(12):3863–74.
37. Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. Crit Rev Oral Biol Med. 1999;10(4):425–41.
38. Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. Biol Chem. 2008;389(6):695–700.
39. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 2003;92(8):827–39.
40. McKee MD, Warshawsky H. Banding patterns in rat incisor enamel stained by histochemical complexing methods for calcium. Anat Rec. 1989;224(1):7–13.
41. Martelli-Junior H, dos Santos Neto PE, de Aquino SN, et al. Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: a case report and review of the literature. Nephron Physiol. 2011;118(3):p62–5.
42. Konrad M, Schlingmann KP. Inherited disorders of renal hypomagnesaemia. Nephrol Dial Transplant. 2014;29(Suppl 4):iv63–71.
43. Lainez S, Schlingmann KP, van der Wijst J, et al. New TRPM6 missense mutations linked to hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. Eur J Hum Genet. 2014;22(4):497–504.
44. Foster BL, Nociti FH Jr, Somerman MJ. The rachitic tooth. Endocr Rev. 2014;35(1):1–34.
45. Hata M, Kawamoto T, Kawai M, Yamamoto T. Differential expression patterns of the tight junction-associated proteins occludin and claudins in secretory and mature ameloblasts in mouse incisor. Med Mol Morphol. 2010;43(2):102–6.
46. Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. Differential expression of the tight junction proteins, claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, and PAR3, in the ameloblasts of rat upper incisors. Anat Rec (Hoboken). 2008;291(5):577–85.
47. Fukae M, Tanabe T, Uchida T, et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. J Dent Res. 1998;77(8):1580–8.
48. Chan HC, Mai L, Oikonomopoulou A, et al. Altered enamelin phosphorylation site causes amelogenesis imperfecta. J Dent Res. 2010;89(7):695–9.
49. Lee KE, Lee SK, Jung SE, et al. A novel mutation in the AMELX gene and multiple crown resorptions. Eur J Oral Sci. 2011;119(Suppl 1):324–8.
50. Hu JC, Hu Y, Lu Y, et al. Enamelin is critical for ameloblast integrity and enamel ultrastructure formation. PloS One. 2014;9(3):e89303.
51. Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML. Regulation of pH during amelogenesis. Calcif Tissue Int. 2010;86(2):91–103.

52. Lyman GE, Waddell WJ. pH gradients in the developing teeth of young mice from autoradiography of [14C]DMO. Am J Physiol. 1977;232(4):F364–7.

53. Jalali R, Guo J, Zandieh-Doulabi B, et al. NBCe1 (SLC4A4) a potential pH regulator in enamel organ cells during enamel development in the mouse. Cell Tissue Res. 2014;358(2):433–42.

54. Demirci FY, Chang MH, Mah TS, Romero MF, Gorin MB. Proximal renal tubular acidosis and ocular pathology: a novel missense mutation in the gene (SLC4A4) for sodium bicarbonate cotransporter protein (NBCe1). Mol Vision. 2006;12:324–30.

55. Josephsen K, Takano Y, Frische S, et al. Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;299(6):C1299–307.

56. Lacruz RS, Smith CE, Kurtz I, Hubbard MJ, Paine ML. New paradigms on the transport functions of maturation-stage ameloblasts. J Dent Res. 2013;92(2):122–9.

57. Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, et al. Deficiency of claudin-18 causes paracellular H+ leakage, up-regulation of interleukin-1beta, and atrophic gastritis in mice. Gastroenterology. 2012;142(2):292–304.

58. Konrad M, Hou J, Weber S, et al. CLDN16 genotype predicts renal decline in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. J Am Soc Nephrol. 2008;19(1):171–81.

- **ANNEXE 2**: Claire Bardet, **Sandy Ribes,** Yong Wu, Mamadou Tidiane Diallo, Benjamin Salmon, Breiderhoff Tilman, Pascal Houillier, Dominik Muller, Catherine Chaussain (2017) "Claudin loss-of-function impairs amelogenesis affecting tight junction structure". Front. Physiol.

frontiers in Physiology

PERSPECTIVE
published: 24 May 2017
doi: 10.3389/fphys.2017.00326

# Claudin Loss-of-Function Disrupts Tight Junctions and Impairs Amelogenesis

*Claire Bardet*[1]*, *Sandy Ribes*[1], *Yong Wu*[1,2], *Mamadou Tidiane Diallo*[1], *Benjamin Salmon*[1,3], *Tilman Breiderhoff*[4], *Pascal Houillier*[5], *Dominik Müller*[4] and *Catherine Chaussain*[1,3]

[1] Laboratory Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies, Dental School, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, [2] Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Department of Oral and Cranio-maxillofacial Science, Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China, [3] Department of Odontology, AP-HP, and Reference Center for Rare Dieases of the Metabolism of Calcium and Phosphorus, Nord Val de Seine Hospital (Bretonneau), Paris, France, [4] Department of Pediatric Nephrology, Charité University School of Medicine, Berlin, Germany, [5] Cordeliers Research Center, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale UMRS 1138, Paris-Diderot, Pierre et Marie Curie and Paris Descartes Universities, EPL, Paris, France

Claudins are a family of proteins that forms paracellular barriers and pores determining tight junctions (TJ) permeability. Claudin-16 and -19 are pore forming TJ proteins allowing calcium and magnesium reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop (TAL). Loss-of-function mutations in the encoding genes, initially identified to cause Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis (FHHNC), were recently shown to be also involved in *Amelogenesis Imperfecta* (AI). In addition, both claudins were expressed in the murine tooth germ and *Claudin-16* knockout (KO) mice displayed abnormal enamel formation. Claudin-3, an ubiquitous claudin expressed in epithelia including kidney, acts as a barrier-forming tight junction protein. We determined that, similarly to claudin-16 and claudin-19, claudin-3 was expressed in the tooth germ, more precisely in the TJ located at the apical end of secretory ameloblasts. The observation of *Claudin-3* KO teeth revealed enamel defects associated to impaired TJ structure at the secretory ends of ameloblasts and accumulation of matrix proteins in the forming enamel. Thus, claudin-3 protein loss-of-function disturbs amelogenesis similarly to claudin-16 loss-of-function, highlighting the importance of claudin proteins for the TJ structure. These findings unravel that loss-of-function of either pore or barrier-forming TJ proteins leads to enamel defects. Hence, the major structural function of claudin proteins appears essential for amelogenesis.

**Keywords:** ***Amelogenesis Imperfecta*, enamel, barrier-forming tight junction protein, pore-forming tight junction protein, claudins**

OPEN ACCESS

***Edited by:***
*Alexandre Rezende Vieira, University of Pittsburgh, United States*

***Reviewed by:***
*Yuqiao Zhou, University of Pittsburgh, United States*
*Claudio Cantù, University of Zurich, Switzerland*
*Jan Hu, University of Michigan, United States*

***Correspondence:**
*Claire Bardet*
*claire.bardet@parisdescartes.fr*

***Specialty section:***
*This article was submitted to Craniofacial Biology and Dental Research, a section of the journal Frontiers in Physiology*

***Received:*** *27 March 2017*
***Accepted:*** *05 May 2017*
***Published:*** *24 May 2017*

***Citation:***
*Bardet C, Ribes S, Wu Y, Diallo MT, Salmon B, Breiderhoff T, Houillier P, Müller D and Chaussain C (2017) Claudin Loss-of-Function Disrupts Tight Junctions and Impairs Amelogenesis. Front. Physiol. 8:326. doi: 10.3389/fphys.2017.00326*

Epithelial cells are attached to each other at their lateral membranes by a complex of intercellular junctions (Farquhar and Palade, 1963). The most apical complex of the intercellular junctions is the *zona occludens* also named tight junctions (TJ). TJ represent the principal component of the paracellular diffusion barrier by determining epithelial permeability of small molecules and water, and participate in the control of the diffusion of membrane components between the basolateral and apical regions. Abrogation of such a barrier function in epithelia that interfaces with the environment is associated with a variety of gastrointestinal (Barmeyer et al., 2017), renal (Hou, 2014), and cutaneous disorders (Basler and Brandner, 2017). TJ are composed of several

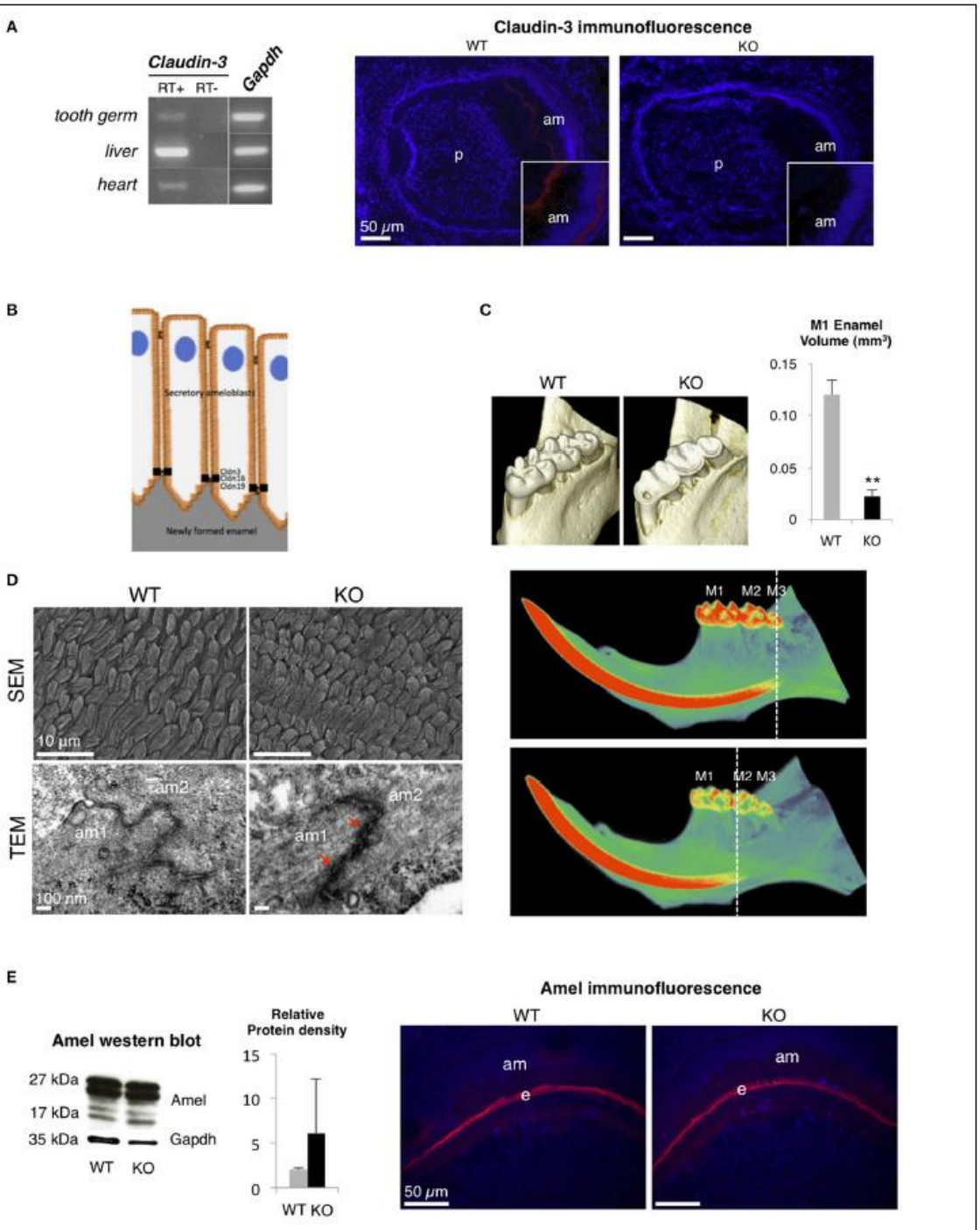



**FIGURE 1 | Dental phenotype of *Claudin-3* KO mice. (A)** *Claudin-3* mRNA expression was analyzed in mouse tissues by RT-PCR using forward primer 5′-ATG TGG CGC GTT TCG-3′ and reverse primer 5′-GCG AGT CGT ACA TTT TGC-3′ for *Claudin-3* (124 bp), and forward primer 5′-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3′ and reverse primer 5′-TTG CTG TTG AAG TCG CAG GAG-3′ for *Gapdh* (150 bp). A representative gel image of the selected tissues showed *Claudin-3* expression in

*(Continued)*

**FIGURE 1 | Continued**
mouse in post-natal day 3 tooth germ, liver and heart. Identification of claudin-3 in the continuously growing incisor was performed by immunofluorescence using claudin-3 antibody (#34-1700, Invitrogen) at 1/100 dilution and a Goat anti-Rabbit antibody (#R-6394, Invitrogen). Claudin-3 was localized at the distal end of secretory ameloblasts (am). Protein expression was also observed at the basal end of the cells ($n = 3$ per group). (p) pulp. **(B)** Recapitulative schema of claudin TJ proteins expression at the apical end of secretory ameloblasts. Claudin-3, -16, and -19 were shown to be expressed at TJ level of ameloblast secretory ends during enamel formation in the mouse. **(C)** 3D volume rendering from Micro-CT data showed severe enamel loss on lingual molar cusps in *Claudin-3* KO mice. Quantitative analysis confirmed a significant lower enamel volume in *Claudin-3* KO mice when compared to WT (0.022 vs. 0.120 $mm^3$ respectively) ($n = 8$ per group). In WT mice, incisor mineralization is observed under the third molar (M3) whereas in *Claudin-3* KO mice it is detected under the second molar (M2). $^{**}P < 0.00001$ (M1) first molar. **(D)** Scanning electron microscopy (SEM) analysis showed enamel prisms normally constituted in *Claudin-3* KO incisor when compared to WT ($n = 3$ per group). Transmission electron microscopy (TEM) analysis of WT tooth germs showed TJ as adjoining ameloblast membranes converging to form a thin intermediate line at the distal end of the cells. In contrast, the TJ structure was altered in *Claudin-3* KO tooth germs, with thicker and packed structures (red arrows). (am) ameloblast. **(E)** Enamel matrix protein expression by secretory ameloblasts of *Claudin-3* KO mice ($n = 3$ per group). Western blot analysis of the protein extracts of the soft part of the growing incisor showed slightly higher levels of amelogenin (amel). No difference was observed by immunostaining regarding amelogenin expression in the forming enamel matrix (e) between *Claudin-3* KO and WT incisors.

transmembrane and membrane-associated proteins including the claudin proteins. Claudins form either paracellular barrier or pores that determine TJ properties. They interact with each other and with additional membrane and non-membrane proteins, such as the intracellular *zonula occludens* ZO-1 and ZO-2 and other PDZ domain-containing proteins. Claudins are considered as core components of TJ strands and determine epithelial permeability of small molecules and water (Gunzel and Yu, 2013). Only few claudins are unequivocally qualified as pore-forming proteins, including claudin-2, -10b, and -15 as cation pores and claudin-10a and -17 as anion pores. Other claudins have been reported to form pores only when specifically interacting with another claudin (Gunzel and Yu, 2013). Such is the case of claudin-16 and claudin-19, which form a cation-selective TJ complex in the thick ascending limb of Henle's loop (Hou et al., 2008).

Mineral transport involves the epithelial permeability which is tightly related to the type and properties of TJ. During amelogenesis, secretory ameloblast TJ are responsible for restricted paracellular access to the enamel compartment. The paracellular permeability (tightness) of the ameloblast layer depends on the composition of TJ relying on claudin proteins. Hence, a combination of different claudins may either allow some paracellular ion passage or restrict this passage (Denker and Sabath, 2011; Bronckers, 2017). To date, 11 claudins have been identified in the tooth germ at various developmental stages (Ohazama and Sharpe, 2007; Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017). We recently associated the abrogation of a pore function and a dental disorder. Indeed, we demonstrated that loss-of-function mutations in *Claudin-16 and -19* (*CLDN16* and *19*) genes, initially identified to cause Familial Hypomagnesemia with Hypercalciuria and Nephrocalcinosis (FHHNC), also resulted in *Amelogenesis Imperfecta (AI)* (Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017). At the time of this discovery, it was acknowledged that claudin-16 and -19 were mainly expressed in the thick ascending limb of Henle loop in the kidney, suggesting that the *AI* diagnosed in patients with FHHNC was a consequence of the disturbed mineral homeostasis. However, we were able to show that claudin-16 and claudin-19 were also expressed in the ameloblast TJ, indicating that the *AI* diagnosed in patients with FHHNC was an intrinsic consequence of the *Claudin* mutation. Furthermore, studying *Claudin-16* Knockout (KO) mice, we showed that the structure of ameloblast TJ was altered.

Claudin-3, which is expressed in epithelia of a wide variety of organs such as intestine, kidney, liver, skin, and lung, acts as a barrier-forming TJ protein (Milatz et al., 2010; Gunzel and Yu, 2013). To analyze the substantial role of a barrier-forming TJ protein in amelogenesis, we explored the dental phenotype of *Claudin-3* KO mice using the methods previously described in Bardet et al. (2016) (ethical agreement D92-049-01). We first determined that, similar to claudin-16 and claudin-19 (Bardet et al., 2016; Yamaguti et al., 2017), claudin-3 was expressed in the tooth germ and located in the TJ at the apical end of secretory ameloblasts (**Figures 1A,B**). Dental examination of adult *Claudin-3* KO mice revealed a lower enamel volume in molars when compared to WT mice and a mineralization delay in the continuously growing incisor (**Figure 1C**). At the structural level, when examining the forming enamel in the intrabony part of the incisor, we observed normally formed prisms by scanning electron microscopy in *Claudin-3* KO mice (**Figure 1D**). However, transmission electron microscopy (TEM) analysis of tooth germs showed altered TJ structure in *Claudin-3* KO ameloblasts displaying thicker and packed structures compared to the thin intermediate line observed in the WT mice (**Figure 1D**). At the molecular level, enamel matrix formation was disturbed by claudin-3 deficiency, manifesting by an accumulation of enamel proteins further confirmed by Western blot analysis of the protein extracts of the soft part of the growing incisor (**Figure 1E**). Thus, claudin-3 protein loss-of-function disturbs amelogenesis similar to claudin-16 loss-of-function, where accumulation of enamel matrix protein led to *Amelogenesis Imperfecta* (Bardet et al., 2016).

During amelogenesis, TJ are composed of pore- and barrier-forming claudin proteins. Deficiency of both types of claudin proteins in murine models as well as in human disorders such as FHHNC led to enamel defects. To date, no human disease was associated with *CLDN3* mutation. Interestingly, the hemizygous contiguous gene microdeletion at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome (WBS; OMIM 194050) includes the *CLDN3* gene (Dutra et al., 2011) and several dental manifestations have been reported in patients with WBS, including hypodontia, abnormal tooth shape (microdontia), but also hypoplastic enamel defects and higher caries susceptibility (Hertzberg et al., 1994; Axelsson et al., 2003).

Our observations highlight the importance of claudin proteins for TJ structure. Indeed, either barrier or a pore forming claudins

link to adaptor proteins such as ZO proteins and other PDZ protein family of the cytosolic TJ plaque. This interaction allows direct or indirect bonding to actin, anchoring the TJ within the underlying cytoskeleton. This scaffold facilitates the assembly of highly ordered structures, such as junctional complexes, regulating epithelial cell polarity, proliferation and differentiation (Sluysmans et al., 2017). This is consistent with our data showing a disturbed actin filament network at apical end of ameloblasts and a more diffused ZO-1 labeling in *Claudin-16* KO mice (Bardet et al., 2016). Claudins are necessary for the TJ assembly process and their loss impairs TJ organization in ameloblasts and consequently disturbs enamel formation.

Overall, although TJ insure suitable microenvironments for enamel deposition and concomitant early maturation by determining the paracellular permeability and selectivity of solutes, the ion transport is tightly regulated during amelogenesis, involving barrier or channel properties of a certain claudin. Impaired TJ structure resulting from claudin loss-of function disturbs enamel formation. Hence, the major structural function of claudin proteins appears essential for amelogenesis.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB and CC wrote the manuscript with contributions from all authors. CB, SR, YW, and CC contributed to the design of the experiments. CB, SR, YW, MD, BS, TB, PH, DM, and CC performed and analyzed experiments. CB and CC supervised the project. All authors reviewed and approved the final version of the manuscript.

## FUNDING

This work was supported by grants from Paris Descartes University, from Foundation pour la Recherche Médicale for EA2496 and Plateforme d'Imagerie du Vivant Paris Descartes (FRM DGE20111123012). DM was supported by a CRG grant of the Berlin Institute of Health. YW (post-doctoral position) was supported by the French Chinese Foundation for Science and Applications (FFSCA), Académie des Sciences, and the China Scholars Council (CSC).

## ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Stephane Le Goff (EA 4462, Paris Descartes University, France) for his help producing SEM data, and Jean-Marc Massé and Alain Schmitt (Cochin Institute, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Paris Descartes University, France) for their help producing TEM data.

## REFERENCES

Axelsson, S., Bjornland, T., Kjaer, I., Heiberg, A., and Storhaug, K. (2003). Dental characteristics in Williams syndrome: a clinical and radiographic evaluation. *Acta Odontol. Scand.* 61, 129–136. doi: 10.1080/00016350310001451

Bardet, C., Courson, F., Wu, Y., Khaddam, M., Salmon, B., Ribes, S., et al. (2016). Claudin-16 deficiency impairs tight junction function in ameloblasts, leading to abnormal enamel formation. *J. Bone Miner. Res.* 31, 498–513. doi: 10.1002/jbmr.2726

Barmeyer, C., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2017). Active and passive involvement of claudins in the pathophysiology of intestinal inflammatory diseases. *Pflugers Arch.* 469, 15–26. doi: 10.1007/s00424-016-1914-6

Basler, K., and Brandner, J. M. (2017). Tight junctions in skin inflammation. *Pflugers Arch.* 469, 3–14. doi: 10.1007/s00424-016-1903-9

Bronckers, A. L. (2017). Ion transport by Ameloblasts during Amelogenesis. *J. Dent. Res.* 96, 243–253. doi: 10.1177/0022034516681768

Denker, B. M., and Sabath, E. (2011). The biology of epithelial cell tight junctions in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 622–625. doi: 10.1681/ASN.2010090922

Dutra, R. L., Pieri Pde, C., Teixeira, A. C., Honjo, R. S., Bertola, D. R., and Kim, C. A. (2011). Detection of deletions at 7q11.23 in Williams-Beuren syndrome by polymorphic markers. *Clinics* 66, 959–964. doi: 10.1590/S1807-59322011000600007

Farquhar, M. G., and Palade, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* 17, 375–412. doi: 10.1083/jcb.17.2.375

Gunzel, D., and Yu, A. S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol. Rev.* 93, 525–569. doi: 10.1152/physrev.00019.2012

Hertzberg, J., Nakisbendi, L., Needleman, H. L., and Pober, B. (1994). Williams syndrome–oral presentation of 45 cases. *Pediatr. Dent.* 16, 262–267.

Hou, J. (2014). The kidney tight junction (Review). *Int. J. Mol. Med.* 34, 1451–1457. doi: 10.3892/ijmm.2014.1955

Hou, J., Renigunta, A., Konrad, M., Gomes, A. S., Schneeberger, E. E., Paul, D. L., et al. (2008). Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J. Clin. Invest.* 118, 619–628. doi: 10.1172/jci33970

Milatz, S., Krug, S. M., Rosenthal, R., Gunzel, D., Muller, D., Schulzke, J. D., et al. (2010). Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 2048–2057. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.07.014

Ohazama, A., and Sharpe, P. T. (2007). Expression of claudins in murine tooth development. *Dev. Dyn.* 236, 290–294. doi: 10.1002/dvdy.21001

Sluysmans, S., Vasileva, E., Spadaro, D., Shah, J., Rouaud, F., and Citi, S. (2017). The role of apical cell-cell junctions and associated cytoskeleton in mechanotransduction. *Biol. Cell.* 109, 139–161. doi: 10.1111/boc.201600075

Yamaguti, P. M., Neves, F. A., Hotton, D., Bardet, C., De La Dure-Molla, M., Castro, L. C., et al. (2017). Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. *J. Med. Genet.* 54, 26–37. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103956

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer YZ and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

*Copyright © 2017 Bardet, Ribes, Wu, Diallo, Salmon, Breiderhoff, Houillier, Müller and Chaussain. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.*