

Transporteurs de phosphate dans la minéralisation en odontologie

THESE POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR
EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement par

Solmaz KHOSHNIAT

Née le 22/09/1982

Le 23/09/2016 devant le jury ci-dessous :

Président : M. le Professeur Pierre WEISS

Assesseur : Mme le Docteur Fabienne JORDANA

Assesseur : M. le Professeur Philippe LESCLOUS

Membre invité : M. le Docteur Laurent BECK

Directeur de thèse : Mme le Docteur Laure MERAMETDJIAN

UNIVERSITÉ DE NANTES	
Président	Pr LABOUX Olivier
FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE	
Doyen	Pr AMOURIQ Yves
Assesseurs	Dr BADRAN Zahi Pr SOUEIDAN Assem Pr WEISS Pierre
Professeurs des Universités Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	
Madame ALLIOT-LICHT Brigitte Monsieur AMOURIQ Yves Monsieur GIUMELLI Bernard Monsieur LESCLOUS Philippe	Madame PEREZ Fabienne Monsieur SOUEIDAN Assem Monsieur WEISS Pierre
Professeurs des Universités	
Monsieur BOULER Jean-Michel	
Professeurs Emérites	
Monsieur BOHNE Wolf	Monsieur JEAN Alain
Praticiens Hospitaliers	
Madame DUPAS Cécile Madame LEROUXEL Emmanuelle	Madame HYON Isabelle Madame GOEMAERE GALIERE Hélène
Maîtres de Conférences Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.	Assistants Hospitaliers Universitaires des C.S.E.R.D.
Monsieur AMADOR DEL VALLE Gilles Madame ARMENGOL Valérie Monsieur BADRAN Zahi Madame BLERY Pauline Monsieur BODIC François Madame DAJEAN-TRUTAUD Sylvie Madame ENKEL Bénédicte Monsieur GAUDIN Alexis Monsieur HOORNAERT Alain Madame HOUCHMAND-CUNY Madline Madame JORDANA Fabienne Monsieur KIMAKHE Saïd Monsieur LE BARS Pierre Monsieur LE GUEHENNEC Laurent Madame LOPEZ-CAZAUX Serena Monsieur MARION Dominique Monsieur NIVET Marc-Henri Monsieur RENAUDIN Stéphane Madame ROY Elisabeth Monsieur STRUILLOU Xavier Monsieur VERNER Christian	Monsieur AUBEUX Davy Madame BERNARD Cécile Madame BOEDEC Anne Madame BRAY Estelle Monsieur CLÉE Thibaud Madame CLOITRE Alexandra Monsieur DAUZAT Antoine Madame FROMENT Claire-Hélène Monsieur DRUGEAU Kevin Madame GOUGEON Béatrice Monsieur LE BOURHIS Antoine Monsieur LE GUENNEC Benoît Madame MAÇON Claire Madame MERAMETDJIAN Laure Monsieur PILON Nicolas Monsieur PRUD'HOMME Tony Monsieur ROLOT Morgan
Enseignants Associés	A.T.E.R.
Monsieur KOUADIO Alain (Assistant associé) Madame RAKIC Mia (MC Associé) Madame VINATIER Claire (MC Associé)	Monsieur LAPERINE Olivier

Par délibération en date du 6 décembre 1972, le conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Pierre WEISS,

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins, d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Habilité à diriger des recherches

Directeur du Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD)-INSERM U791

Chef du Département de Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques

Biomatériaux - Biophysique - Radiologie

-Nantes-

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury,

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de ma sincère considération.

A Monsieur le Professeur Philippe LESCLOUS,

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins, d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Habilité à Diriger des Recherches

Chef de Département de Chirurgie Orale

-Nantes-

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury.

Pour la qualité de votre enseignement, votre humour et votre disponibilité tout au long de mon cursus universitaire.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de ma sincère considération.

A Madame le Docteur Fabienne JORDANA

Maître de Conférence des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins, d'Enseignement et de Recherche Dentaires

Département de Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques,

Biomatériaux, Biophysique, Radiologie

-Nantes-

Pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury,

Pour la qualité de votre enseignement et pour votre bienveillance,

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Laurent BECK

Chargé de Recherche du Laboratoire d'Ingénierie Ostéo-Articulaire et Dentaire (LIOAD)-
INSERM U791

Habilité à Diriger des Recherches

-Nantes-

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à cette nouvelle thèse,

Pour votre confiance et pour votre bienveillance,

Veillez recevoir l'expression de mes sincères remerciements et mon profond respect.

A Madame le Docteur Laure MERAMETDJIAN

Assistante Hospitalier Universitaire des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherche
Dentaires

Département Odontologie Conservatrice - Endodontie

-Nantes-

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, qui n'aurait pas eu la même saveur sans vous, pour votre disponibilité et votre aide,

Pour la qualité de votre écoute et tous vos précieux conseils prodigués tout au long de mon cursus,

Veillez recevoir l'expression de mes sincères remerciements et le témoignage de mon amitié.

Transporteurs de phosphate dans la minéralisation en odontologie

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	15
--------------------------	-----------

Chapitre1 : Embryologie et formation des tissus minéralisés dentaires.....17

1. Les stades initiaux.....	17
1.1. Lame dentaire	17
1.2. Stade du bourgeon dentaire	19
1.3. Stade de la cupule (ou du capuchon).....	19
1.4. Stade de la cloche	20
2. Histogenèse et différenciation cellulaire	21
2.1. Dentinogenèse	21
2.1.1. Odontoblastes	21
2.1.2. Composition de la dentine.....	22
2.1.3. Différents types de dentine.....	23
2.1.3.1. Classification selon la localisation.....	23
2.1.3.2. Classification selon la période de formation.....	24
2.1.4. Minéralisation.....	26
2.2. Amélogenèse	26
2.2.1. Améloblastes	26
2.2.2. Composition et structure de l'émail	28
2.2.3. Formation de l'émail	28
2.3. Cémentogenèse.....	29
2.3.1. Cémentoblastes et cémentocytes	29

2.3.2.	Composition et structure du cément.....	30
2.3.3.	Cémentogenèse.....	31
2.4.	Ostéogenèse alvéolaire	31
2.4.1.	Cellules osseuses	32
2.4.2.	Structure de l'os alvéolaire.....	32
2.4.3.	Composition de l'os alvéolaire.....	32
2.4.4.	Ostéogenèse.....	33
2.4.4.1.	Ossification intra-membraneuse	33
2.4.4.2.	Ossification enchondrale.....	33
2.4.4.3.	Ossification secondaire	34

Chapitre 2: Mécanismes moléculaires de la minéralisation dentaire.....35

1.	Apatite biologique	38
1.1.1.	Généralités.....	38
1.1.2.	Structure	38
1.1.3.	Morphologie	39
1.1.4.	Propriétés.....	39
2.	Biominéralisation dentinaire, cémentaire et osseuse	40
2.1.	Matrice protéique.....	40
2.1.1.	Collagène.....	40
2.1.2.	Protéines non collagéniques	41
2.2.	Formation de la dentine inter-tubulaire	42
2.3.	Formation de la dentine péri-tubulaire	43
2.4.	Formation du manteau dentinaire, de l'os et du cément.....	44
2.4.1.	Origine des vésicules matricielles	44
2.4.2.	Formation des minéraux dans les vésicules matricielles.....	44
2.4.3.	Protéines impliquées dans le ratio Pi/PPi et les vésicules matricielles	45
2.4.4.	Libération des cristaux d'hydroxyapatite	47
2.4.5.	Rôle des vésicules matricielles dans les minéralisations pathologiques	47

2.5. Croissance et maturation des cristaux	47
3. Amélogénèse	48
3.1. Phase de sécrétion.....	48
3.1.1. Amélogénines.....	49
3.1.2. Améloblastine.....	50
3.1.3. Enameline.....	50
3.2. Phase de maturation.....	51

Chapitre 3: Transporteurs de phosphate et minéralisation dentaire.....52

1. Différents types de transporteurs de Pi répertoriés.....	54
1.1. Importation de phosphate dans la cellule	54
1.1.1. Transporteurs de phosphate sodium-dépendant	54
1.1.1.1. Transporteurs haute affinité, faible capacité.....	55
1) SLC17A1/Npt1/ NaPi type I	56
2) SLC34.....	57
<input type="checkbox"/> SLC34A1/Npt2a/NaPi-IIa	58
<input type="checkbox"/> SLC34A2/Npt2b/ NaPi-IIb.....	58
<input type="checkbox"/> SLC34A3/Npt2c/ NaPi-IIc	59
3) SLC20A.....	59
<input type="checkbox"/> SLC20A1/PiT-1.....	60
<input type="checkbox"/> SLC20A2/PiT2.....	60
1.1.1.2. Transporteurs à faible affinité, forte capacité	61
1.1.2. Transporteurs de phosphate sodium-indépendant	61
1.2. Exportation de phosphate et transporteurs XPRI	62
2. Implication fonctionnelle des transporteurs de phosphate dans la minéralisation ..	63
2.1. Expression et rôle des transporteurs de Pi dans les odontoblastes	63

2.2. Expression et rôle des transporteurs de Pi dans les améloblastes..... 65
2.3. Rôle et expression des transporteurs de phosphate dans les ostéoblastes et chondrocytes..... 67

CONCLUSION.....69

BIBLIOGRAPHIE.....71

INTRODUCTION

Dans la région crânio-faciale, les dents et leur parodonte contiennent les quatre types de tissus minéralisés retrouvés chez les vertébrés, à savoir la dentine, l'émail, le cément et l'os, qui leur confèrent des propriétés spécifiques et leur fonction de mastication ou de défense, entre autres. Un défaut de l'une de ces structures, suite à des pathologies dégénératives ou infectieuses, des traumatismes, des carences alimentaires, ou des traitements chirurgicaux, radiologiques ou médicamenteux, peut altérer la fonction de l'appareil masticatoire dans son ensemble.

Le développement correct de ces structures, permettant ainsi d'assurer leur rôle, nécessite des cellules spécialisées et un enchaînement d'évènements régulés dans le temps. La minéralisation des tissus dentaires et osseux est une étape clef dans la formation de ces structures. Bien que ces tissus soient composés d'une phase minérale sous forme de cristaux d'apatites et d'une matrice protéique, ils diffèrent sur le plan de la taille des cristaux, de leur forme, de leur orientation, de la densité minérale, de la distribution des ions minéraux ainsi que de la nature de la trame protéique et de la proportion entre les composants minéraux et protéiques. Malgré ces différences, les tissus minéralisés se forment à partir de processus similaires impliquant des protéines matricielles, des protéases et des ions minéraux qui régulent collectivement la nucléation, la croissance et l'organisation des cristaux.

L'hydroxyapatite, le constituant principal des tissus minéralisés, est formé à partir d'ions phosphate et calcium. Par conséquent, au cours de la minéralisation de la matrice extracellulaire, de fortes concentrations de ces ions sont requises. Ces ions se trouvent en concentrations suffisantes pour former des cristaux d'apatite dans le sérum sanguin, qui est la source principale d'ions chez les vertébrés. Cependant, les voies par lesquelles ces ions sont transportés du sérum vers les sites de minéralisation au sein de la matrice extracellulaire, et particulièrement le transport du phosphate inorganique, qui est l'un des constituants des cristaux, mais qui agit également en tant que molécule de signalisation, ne sont pas clairement définis. Un déséquilibre de l'homéostasie du phosphate, qu'il ait lieu au niveau sérique ou au niveau régional sur le site de minéralisation, conduit à des anomalies de minéralisation. De

nombreuses études se sont penchées sur les transporteurs de phosphate au niveau rénal ou intestinal impliqués dans la régulation de l'homéostasie sérique du phosphate, mais il existe peu de données quant aux transporteurs impliqués dans le transport du phosphate vers les sites de minéralisation et leur fonction dans les tissus dentaires ou osseux.

Dans cette thèse, nous décrirons brièvement dans une première partie la formation des structures minéralisées de la dent et de l'os, puis nous développerons les différents mécanismes connus de l'initiation de la nucléation des minéraux dans les tissus possédant une matrice collagénique et dans l'émail dans un second chapitre. Et enfin, nous déterminerons quels sont les transporteurs de phosphate qui ont été identifiés à ce jour dans les différents tissus et leur rôle potentiel dans la minéralisation des tissus dentaires et osseux.

Chapitre 1 Embryologie et formation des tissus minéralisés dentaires

Le développement dentaire passe par différents stades successifs qui sont bien établis : les stades initiaux (comprenant le stade du bourgeon dentaire, le stade de la cupule et le stade de la cloche) et le stade de la maturation au cours duquel se forment les tissus minéralisés. La formation de la dent étant un processus continu, ces phases peuvent parfois se chevaucher dans le temps et il n'est pas toujours possible de les distinguer aisément. Ces quatre stades sont représentés sur la Figure 1.

1. Les stades initiaux

Les tissus nécessaires pour le développement dentaire dérivent de deux sources principales. L'épithélium provient de l'ectoderme oral et de l'endoderme pharyngien [1], tandis que le mésenchyme tient son origine des cellules de la crête neurale du premier arc branchial. Ces cellules de la crête neurale vont former le squelette facial comprenant les maxillaires supérieur et inférieur, ainsi que la majorité des tissus durs et mous des dents, incluant la dentine, la pulpe dentaire, l'os alvéolaire, et le ligament parodontal [2].

1.1. Lame dentaire

La formation de la lame dentaire se fait à la 6-8^{ème} semaine de vie intra-utérine chez l'Homme (à 12 jours *in utero* chez la souris).

Le développement dentaire est initié par la prolifération de cellules épithéliales issues des crêtes neurales. Ces épaisissements épithéliaux se font au niveau de l'orifice buccal primitif et vont former la lame labiogingivale. Ces cellules s'invaginent ensuite dans le mésenchyme sous-jacent, et la structure prend alors la forme d'un fer à cheval, qui évoluera vers la forme de la future arcade dentaire. La lame labiogingivale en se creusant va se subdiviser en deux

1.2. Stade du bourgeon dentaire

Ce stade a lieu à la 9 ou 10^{ème} semaine *in utero* chez l'Homme (13^{ème} jour *in utero* chez la souris).

L'épithélium situé au niveau du versant labial de la crête prolifère et s'enfonce dans le tissu sous-jacent mésenchymateux, dont il est séparé par une lame basale, pour former les bourgeons dentaires des dents temporaires (cf Figure 1). Il en existe 20 chez l'Homme mais le nombre et la localisation exacte de ces organes dentaires sont programmés chez chaque animal. Par la suite, se formeront à partir de bourgeons issus sur le versant lingual des bourgeons déciduaux destinés à devenir les trente-deux ébauches des dents définitives chez l'Homme [3].

Il a été mis en évidence que les échanges de signaux entre le tissu épithélial et le tissu mésenchymateux sous-jacent, réalisés par le biais de la membrane basale, sont essentiels pour le développement dentaire. Ainsi, en cas de séparation de ces deux tissus, l'organe dentaire ne se forme pas [5].

1.3. Stade de la cupule (ou du capuchon)

Ce stade se produit à la 11^{ème} semaine de la vie intra-utérine chez l'Homme (à 15 jours *in utero* chez la souris).

A cette étape, le bourgeon dentaire prend la forme d'une cupule et devient l'organe de l'émail (qui sera à l'origine de l'émail recouvrant la dent) (cf Figure 1). Cet organe adamantin s'organise en différentes couches cellulaires, respectivement de l'extérieur vers l'intérieur : l'épithélium adamantin externe, le réticulum étoilé et l'épithélium adamantin interne.

Au sein du tissu mésenchymateux qui est entouré par l'épithélium adamantin interne, les cellules se condensent pour former la papille dentaire, qui sera à l'origine des odontoblastes et de la pulpe. Des cellules du mésenchyme vont s'agglomérer autour de l'organe de l'émail et de la papille dentaire pour former le follicule dentaire, qui sera à l'origine du ciment, du ligament alvéolodentaire et de l'os alvéolaire.

Ce complexe formé par l'épithélium oral et le mésenchyme est appelé germe dentaire [3].

1.4. Stade de la cloche

Cette étape débute à la 14^{ème} semaine de vie intra-utérine chez l'Homme (et au 17^{ème} jour *in utero* chez la souris).

Le stade de la cloche est celui des différenciations histologiques et morphologiques. A cette étape, la connexion entre l'organe de l'émail et l'épithélium de la cavité buccale disparaît, et le germe dentaire devient un tissu indépendant (Figure 1).

Les cellules de l'épithélium adamantin interne, qui sont séparées des cellules de la papille dentaire via une membrane basale, se différencient en une couche externe d'améloblastes et une couche de quelques cellules formant le stratum intermedium. Les améloblastes libèrent des molécules de signalisation entraînant la différenciation des cellules de la papille dentaire en odontoblastes.

Au cours de cette différenciation, les odontoblastes migrent et restent attachés à la membrane basale, ce qui résulte en la formation d'un prolongement odontoblastique. Puis la membrane basale se désagrège jusqu'à disparaître au cours de la phase initiale de minéralisation dentinaire.

Les cellules de l'épithélium adamantin interne et externe se rejoignent pour former l'anse cervicale, qui est un lieu de forte prolifération cellulaire et qui correspondra à la zone cervicale de la dent.

Les cellules de l'épithélium adamantin externe s'étendent vers le bas pour constituer la gaine de Hertwig qui détermine la taille de la racine et sera remplacée par le ciment.

Aux derniers temps du stade de la cloche (à la 18^{ème} semaine *in utero* chez l'humain et 19^{ème} jour chez la souris), le minéral commence à être formé, les cellules odontoblastiques et améloblastiques synthétisent la dentine et l'émail.

C'est également lors de cette étape que la couronne de la dent prend sa forme, sous l'influence de la forme de l'épithélium adamantin interne. Dans la cavité orale, toutes les dents suivent le même processus, différentes hypothèses sont avancées pour expliquer leur différence de morphologie [6].

2. Histogenèse et différenciation cellulaire

C'est au cours de cette étape, également appelée stade de la couronne, que vont se mettre en place les tissus minéralisés de la dent. Au cours de cette partie seront étudiées la différenciation des cellules et la composition des tissus. La minéralisation de ces tissus sera détaillée dans le chapitre 2.

La formation de la dentine, connue sous le nom de dentinogénèse, est la première étape identifiable du stade de la couronne et précède la formation de l'émail (ou amélogénèse).

2.1. Dentinogénèse

2.1.1. Odontoblastes

Les odontoblastes sont des cellules hautement différenciées impliquées dans la formation de la dentine.

Les pré-odontoblastes sont issus de cellules ectomésenchymateuses ayant migré en périphérie de la papille. Ces cellules vont se diviser un nombre défini de fois avant de se différencier, lors de l'ultime mitose, en deux cellules filles qui sont alignées perpendiculairement le long de la membrane basale. La cellule située à distance de la membrane basale devient la cellule de Höhl tandis que la cellule fille située à proximité de la membrane basale s'allonge et se polarise pour former l'odontoblaste. L'expression de molécules de signalisation et de facteurs de croissance provenant de l'épithélium adamantin interne et le contact avec la membrane basale permet à cette cellule d'acquérir ses caractéristiques phénotypiques. Ces cellules sont des cellules post-mitotiques, donc incapables d'auto-renouvellement [7].

Le rôle principal des odontoblastes est la synthèse de la dentine. Dans un premier temps, ces cellules vont sécréter une matrice organique, appelée prédentine, nécessaire à la formation de la dentine. Au cours de la formation de cette matrice, les odontoblastes vont migrer de la périphérie vers le centre de la papille dentaire en laissant des prolongements cytoplasmiques (appelés fibres de Tomes) dans la matrice. Ces prolongements expliquent l'aspect tubulaire de la dentine au microscope. Dans un second temps, ces cellules participent à la minéralisation de la prédentine aboutissant à la dentine (ou orthodentine). Ainsi, et contrairement à ce qui se passe au niveau de l'émail, la dentine se forme de manière centripète.

Outre ce rôle, l'odontoblaste semble aussi être impliqué dans la sensibilité dentinaire par le biais de canaux mécano-thermo-sensibles grâce à sa position spatiale directement en relation avec les terminaisons nerveuses pulpaire [8].

Il entraînerait également le déclenchement de la réaction immunitaire face à des attaques carieuses par exemple [9].

2.1.2. Composition de la dentine

La composition globale de la dentine est détaillée dans le tableau 1.

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

Tableau 1 : Composition globale de la dentine, tableau adapté de Goldberg [10]

La dentine est moins minéralisée que l'émail (96% de minéral en poids), mais plus que l'os ou le ciment (environ 65% de minéral en poids) [10].

Sa phase organique est majoritairement constituée de collagène de type I (90%) et de protéines non collagéniques (10%), dont notamment les SIBLING, des protéoglycannes, des protéines non phosphorylées (MGP, OCN) et des facteurs de croissance [3]. Certains de ces composants, participant de manière active au processus de minéralisation, seront détaillés dans le chapitre 2.

Contrairement au tissu osseux, la dentine est un tissu non vascularisé, qui ne subit pas de phénomène de remodelage, et qui par conséquent n'intervient pas dans l'homéostasie phosphocalcique.

2.1.3. Différents types de dentine

La dentine est une structure complexe qui peut être classée en différents types, de structures et de compositions différentes, et retrouvés au sein d'une même espèce (cf Figure 2).

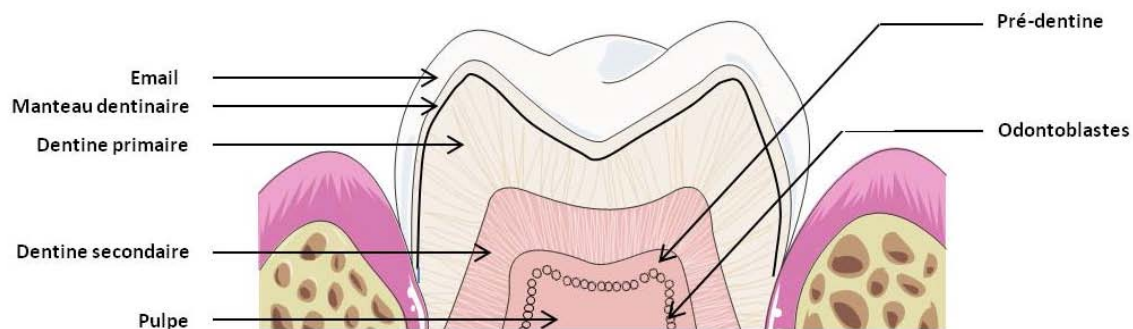


Figure 2 : Représentation schématique des différents types de dentine (adaptée de [11])

2.1.3.1. Classification selon la localisation

Ainsi, on peut trouver en périphérie le manteau dentinaire (ou « mantle dentin »), synthétisé en regard des futures cuspides ou du bord incisif par des odontoblastes peu différenciés. Ces odontoblastes ne possèdent pas de prolongement, cette couche de dentine est donc dépourvue de canalicule. Elle possède une épaisseur variant entre 7 et 30 μm . Elle est moins minéralisée que l'orthodentine et présente des propriétés d'élasticité, importantes d'un point de vue mécanique. Au niveau coronaire, le manteau dentinaire est situé en périphérie et jouxte l'émail. Au niveau radiculaire, le manteau dentinaire se prolonge par la couche hyaline de Hopewell-Smith, jouxtant le ciment [10].

Dans la zone plus interne se localise l'orthodentine (encore appelée dentine circumpulpaire). Cette dentine est synthétisée par des odontoblastes hautement différenciés, et est subdivisée en dentine inter-tubulaire et péri-tubulaire.

La dentine inter-tubulaire est la dentine située entre les tubuli dentinaires tandis que la dentine péri-tubulaire est la dentine située à l'intérieur des tubuli dentinaires. Elle est apposée le long des parois des tubuli. L'épaisseur de cette dentine varie entre 0,5 et 1,5 μm chez l'Homme et elle est hyperminéralisée. Sa structure cristalline est différente de celle de la dentine intertubulaire. Elle est riche en magnésium et en carbonate. Cette dentine est formée durant toute la vie de la dent [12].

2.1.3.2. Classification selon la période de formation

Selon sa période de formation, on distingue la dentine primaire, la dentine secondaire et la dentine tertiaire [13]. De nombreuses définitions, parfois contradictoires, ont pu être données à ces différents types de dentine, néanmoins, ils peuvent être qualifiés comme suit :

a) Dentine primaire

Il s'agit de la dentine formée durant l'organogenèse lorsque l'odontoblaste devient fonctionnel, c'est-à-dire lorsqu'il se polarise. Elle constitue la majeure partie de la masse dentinaire et permet d'établir le « patron » de l'organe (cf figure 2). Elle est produite à un rythme relativement élevé de 4 μm par jour. Elle est élaborée jusqu'à la fin de l'apexogenèse [7]. Il a été suggéré que la dentine, comme l'émail, est formée de manière progressive selon un rythme circadien. Les marques de fluctuation périodique de la minéralisation de la dentine sont appelées lignes de Von Ebne [14].

b) Dentine secondaire

Il s'agit de la dentine qui est sécrétée ensuite de façon physiologique par les odontoblastes lorsque toute la racine est formée et durant toute la vie de la dent. Cette dentine est formée à un rythme beaucoup plus lent qui diminue de 1 à 0,4 μm par jour. Sa sécrétion ne se fait pas de manière uniforme mais concerne principalement le plafond et le plancher pulpaire (cf figure 2). Elle est responsable de la diminution de la lumière canalaire qui différencie une dent jeune d'une dent plus âgée.

La composition chimique et la structure histologique des dentines primaire et secondaire sont identiques et donc le passage de l'une à l'autre n'est pas matérialisable [7].

c) Dentine tertiaire

Quant à la dentine tertiaire, elle est sécrétée en réponse à une agression telle qu'une carie ou une abrasion, de manière localisée et en regard de la zone agressée afin de protéger la pulpe sous-jacente. Selon l'intensité de l'agression, la dentine tertiaire sera réactionnelle ou réparatrice (cf figure 3).

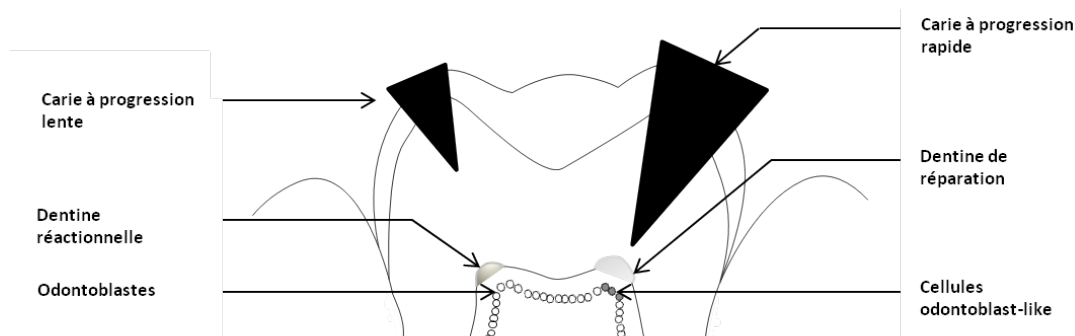


Figure 3 : Représentation schématique de la dentine tertiaire réactionnelle et de réparation, adaptée de [11].

En cas d'agression iatrogène de faible intensité, sans destruction des odontoblastes, ces cellules sécrètent de la dentine réactionnelle à un rythme de 8 μm par jour. Cette matrice dentinaire est sécrétée par des odontoblastes réactivés issus de la couche sous odontoblastique de Höhl, et sa morphologie diffère de la dentine primaire et secondaire ; elle n'est pas tubulaire [7].

En cas d'agression de forte intensité, la palissade odontoblastique est altérée. Si la lésion n'entraîne pas de destruction du tissu pulpaire, celui-ci peut réagir par la mise en place d'une barrière dentinaire, appelée dentine de réparation. La présence de cellules souches multipotentes au sein de la pulpe permet de fournir des cellules qui vont se différencier en cellules « odontoblast-like » pour remplacer les cellules détruites et générer ce pont dentinaire au même rythme que la dentine primaire. Cependant, les cellules ainsi que les processus de différenciation qui conduisent à la formation de cette dentine de réparation ne

sont pas encore clairement identifiés [15], cependant il semblerait que l'inflammation pulpaire résultant de la lésion joue un rôle primordial dans ce phénomène [16].

2.1.4. Minéralisation

Selon le type et la localisation de la dentine, au moins trois mécanismes physiologiques de minéralisation ont été mis en évidence [10], impliquant des mécanismes de nucléation homogène (nucléation dans des vésicules matricielles), ou hétérogène (nucléation sur une matrice collagénique).

Les différents mécanismes impliqués dans ces processus de minéralisation seront détaillés dans le chapitre 2.

2.2. Amélogénèse

L'amélogénèse regroupe des phénomènes de synthèse, sécrétion, minéralisation et de maturation de l'émail, par les améloblastes. Elle se produit au stade de la couronne. Une induction réciproque régit la relation entre la formation de la dentine et celle de l'émail ; la formation de dentine doit toujours avoir lieu avant la formation de l'émail [17].

2.2.1. Améloblastes

Les améloblastes, responsables de la formation de l'émail, sont des cellules épithéliales d'origine ectodermique, ayant des caractéristiques morphologiques qui évoluent à chaque stade de développement (améloblastes pré-sécréteurs, améloblastes sécréteurs, améloblastes de maturation smooth ended et ruffle-ended, améloblastes de protection) jusqu'à disparaître en fusionnant avec l'épithélium oral lors de l'éruption dentaire. Ceci implique que toute altération de l'émail est irréversible [18].

Toutes les phases de différenciation de l'améloblaste sont visibles sur une dent au stade de la couronne et la cellule a une fonction propre à chaque phase (cf figure 4). Le développement se fait en direction du futur collet de la dent. L'améloblaste pré-sécréteur est une cellule qui sort du cycle mitotique et commence à se différencier. Il se situe en regard d'odontoblastes différenciés qui ont déjà sécrété la première couche de pré-dentine et de dentine. Ces

différenciations cellulaires s'accompagnent de la dégradation de la membrane basale qui séparait les pré-améloblastes des pré-odontoblastes. L'améloblaste pré-sécréteur acquiert progressivement ses fonctionnalités de cellule sécrétrice et devient un améloblaste sécréteur sans prolongement de Tomes. A ce stade, l'améloblaste sécrète une fine couche d'émail aprismatique de 10µm d'épaisseur au contact du manteau dentinaire. Cette couche d'émail aprismatique interne forme la jonction émail/dentine composée de la matrice minéralisée du manteau dentinaire en contact intime avec des cristaux d'émail. Après sécrétion de cette première strate d'émail, l'améloblaste forme à son pôle distal un prolongement et devient un améloblaste sécréteur, qui sécrète l'émail prismatique immature. La partie distale va donner l'émail intraprismatique et la partie proximale, l'émail interprismatique. Enfin, l'améloblaste de maturation assure la maturation de l'émail et l'améloblaste de protection protège la surface de l'émail mature jusqu'à l'arrivée de la dent en bouche. L'amélogénèse suit un gradient temporo-spatial de différenciation entre la cuspide de la dent et le collet [18] et se forme de manière centrifuge.

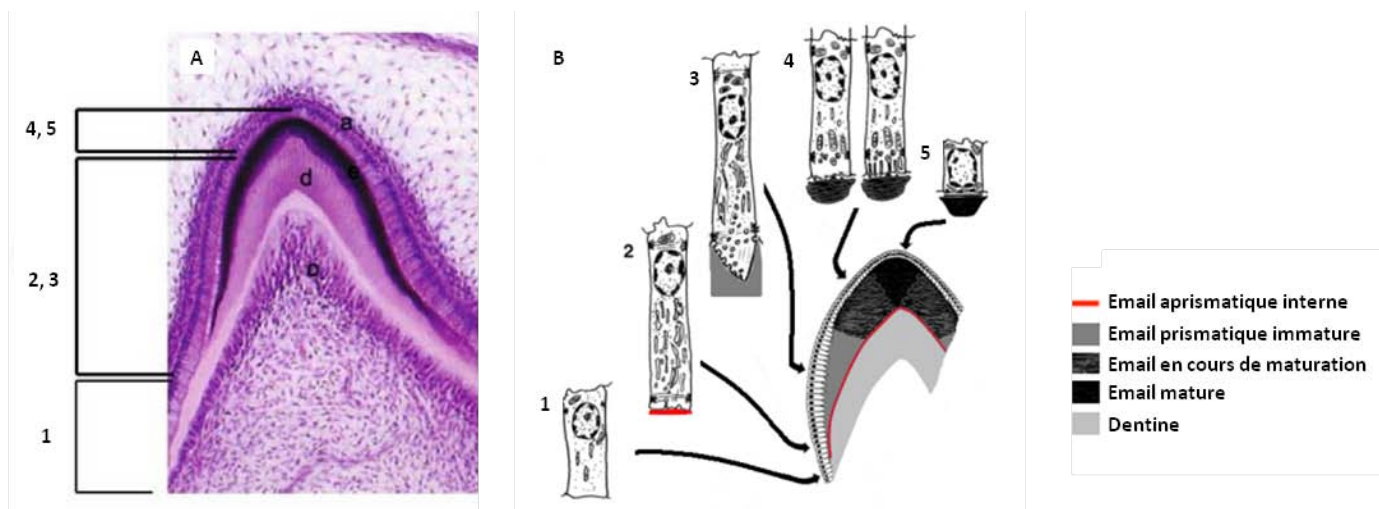


Figure 4 : A : Coloration H&E d'une incisive de souris décrivant le cycle de vie des améloblastes, issue de [18]. Abréviations: a:améloblastes; o: odontoblastes; e: matrice amélaire; d: dentine.

B : Représentation schématique du cycle de vie des améloblastes.

1. Améloblaste pré-sécréteur
2. Améloblaste sécréteur sans prolongement de Tomes
3. Améloblaste sécréteur avec prolongement de Tomes
4. Améloblaste de maturation
5. Améloblaste de protection

2.2.2. Composition et structure de l'émail

L'émail est le tissu le plus minéralisé de l'organisme (97%). Sa matrice est acellulaire et quasiment dépourvue de protéines (la phase aqueuse représente 3 % du volume amélaire). Elle ne présente pas de charpente collagénique, ce qui la distingue de tous les autres tissus minéralisés (os, dentine, ciment dentaire) [19].

L'émail est donc une structure et non un tissu car il ne contient pas de cellules (acellulaire), pas de vaisseaux (avascularité) et pas d'innervation (l'émail est non innervé). Il est organisé en prisme et substance interprismatique.

L'unité élémentaire de l'émail est le cristal d'hydroxyapatite, de formule $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$, qui font 50-70 nm de largeur, 20-25 nm d'épaisseur et dont la longueur selon l'axe C peut dépasser 1 µm [20]. Ces cristaux sont donc environ 1000 fois plus larges que ceux retrouvés dans l'os [21]. L'apatite peut présenter de nombreuses substitutions ioniques (le Ca^{2+} par Sr^{2+} et le PO_4^{3-} par du CO_3^{2-} ou du F^-) qui permettent d'augmenter sa stabilité chimique face aux agressions acides constantes du milieu buccal et de son microbiote [22].

Chaque prisme d'émail a environ le même diamètre qu'un améloblaste et semblerait être le produit d'une seule cellule [20].

2.2.3. Formation de l'émail

L'apparition de ce tissu minéralisé survient généralement vers le troisième ou quatrième mois *in utero* chez l'Homme (à 1 jour post natal chez la souris). Les améloblastes commencent leur dépôt à l'emplacement de ce qui deviendra les cuspides des dents face à la dentine. La formation de l'émail se poursuit ensuite vers l'extérieur et le bas de la dent, de façon centrifuge.

Le rythme de l'amélogenèse est de 4 µm d'émail par jour avec une phase de synthèse active et une phase de repos pendant laquelle il y a un peu moins d'émail sécrété. Ces phases de repos de l'amélogenèse sont marquées par une bande noire régulière sur une coupe d'émail observée en microscopie photonique et par une constriction du prisme en MEB. Ces striations et ces strictions marquent le rythme circadien de l'amélogenèse [14].

Les mécanismes et les protéines impliqués dans la formation de cette structure seront plus détaillés dans le chapitre 2.

2.3. Cémentogenèse

La cémentogenèse est un processus peu compris et très peu d'études se sont penchées sur ses séquences moléculaires.

Le ciment est un tissu minéralisé recouvrant la dentine radulaire qui intervient dans l'attachement et l'ajustement de la position post éruptive de la dent [23].

Il existe chez l'Homme deux types distincts de ciment en terme de localisation et de fonction, le ciment acellulaire et cellulaire, dont la formation et la fonction seront traitées ci-après.

2.3.1. Cémentoblastes et cémentocytes

Les cémentoblastes sont les cellules responsables de la cémentogenèse. L'origine des cémentoblastes reste controversée. L'hypothèse classique suggère qu'ils proviennent des cellules ectomésenchymateuses du follicule dentaire. Une hypothèse alternative supporte l'idée que les cellules de la gaine épithéliale de Hertwig subissent une transformation épithélio-mésenchymateuse et donnent les cémentoblastes [24]. Pendant la formation du ciment localisé au niveau apical de la dent, certains cémentoblastes se retrouvent emmurés dans la matrice extracellulaire minéralisée et se différencient en cémentocytes, de manière similaire à ce qui se passe dans l'os avec les ostéocytes (cf figure 5). Cependant, contrairement aux ostéocytes qui ont été montrés agir en tant que mécanorécepteurs et moduler l'homéostasie osseuse, le rôle précis des cémentocytes n'a pas encore été élucidé [23].

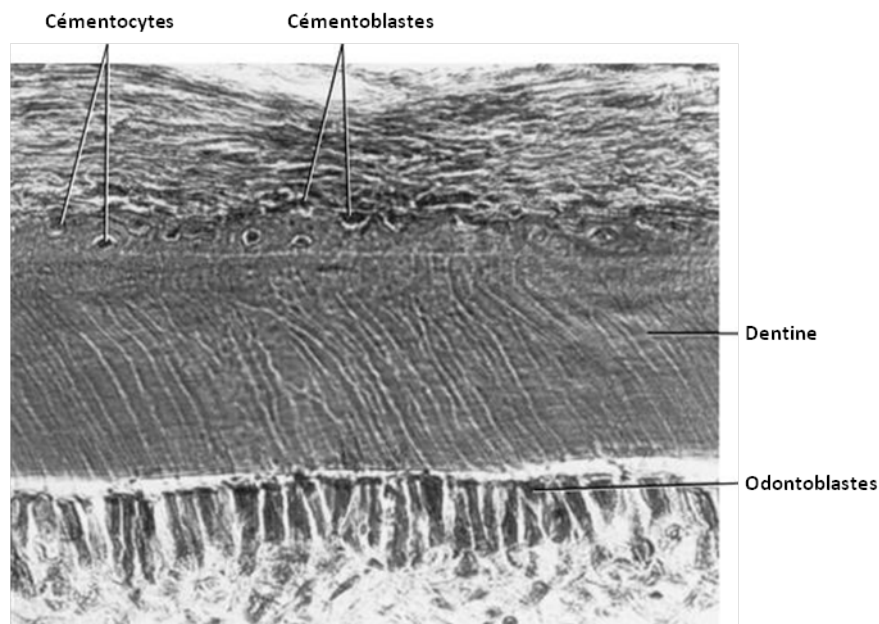


Figure 5 : Coupe tissulaire représentant une déposition de ciment sur de la dentine radiculaire. Certains cémentoblastes sont emmurés dans la matrice cémentaire et deviennent des cémentocytes [25].

2.3.2. Composition et structure du ciment

Le ciment est le tissu le moins minéralisé de la dent. Sa phase organique représente 25 % de la masse totale, sa phase minérale 65 %, et sa phase aqueuse 10 %. Le ciment est une structure non vascularisée qui ne subit pas de phénomène de remodelage, à la différence du tissu osseux. Il est plus épais dans la portion apicale de la racine (100 à 200 micromètres) qu'au niveau de sa portion coronaire (20 à 60 micromètres).

Il existe deux types de ciment: cellulaire et acellulaire.

Le ciment acellulaire comprend des fibres de collagène de type I synthétisées par des fibroblastes (fibres extrinsèques ou fibres de Sharpey). Ces fibres sont partiellement minéralisées et orientées selon le grand axe de la racine et elles contribuent à l'attache dento-alvéolaire.

Le ciment cellulaire est constitué de fibres de collagène de type I, synthétisées par les cémentoblastes (fibres intrinsèques), entièrement minéralisées, et non orientées [26].

2.3.3. Cémentogenèse

La cémentogénèse survient tardivement dans le développement des dents.

a) Cément acellulaire

Le cément acellulaire (primaire, pré-éruptif) se forme en premier. Ce cément est localisé dans la partie cervicale des racines et sert d'ancrage aux fibres de collagène du ligament alvéolo-dentaire, permettant ainsi un attachement fort entre la dent et l'os alvéolaire.

Ces cellules sécrètent une matrice organique composée de collagène de type I et de protéines non collagéniques (telles que la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine) qui vont permettre à la minéralisation de se réaliser [26], comme il sera vu dans le chapitre 2.

b) Cément cellulaire

Le cément cellulaire (cément secondaire ou post-éruptif) se développe une fois que la dent est sur l'arcade et en contact avec la dent antagoniste. Ce type de cément est localisé au niveau apical des racines et des zones de furcation et possède un rôle d'ajustement de la position de la dent lors de son éruption.

Les cémentoblastes formant le cément cellulaire sont emmurés dans la matrice minéralisée et deviennent des cémentocytes [23].

2.4. Ostéogenèse alvéolaire

Les procès alvéolaires se forment pendant le développement dentaire et sont absents localement dans les sites où les dents temporaires ou permanentes ne se développent pas [27]. Ainsi, la croissance osseuse de l'os alvéolaire, le développement dentaire et l'éruption dentaire sont des phénomènes interdépendants.

2.4.1. Cellules osseuses

L'os alvéolaire dérive des cellules de la crête neurale et a un taux de remodelage plus élevé, résultant des forces masticatoires qui s'exercent sur lui. La formation osseuse et le remodelage sont des phénomènes très étudiés et sont sous le contrôle des activités cellulaires des ostéoblastes, ostéocytes et des ostéoclastes. Des facteurs biochimiques et mécaniques (tels que les forces développées en orthodontie) contrôlent le taux de formation et de remodelage osseux [28].

2.4.2. Structure de l'os alvéolaire

Il est constitué d'une corticale externe, recouverte d'une couche fibreuse adhérente à la gencive, d'une corticale interne et d'os médullaire en profondeur, qui est moins calcifié, moins dur et plus vascularisé. Il repose sur l'os basal.

La corticale externe est constituée de systèmes de Havers, tandis que la corticale interne (également appelée lamina dura ou lamina cryptée), est constituée d'une portion d'os lamellaire et d'os fibreux qui doit sa structure au fait que les principales fibres ligamentaires s'y insèrent. Du fait du remaniement constant de l'os alvéolaire, la couche corticale primitivement constituée par du tissu osseux lamellaire est remplacée par de l'os haversien, et présente donc une structure complexe.

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

2.4.3. Composition de l'os alvéolaire

L'os alvéolaire présente une composition organique et inorganique similaire à tout os de l'organisme, à savoir 70% de minéraux, 21% de trame organique et 9% d'eau.

La trame organique est composée à 90% de collagène (de type I majoritairement), et de protéines non collagéniques, dont certaines seront étudiées comme pour la dentine dans le chapitre suivant [29].

Le minéral consiste en cristaux de phosphate de calcium sous forme d'hydroxyapatite, tandis qu'une fraction se trouve sous forme amorphe, ou sous différentes formes cristallines

notamment du phosphate tricalcique. Il existe d'autres éléments tels que le carbonate de calcium, phosphate de magnésium, sodium et certains éléments sous forme de traces tels le zinc et le fer [30].

La corticale interne est la seule exception, en effet, elle présente une organisation structurale et une composition semblable au ciment acellulaire [31], où l'ostéopontine semble guider la minéralisation localement de manière à ce que l'attache entre l'os et le ligament alvéolo-dentaire se fasse de manière optimale [28].

2.4.4. Ostéogénèse

Deux processus sont décrits pour la formation de l'os : l'ossification intra-membraneuse et l'ossification enchondrale où respectivement du collagène primitif et néo-formé ou du cartilage provenant du tissu osseux primitif servent de matrice à l'os nouveau.

Lors du remodelage osseux se produit l'ossification secondaire.

2.4.4.1. Ossification intra-membraneuse

Les cellules mésenchymateuses indifférenciées se différencient dans les zones où la vascularisation locale s'est intensifiée et donnent naissance à des pré-ostéoblastes qui après division donneront des ostéoblastes. Les ostéoblastes synthétisent la matrice de l'os qui forme d'abord un tissu ostéoïde formant des trabécules, où se déposent les sels minéraux. Les trabécules se disposent graduellement autour des vaisseaux, les enfermant dans un canal haversien; celui-ci et son contenu forme un ostéone primaire [32]. Puis cette matrice organique est minéralisée selon des mécanismes détaillés dans le chapitre 2.

2.4.4.2. Ossification enchondrale

Ce mode de formation concerne l'ossification embryonnaire et la base du neurocrâne. Le modèle cartilagineux en cours de désintégration est envahi par un tissu méenchymateux ostéogène très vascularisé, qui élabore ensuite l'os sur le même mode que précédemment. La minéralisation correspond à la croissance des cristaux dans le cartilage minéralisé [32].

2.4.4.3. Ossification secondaire

À partir de l'os initial, l'os est remodelé pour former de l'os mature à fines fibres, de diamètre constant, déposées sous forme de lamelles; l'orientation générale des fibres peut varier de lamelle à lamelle. Celles-ci se déposent concentriquement autour des vaisseaux sanguins pour former des ostéons secondaires, limités par une ligne d'inversion ou en surface et parallèlement aux capillaires, pour former de l'os lamellaire [33].

Chapitre 2 : Les mécanismes moléculaires de la biominéralisation dentaire

La biominéralisation est le processus par lequel un organisme vivant va induire la formation d'un minéral. La base de la biominéralisation repose sur l'interférence entre l'assemblage de macromolécules sécrétées par les cellules et de phases minérales en formation. Les macromolécules jouent un rôle considérable dans ces processus en contrôlant notamment la formation de la phase minérale, la forme des particules minérales et leur organisation [34]. Les deux phases organiques et minérales sont étroitement intriquées l'une dans l'autre au niveau moléculaire, rendant leur séparation en terme de structure ou de fonction quasi impossible. Ces macromolécules sont donc extrêmement importantes pour le maintien des propriétés mécaniques des tissus minéralisés [35].

Les mécanismes exacts impliqués dans la formation des cristaux d'hydroxyapatite dans les tissus durs des vertébrés, et particulièrement le processus qui précède la propagation du minéral sur la matrice extracellulaire, restent largement inconnus et controversés. Ceci peut être expliqué d'une part par la taille de l'ordre du nanomètre des cristaux d'apatite, bien qu'aujourd'hui les techniques aient évolué dans ce domaine. D'autre part, comme évoqué précédemment, lors de sa croissance, le minéral est imbriqué de manière très intime du début à la fin du processus avec la matrice organique, ce qui complique fortement son observation et donc l'étude de sa formation et de son organisation tridimensionnelle. Enfin, le tissu osseux, contrairement à la dentine ou à l'émail, est soumis à un processus de remodelage, en conséquence, pour ce tissu, les propriétés physico-chimiques du minéral sont hétérogènes dans le temps et l'espace [36].

Le sérum sanguin est la source principale d'ions chez les vertébrés, et il contient des concentrations de calcium et phosphate suffisantes pour permettre la formation d'hydroxyapatite. Cependant, les voies par lesquelles ces ions sont transportés du sérum vers

les sites de minéralisation au sein de la matrice extracellulaire, ainsi que l'implication précise des cellules dans ces processus de minéralisation ne sont pas clairement définies.

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation précoce des biominéraux dans les tissus tels que l'os ou la dentine, comprenant une matrice collagénique, comme schématisés sur la figure 6, issue de [37]:

- un processus indépendant des cellules, où des protéines non collagéniques chargées, associées avec les gap zones du collagène, médient la nucléation minérale à partir d'ions en solution [38] (1).

- un mécanisme dépendant des cellules dans lequel des vésicules dites matricielles bourgeonnent à partir de la membrane plasmique cellulaire et se chargent d'ions, entraînant la précipitation du phosphate et du calcium, puis se rompent, déversant ainsi leur contenu dans la matrice extracellulaire (2).

- une route alternative nouvellement décrite dans laquelle un minéral amorphe précurseur est produit à partir des mitochondries qui déversent leur contenu calcique dans des vésicules. Ce minéral amorphe est ensuite déposé dans les fibres de collagène, où il se transforme en platelets de cristaux d'hydroxyapatite (3).

Il est probable que tous ces mécanismes se produisent de manière concomitante au cours des processus de biominéralisation [37].

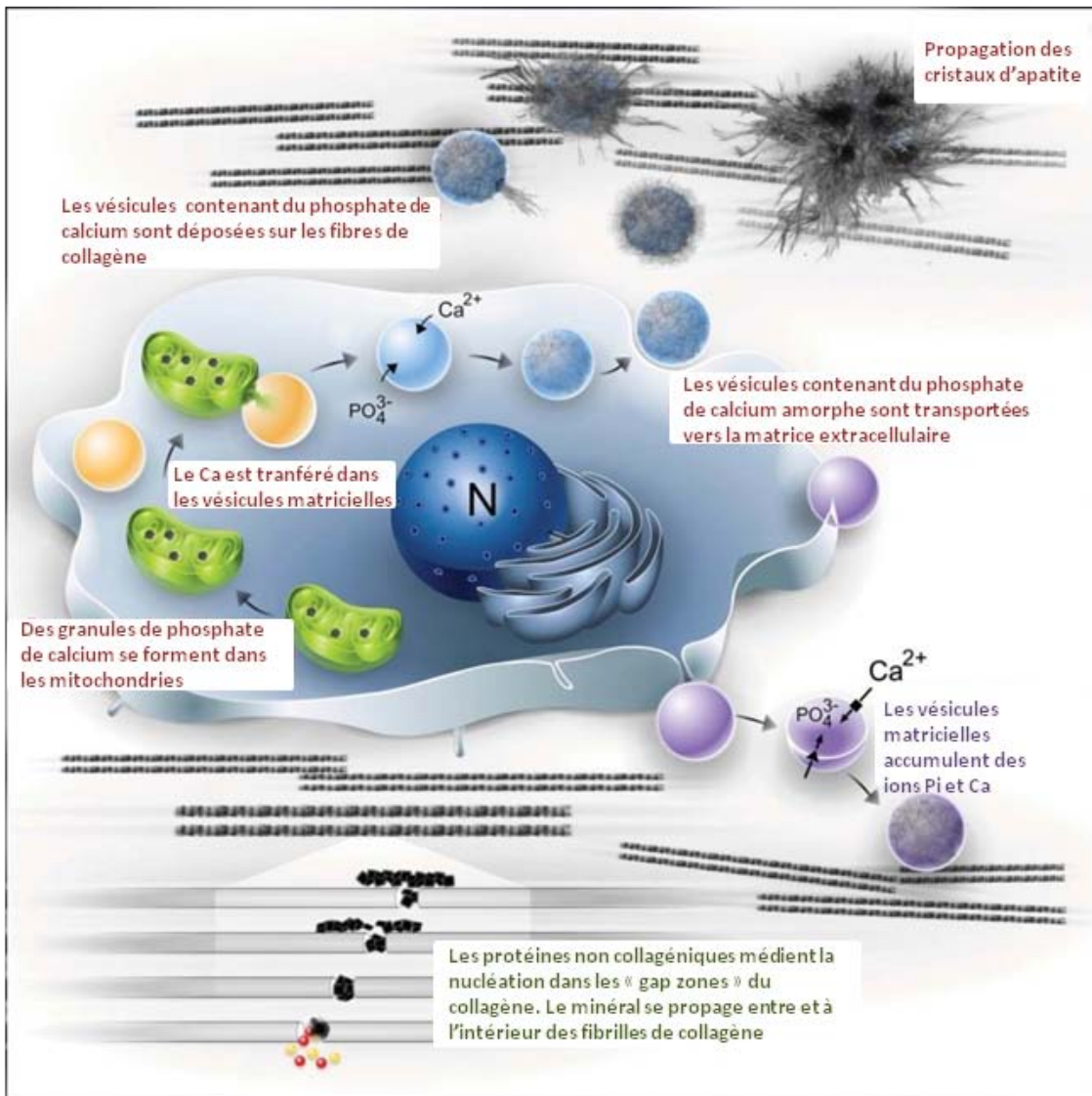


Figure 6 : Représentation schématique des différents mécanismes pouvant être impliqués dans la formation du minéral osseux et dentinaire, adaptée de [37].

Quant à l'émail, il s'agit d'une structure qui, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, ne possède pas de matrice collagénique, la formation de ses cristaux se fait donc à partir de protéines non collagéniques.

Connaître les mécanismes de biominéralisation peut avoir de grandes implications dans la compréhension des minéralisations pathologiques, et dans la prise en charge des pathologies liées aux acteurs des processus de biominéralisation.

Après quelques généralités sur l'apatite biologique, nous décrirons au sein de ce chapitre les différentes voies et les principales protéines impliquées dans la biominéralisation dentinaire, cémentaire et osseuse d'une part, et dans la formation de l'émail d'autre part.

1. Apatite biologique

1.1.1. Généralités

L'apatite est un minéral ubiquitaire. Effectivement, on trouve l'apatite comme composante minérale au sein de nombreux tissus minéralisés chez l'Homme ou l'animal. L'apatite se retrouve également sous la forme de calcifications pathologiques, comme par exemple dans les calculs rénaux ou les calcifications vasculaires [39]. De plus, l'apatite présente dans les tissus minéralisés est un analogue du minéral qui peut être à la fois de source volcanique ou sédimentaire. La nature, les propriétés et la distribution de ces minéraux dans les tissus confèrent à ces derniers leur propriété en terme de remodelage et de force mécanique [40].

1.1.2. Structure

Les cristaux de l'os, de la dentine et du ciment, de formule $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]_2$ sont déposés de manière ordonnée sur une trame collagénique. Cette apatite osseuse cristallise selon une maille hexagonale. Ce sont les cristaux biogéniques les plus petits connus (ils font 2–6 nm d'épaisseur, 30–50 nm de largeur et 60–100 nm de longueur) [30].

En ce qui concerne l'émail, les cristaux, qui ne sont pas formés sur une matrice collagénique, sont beaucoup plus grands (jusqu'à 2 μm de longueur) et présentent moins d'impuretés que ceux trouvés dans l'os, le ciment ou la dentine [41].

L'apatite osseuse précipite à partir du liquide interstitiel du tissu osseux, lequel est un fluide extracellulaire d'un pH proche de 7,4 qui est riche en espèces ioniques à des concentrations diverses, provenant du plasma sanguin. Or l'apatite possède une faculté de substitutions aussi bien anioniques que cationiques sur tous ses sites cristallographiques, ce qui conduit les cristaux à adsorber une multitude d'espèces ioniques du plasma sanguin et ceci sans que leur structure en soit notablement modifiée. En revanche, ces incorporations d'éléments étrangers affectent la formation et les propriétés physico-chimiques de l'hydroxyapatite. La substitution

la plus importante en masse est celle des ions carbonates, très importante dans l'os (jusqu'à 8 % en masse), alors qu'elle est beaucoup moindre dans l'émail (de l'ordre de 3 % massique). Le faible taux de substitution au sein de l'émail comparé à celui important au sein de l'os a plusieurs répercussions connues sur l'apatite, comme d'augmenter la solubilité ou encore de diminuer la taille des cristaux [42].

L'apatite osseuse est par conséquent considérée comme une apatite carbonatée déficiente en calcium et en hydroxyle. Une telle composition est en accord avec le ratio Ca/P d'apatites osseuses mesuré dans la littérature (soit entre 1,3 et 1,6), valeurs sensiblement inférieures à celle de 1,67 d'une apatite stœchiométrique [42].

1.1.3. Morphologie

La morphologie des cristaux d'apatite osseuse, observée au MEB se trouve sous la forme d'une plaquette de forme irrégulière et de taille nanométrique. Cette morphologie diffère de celles qui peuvent être observées par synthèses *in vitro*, qui conduisent généralement à une morphologie sous forme d'aiguilles ou de bâtonnets [43].

1.1.4. Propriétés

La taille nanométrique des cristaux d'hydroxyapatite du tissu osseux leur confère une très grande surface spécifique, ce qui va de pair avec une vitesse de dissolution rapide, permettant ainsi d'assurer le remodelage du tissu et ainsi ses fonctions métaboliques inhérentes. A l'inverse, l'apatite de l'émail, connue pour être une apatite plus proche de la stœchiométrie, est composée de cristaux de taille micrométrique et de faible surface spécifique. Cette structure n'est jamais remodelée par l'organisme, et elle a besoin d'être le moins soluble possible pour faire face aux attaques acides des aliments ou des bactéries [43].

2. Biominéralisation dentinaire, cémentaire et osseuse

La biominéralisation de ces tissus dépend de la présence de fibres de collagène et de l'action de protéines non collagéniques.

La dentine est un excellent modèle pour étudier les processus de biominéralisation car elle regroupe les différents mécanismes impliqués dans les processus de la minéralisation.

2.1. Matrice protéique

2.1.1. Collagène

Chez les vertébrés, le collagène est la protéine la plus abondante et est associé à la minéralisation du squelette et de la dentition dans tous les tissus excepté l'émail. C'est principalement cette protéine qui apporte l'intégrité structurale, ainsi que la stabilité mécanique et l'élasticité aux tissus conjonctifs via son organisation supramoléculaire au sein de la matrice extracellulaire [44]. Vingt-neuf types de collagènes ont été identifiés. Ces différents types possèdent des séquences d'acides aminés propres, donc des structures moléculaires et supramoléculaires propres, afin de répondre aux contraintes mécaniques spécifiques demandées par le tissu dans lequel ils sont incorporés.

L'os, la dentine et le ciment sont composés principalement de collagène de type I (90% des protéines totales), qui est proposé être une charpente pour la formation de l'apatite minérale. Bien que les fibres de collagène donnent une base de construction aux tissus de l'os, de la dentine et du ciment, l'organisation et la nature de ces fibres varient au sein de ces tissus, ce qui entraîne des différences dans leurs propriétés fonctionnelles [45] (cf figure 7).

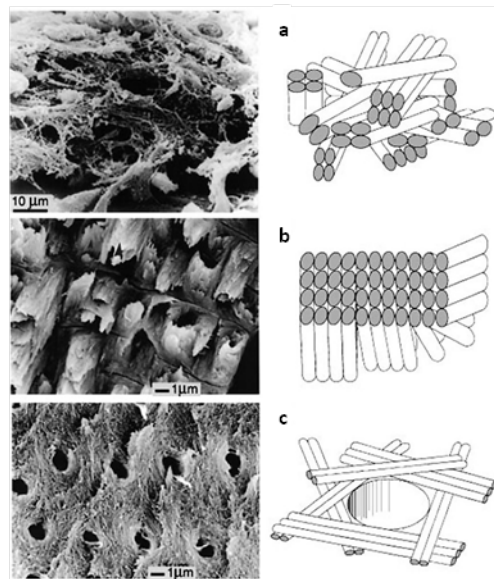


Figure 7: Structure de l'os lamellaire (a), l'os non lamellaire (b) et la dentine (c) en MET, associée à la représentation schématique de la disposition des fibres de collagène au sein de ces mêmes tissus, issue de [46]

Les considérations récentes sur l'interaction entre le collagène de type I et les ions calcium et phosphate, qui sont les constituants majeurs des cristaux d'apatite, ont suggéré que la liaison de ces ions sur certains sites spécifiques au niveau du collagène (les « gap » zones et les zones de chevauchement) dépend de la stéréochimie du collagène et conduit à la nucléation des cristaux [47]. Ce concept est fondamental pour comprendre la minéralisation physiologique et pathologique.

2.1.2. Protéines non collagéniques

Il est intéressant de remarquer que certains tissus telle la peau, pourtant constituée de collagène de type I, ne produisent pas de minéral. Ceci s'explique par la présence, dans la matrice extracellulaire, de protéines non collagéniques qui régulent et contrôlent la minéralisation des tissus minéralisés. Ces protéines semblent jouer un rôle majeur dans la formation du minéral, incluant la déposition du minéral (nucléation et croissance), le contrôle de la morphologie des cristaux, l'inhibition de la croissance du minéral, et enfin le coalignement des cristaux [48]. Deux approches permettent de déterminer la fonction de ces molécules. La première consiste à étudier des animaux transgéniques invalidés pour un ou plusieurs composants de la matrice extracellulaire. Bien que des effets significatifs sur les tissus minéralisés aient été constatés, aucun de ces animaux n'a présenté une inhibition

complète de minéralisation, ce qui suggère une redondance dans les fonctions de ces protéines. Par ailleurs, ces protéines cumulent souvent d'autres fonctions en plus de leur rôle dans la minéralisation. Et l'invalidation d'une protéine peut conduire à de multiples changements dans l'organisme, qui peuvent résulter directement ou indirectement en une modification de la minéralisation [49]. La seconde approche utilisée pour comprendre le rôle des molécules non collagéniques dans le processus de minéralisation est d'utiliser les expériences *in vitro*. Les minéraux formés *in vitro* en présence de peptides polyanioniques ressemblent à ce qui peut être observé *in vivo*, avec une phase initiale de minéral amorphe qui se transforme en cristaux d'hydroxyapatite avec le temps [50].

Selon leur nature et leur concentration dans le tissu, ces protéines peuvent se conduire soit en promoteurs, soit en inhibiteurs de la minéralisation. Ainsi, par exemple, la famille des Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins (SIBLING), qui intègrent différents membres tels que la DMP-1 (dentin matrix protein), la DSPP (dentin sialophosphoprotein), ou l'OPN (ostéopontine), joue un rôle crucial dans la minéralisation des tissus osseux et dentaires. Ces protéines sont exprimées à la fois par des tissus minéralisés (os, dent) et des tissus mous (glandes salivaires, reins). Elles possèdent un motif ASARM (acidic serine- and aspartate-rich motif), qui semble jouer un rôle prépondérant dans la minéralisation. Ce sont particulièrement les modifications de ce motif, via un clivage enzymatique et des phosphorylations, qui gouvernent sa fonction [51]. Plus de deux cents protéines non collagéniques ont été recensées, seules certaines seront mentionnées au cours de ce manuscrit.

2.2. Formation de la dentine inter-tubulaire

La transformation de la prédentine en dentine est à l'origine de la formation de dentine inter-tubulaire. La prédentine est une matrice non minéralisée riche en collagène de type I, d'épaisseur constante de 20 μm . Elle est limitée, du côté proximal par les corps cellulaires des odontoblastes et du côté distal par le front de minéralisation et la métadentine [52]. La métadentine est la zone située au niveau du front de minéralisation, où sont sécrétés un certain nombre de protéines matricielles non collagéniques (SIBLING, phosphoprotéines, lipoprotéine, protéoglycannes). Cette zone a une épaisseur comprise entre 0,25 et 0,5 μm . L'ensemble de ces éléments contrôle le processus de minéralisation [52] (cf figure 8).

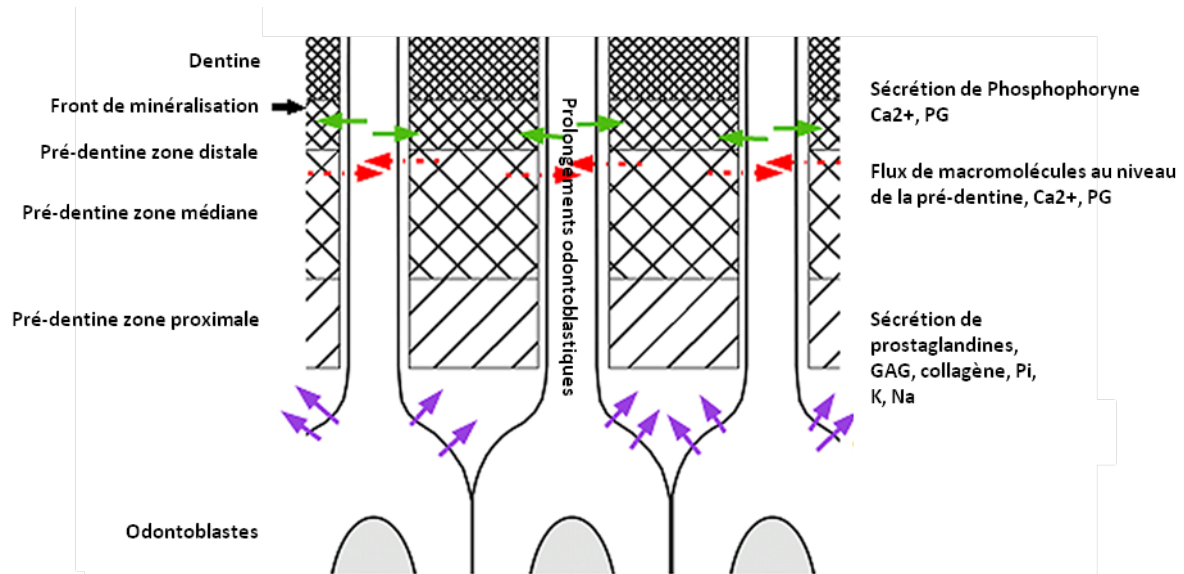


Figure 8 : Représentation schématique du modèle de minéralisation au niveau de la pré-dentine et du front de minéralisation. Les flèches vertes et rouges indiquent les flux de calcium et d'autres macromolécules entre les prolongements odontoblastiques et la matrice, tandis que les flèches violettes indiquent la sécrétion de collagène et de phosphate par les corps cellulaires des odontoblastes. Figure adaptée de [46]

La minéralisation de la pré-dentine pour former la dentine implique des mécanismes complexes où se forment des cristaux d'hydroxyapatite qui croissent autour [53] et à l'intérieur des fibres de collagène (déposition inter- ou intrafibrillaire respectivement) [54]. Ces cristaux sont formés des ions calcium et phosphate, qui sont concentrés au niveau de la pré-dentine et de la métadentine au voisinage du front de minéralisation grâce à l'action de protéoglycanes et de phospholipides. Ceux-ci s'associent pour permettre la nucléation initiale, c'est à dire la formation de calcosphérites (ou globules). Ces calcosphérites augmentent de volume et fusionnent les uns avec les autres, minéralisant ainsi la dentine de façon homogène [10].

2.3. Formation de la dentine péri-tubulaire

La formation de la dentine péri-tubulaire passe par le dépôt passif de molécules du sérum à l'intérieur des tubuli dentinaires. Des protéines telles que l'albumine, l'alpha-2 HS glycoprotéine, ou des phospholipides contribuent à la formation de minéral en l'absence de collagène [12]. Le prolongement odontoblastique logé dans le tubuli dentinaire baigne dans le fluide transdentinaire. Ce fluide semble jouer un rôle dans la formation de dentine péri-tubulaire [12].

2.4. Formation du manteau dentinaire, de l'os et du ciment

L'importance des vésicules matricielles a été mise en évidence dans la formation de l'os, du ciment et du manteau dentinaire [55] depuis leur découverte en 1967 [56, 57]. Nous décrirons ici les mécanismes engagés dans la synthèse (minéralisation) du manteau dentinaire, qui impliquent des processus dépendant de vésicules matricielles, et de leur équipement enzymatique, mais ces processus sont également retrouvés dans la formation osseuse ou cémentaire.

Dans un premier temps, les odontoblastes faiblement différenciés sécrètent des fibres de collagène de type I, et des molécules non collagéniques telles que l'ostéopontine et le TGF- β dans la matrice extracellulaire située en périphérie de la papille. Puis la minéralisation du manteau dentinaire est réalisée suite au relargage des vésicules matricielles par les odontoblastes.

2.4.1. Origine des vésicules matricielles

Les vésicules matricielles sont des particules d'origine cellulaire dont le diamètre varie entre 100 à 200 nm. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer leur formation sans qu'il y ait de consensus à l'heure actuelle [58].

L'une des hypothèses serait que les vésicules matricielles se forment à partir de la membrane plasmique cellulaire de manière polarisée. Une autre hypothèse serait que les vésicules matricielles dériveraient de réarrangements de membranes de cellules apoptotiques. Néanmoins, il a été montré que les membranes cellulaires de ces vésicules et des cellules apoptotiques sont différentes sur le plan morphologique et fonctionnel.

2.4.2. Formation des minéraux dans les vésicules matricielles

Les mécanismes exacts par lesquels les vésicules matricielles procèdent à la minéralisation ne sont pas encore bien élucidés. La capacité de ces vésicules à calcifier dépend de leur contenu,

à savoir de la présence de protéines et de lipides susceptibles de chélater le Pi et le calcium. La nucléation de l'hydroxyapatite via les vésicules matricielles se fait en deux étapes : la cristallisation du minéral au sein de la vésicule et sa propagation au sein de la matrice extracellulaire dans un second temps.

Durant la phase primaire de synthèse, l'activité d'un certain nombre de protéines présentes dans la membrane ou à l'intérieur des vésicules matricielles et supposées être impliquées dans la synthèse et le transport du Pi (phosphatase alcaline, adenosine triphosphatase, pyrophosphatase, Phospho 1, PiT-1), ainsi que dans le transport de calcium (Annexines et Phosphatidylsérine), augmente (cf figure 9).

2.4.3. Protéines impliquées dans le ratio Pi/PPi et les vésicules matricielles

L'homéostasie du Pi est essentiel pour le développement et la maintenance des tissus minéralisés du squelette et des dents. A contrario, le pyrophosphate (PPi), composé de deux molécules de phosphate, régule la minéralisation physiologique et les calcifications pathologiques en agissant en tant que puissant inhibiteur de la formation et de la croissance des cristaux. Ainsi, le ratio PPi/Pi a une importance considérable dans la promotion ou la restriction de la formation de minéral dans les tissus. Un grand nombre d'enzymes sont impliqués dans le contrôle du métabolisme du Pi et du PPi, et sont donc essentiels dans la régulation du phénomène de minéralisation [59].

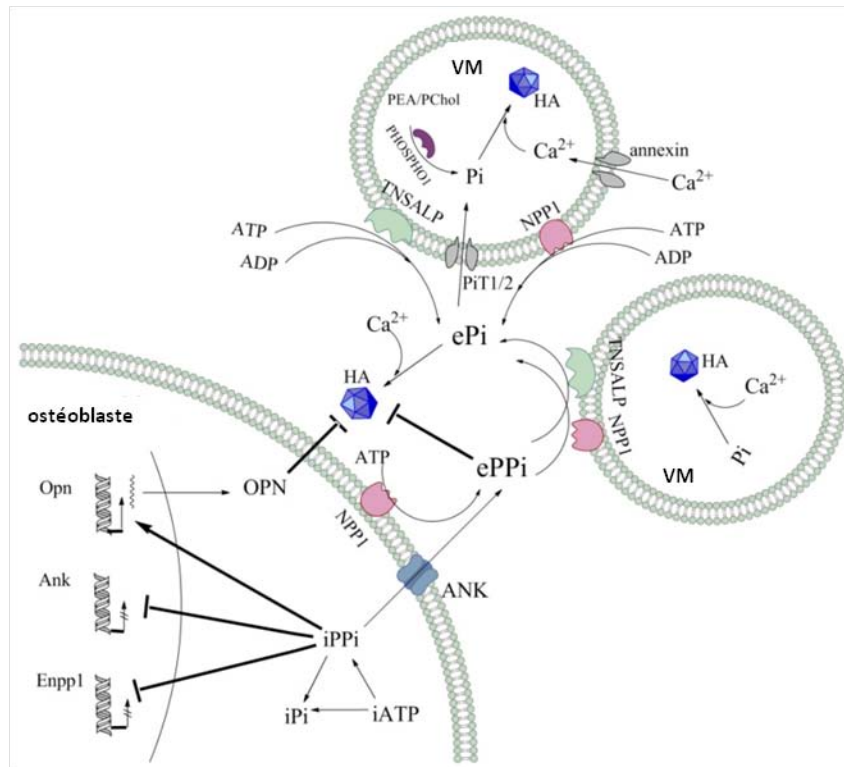


Figure 9: Représentation schématique hypothétique de la régulation de la balance Pi/PPi au sein d'une vésicule matricielle (VM), issue de Zhou et al., 2012 [59]

Ainsi, le Pi est généré suite à l'action de différentes enzymes, dont d'une part la PHOSPHO-1, qui hydrolyse au sein des vésicules matricielles des phospholipides (phosphatidyl éthanolamine et phosphocholine), et d'autre part la phosphatase alcaline et la NPP-1, qui hydrolysent de l'ATD, ADP ou du PPi et permettent la génération de Pi à l'extérieur des vésicules, tout en diminuant en parallèle la concentration de PPi. Il est supposé que le Pi entre dans la vésicule matricielle par le biais de transporteurs PiT-1 et PiT-2, mais cette hypothèse reste à confirmer et une attention particulière sera portée sur ces transporteurs de phosphate impliqués dans les processus de minéralisation au sein du chapitre 3. Quant au calcium, il pénètre dans la vésicule via des annexines. Le calcium et le phosphate s'accumulent dans les vésicules grâce à ces composés, jusqu'à atteindre le seuil de précipitation et former des nanocristaux. Un intermédiaire, l'octacalcium phosphate, est créé avant de se transformer en hydroxyapatite qui est moins soluble et qui est ensuite stabilisé grâce à l'action de l'anhydrase carbonique [58]. Il existe un système de rétro-contrôle négatif médié par la NPP-1 et ANK qui génèrent du PPi induisant l'expression de l'OPN, qui vont tous deux inhiber la propagation du cristal et sa croissance (cf figure 9)

2.4.4. Libération des cristaux d'hydroxyapatite

Le mécanisme conduisant à la libération de ces nanocristaux au sein des fibres de collagène suscite des interrogations. Il semblerait que les cristaux d'hydroxyapatite augmentent rapidement de taille au sein de ces vésicules par épitaxie pour finalement transpercer leurs membranes et entrer en contact les uns avec les autres, propageant ainsi le front de minéralisation [10].

2.4.5. Rôle des vésicules matricielles dans les minéralisations pathologiques

Depuis peu, le rôle des vésicules matricielles dans la pathogenèse des minéralisations vasculaires est étudié, avec un nombre croissant d'études rapportant la présence de vésicules comparables d'un point de vue de la structure et du contenu aux vésicules matricielles [60].

2.5. Croissance et maturation des cristaux

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

La question de savoir s'il existe des clusters de prénucléation et si ces derniers ont une structure cristalline (autrement dit si ce sont des germes d'apatite en croissance) ou amorphe (si ce sont des germes d'une phase précurseur intermédiaire qui vont se transformer ultérieurement en apatite) est donc posée. Des études menées chez différents modèles animaux ont montré la présence de phases précurseurs métastables (phosphate de calcium

amorphe (ACP), phosphate octocalcique (OCP), brushite (DCPD)) *in vivo*, qui pourraient être stabilisées grâce à l'action de certaines protéines non collagéniques.

Enfin, le phénomène de maturation des cristaux d'apatite, observé au cours du vieillissement de l'individu, conduit à une augmentation légère de leur taille, ainsi qu'à une augmentation de leur ratio Ca/P [61].

3. Amélogénèse

Comme mentionné précédemment, l'émail est une structure ne contenant pas de fibres de collagène, la nucléation des cristaux ne se déroule donc pas sur le même schéma que pour la dentine ou l'os et nécessite la présence de protéines particulières qui seront décrites dans cette section. Ces protéines ne sont néanmoins pas exclusives de l'émail et sont exprimées par d'autres tissus dont la pulpe, l'os ou le ligament parodontal.

En règle générale, la formation de l'émail se fait en deux étapes: la phase de sécrétion (lorsque l'émail atteint son épaisseur totale) et la phase de maturation (lorsque la matrice organique de l'émail est remplacé par les cristaux d'hydroxyapatite) [62].

3.1. Phase de sécrétion

Pendant la phase de sécrétion, les améloblastes produisent et libèrent des protéines (amélogénines, améloblastine et énaméline) qui contribuent à former la matrice de l'émail. Ces protéines vont intervenir dans la nucléation du cristal dans un milieu saturé en calcium et en phosphate. De plus, la fixation de peptides matriciels sur des faces spécifiques de ce cristal en module l'énergie de surface et l'architecture, permettant l'élaboration de cristaux longs et fins, disposés parallèlement entre eux (cf figure 10). La phase minérale ainsi organisée au stade de sécrétion occupe 10 à 20 % du volume de l'émail [63].

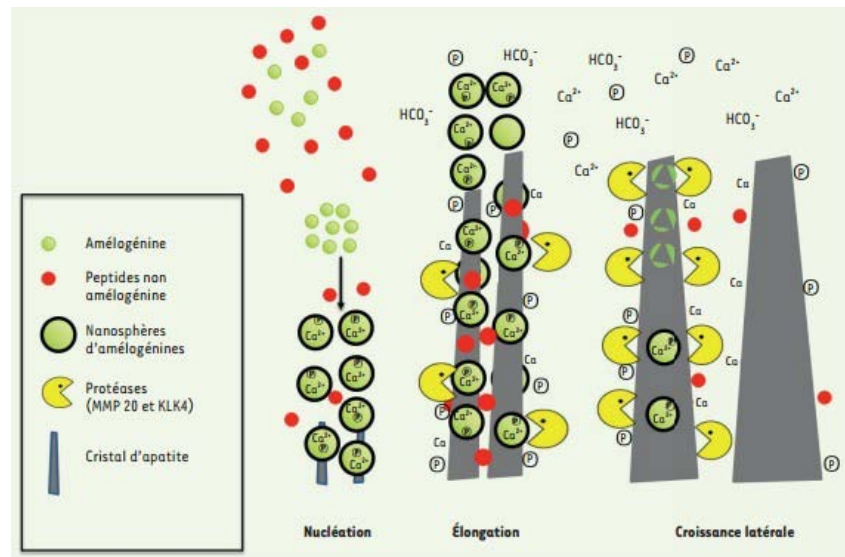


Figure 10: Représentation schématique de la nucléation et de la croissance des cristaux d'émail. Dans un premier temps, les protéines sécrétées par les améloblastes vont s'assembler en nanosphères ou rester sous forme de monomère et vont permettre d'initier la nucléation cristalline en se chargeant de P_i et de calcium. Au cours de l'élongation du cristal, les peptides non amélogénines se positionnent sur le cristal en formation, empêchant sa croissance latérale. La croissance du cristal se fait donc en hauteur. Enfin au stade de la maturation, des protéases sont sécrétées (MMP20 et KLK4) qui vont dégrader les peptides amélaire et permettre la croissance latérale. Figure issue de [22].

3.1.1. Amélogénines

L'amélogénine est la protéine structurelle majeure de la matrice organique de l'émail, constituant plus de 90% du contenu protéique.

Cette protéine est nécessaire pour une formation correcte d'émail comme il a été prouvé par des analyses génétiques humaines, ainsi que des souris invalidées pour le gène codant pour cette protéine. Les différentes stratégies employées pour étudier le rôle de cette protéine (à savoir l'utilisation de souris invalidées pour ce gène ou l'inhibition spécifique de l'expression de l'amélogénine par des ribozymes modifiées chimiquement chez des souris nouveaux-nés) montrent que cette protéine contrôle l'organisation et la croissance des cristaux d'émail. Il est intéressant de noter que chez ces souris invalidées pour cette protéine, la minéralisation de l'émail se produit encore mais de manière déstructurée, ce qui supporte l'hypothèse que cette protéine n'est pas impliquée dans l'initiation de la minéralisation mais est essentielle pour l'élongation et l'obtention d'une épaisseur adéquate d'émail. Afin d'élucider plus précisément la fonction de cette protéine dans le contrôle de la minéralisation, des études *in vitro* ont été menées, qui ont montré que l'amélogénine peut former différents modules structurels, en micelles, rubans ou nanosphères, mais il n'existe pas de consensus sur sa forme

d'autoassemblage *in vivo*. Ces études ont décrypté les mécanismes moléculaires impliquées dans la régulation de la minéralisation par ces protéines et montrent le rôle de l'amélogénine dans l'organisation (parallélisme) et la morphologie des cristaux [20].

3.1.2. Améloblastine

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

L'améloblastine est la seconde protéine amélaire la plus abondante, constituant 5% des protéines totales présentes dans la matrice organique. Elle semble être impliquée dans le contrôle de la structure prismatique de l'émail mais cette hypothèse nécessite confirmation. La partie C-terminale de la protéine possède une forte affinité pour le calcium, suggérant une possible implication de cette protéine dans le contrôle de la minéralisation [20].

3.1.3. Enameline

L'enameline est exprimée pendant les trois principaux stades de la formation de l'émail, mais son expression se termine avant l'expression de l'amélogénine.

A la différence de l'amélogénine, cette protéine est peu abondante dans la matrice extracellulaire.

Chez les souris invalidées pour cette protéine, la synthèse d'émail n'a pas lieu. Chez les hétérozygotes : la déposition initiale de minéral n'est pas observée, seule une minéralisation pathologique de la matrice extracellulaire se produit, conduisant à un matériel calcifié « indéfini ». Les résultats *in vitro* soulignent les propriétés de l'enameline dans le contrôle de la nucléation et de la croissance du cristal [20].

3.2. Phase de maturation

Lors de la phase de maturation, la dégradation des protéines matricielles par des enzymes (la métalloprotéase 20 [MMP20] et la kallikréine 4 [KLK4]) autorise une croissance minérale complète (cf figure 10) [19].

Chapitre 3 : Transporteurs de phosphate et minéralisation dentaire

Le phosphate, qui est le troisième anion le plus abondant de l'organisme, est impliqué dans des processus biologiques fondamentaux et est l'un des constituants majeurs des cristaux d'hydroxyapatite, comme il a été mentionné dans le chapitre précédent. Environ 85% du phosphate de l'organisme est stocké dans les os et les dents, 14% dans les tissus mous tels que les muscles squelettiques et 1% se retrouve dans les fluides extracellulaires. La concentration de Pi intracellulaire est de l'ordre de 0,7 à 2,5 mM, tandis que sa concentration sérique est comprise entre 0,8 et 1,2 mM chez l'Homme [64]. Cette concentration résulte de la balance entre l'absorption intestinale de phosphate et son excrétion et sa réabsorption par le rein, avec l'os servant de réservoir (cf figure 11).

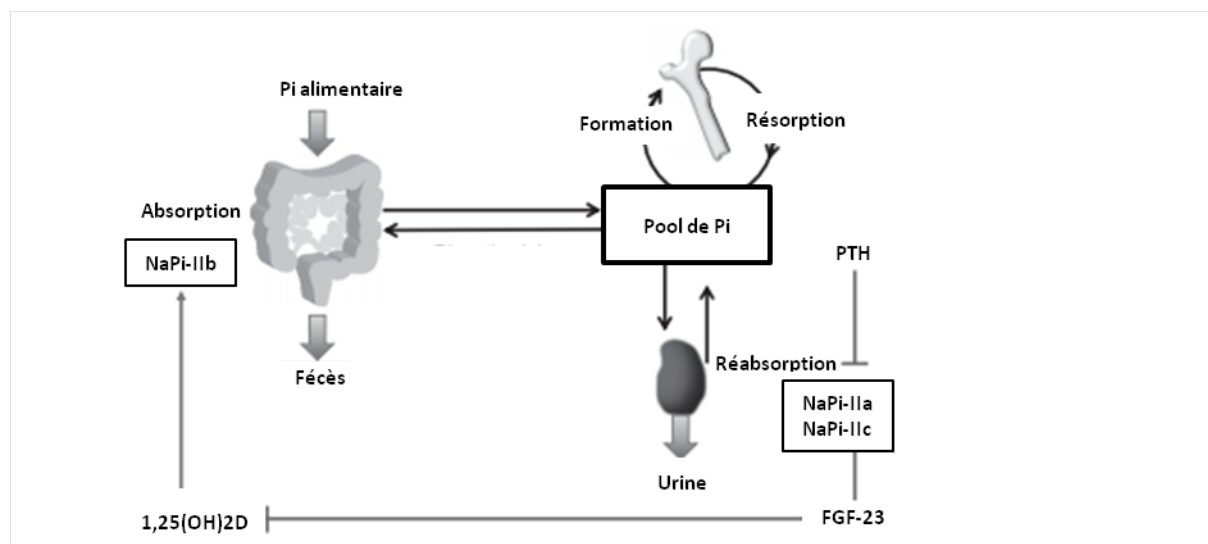


Figure 11: Régulation de l'homéostasie du phosphate, figure adaptée de [65]

Un déséquilibre de l'homéostasie du phosphate au niveau sérique peut avoir des conséquences néfastes sur de nombreux organes, et peut toucher le développement dentaire. Ainsi, un dysfonctionnement rénal suite à une mutation sur une endopeptidase (PHEX) et conduisant au syndrome de rachitisme hypophosphatémique lié à l'X peut conduire, au niveau dentaire, à une dentine hypominéralisée avec un défaut de coalescence, des calcosphérites, des cornes pulpaire élargies et un taurodontisme. A l'inverse, une hyperphosphatémie chez des enfants avec des pathologies rénales chroniques entraîne une hypoplasie de l'émail [66]. La

régulation du phosphate sérique est donc primordiale pour la formation dentaire et sa maintenance.

Il existe au niveau des reins, de l'intestin et de l'os un certain nombre de transporteurs de phosphate qui jouent un rôle clef dans l'homéostasie du Pi.

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

Au niveau du tissu osseux et dentaire, le transport des ions vers les sites de minéralisation a longtemps été supposé se faire de manière passive, impliquant une diffusion simple des ions entre les cellules et vers la prédentine ou la bordure ostéoïde. Cependant, des preuves s'accumulent aujourd'hui pour dire que ce phénomène est médié par les cellules de manière active, ce qui par ailleurs sous-entend que les cellules sont capables de contrôler le taux de minéralisation et ainsi l'homéostasie du Pi et du calcium [67]. Les concentrations des ions calcium et phosphate au niveau des zones de minéralisation sont beaucoup plus élevées que dans le sérum, ce qui suggère que leur transport se fait contre un gradient d'énergie dépendant directement ou indirectement des mécanismes cellulaires.

Il est intéressant d'établir un parallèle avec les reins et l'intestin, où le transport de calcium et de phosphate est important et très étudié, afin de mieux comprendre ce qui pourrait se passer au niveau des tissus minéralisés. Afin de réguler l'homéostasie de ces ions dans l'organisme, l'activité de transport de ces tissus est finement régulée par différents facteurs tels que la concentration de phosphate, de calcium, le fibroblast growth factor 23 (FGF23), la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ (1,25[OH]₂D₃), et l'hormone parathyroïdienne (PTH) (cf figure 11). Ces facteurs interviennent également dans la régulation de la minéralisation osseuse et des récepteurs à la vitamine D et à la PTH ont été identifiés dans les odontoblastes [68].

Nous nous intéresserons donc au sein de ce troisième chapitre aux transporteurs de phosphate exprimés dans les tissus régulant l'homéostasie du phosphate, qui ont été décrits comme des importateurs ou des exportateurs de phosphate et nous nous focaliserons ensuite sur les transporteurs de phosphate exprimés par les cellules minéralisées, et leur rôle dans l'odontogenèse.

1. Différents types de transporteurs de Pi répertoriés

Les premières études effectuées pour connaître le rôle des transporteurs ont été menées sur des ovocytes de xénope, qui sont un système très populaire pour l'expression hétérologue et la caractérisation fonctionnelle de canaux ioniques, de récepteurs et de transporteurs clonés. Cependant, les conditions expérimentales choisies pour caractériser ces systèmes n'ont pas toujours été appropriées, ce qui explique en partie les grandes différences qui peuvent être relevées dans la littérature.

Afin de comprendre le rôle physiologique de ces transporteurs de phosphate, des modèles de souris invalidées pour les différents gènes codants pour ces protéines ont été créés. Cependant, cette stratégie se heurte à un problème, à savoir que l'absence d'un transporteur peut être compensée *in vivo* et c'est pourquoi les souris invalidées pour un seul gène peuvent parfois présenter un phénotype discret.

Au sein de la cellule, certains transporteurs vont permettre l'entrée de Pi. Ces transporteurs ont fait l'objet de nombreuses études et sont assez bien caractérisés. En revanche, les systèmes impliqués dans l'exportation de Pi nécessitent de plus amples investigations.

1.1. Importation de phosphate dans la cellule

Comme mentionné précédemment, la concentration de phosphate intracellulaire est plus élevée que celle trouvée dans le sérum, par conséquent, l'importation de phosphate au sein de la cellule se fait contre un gradient électrochimique. Deux groupes de transporteurs ont été décrits remplir ce rôle : les transporteurs de phosphate sodium-dépendant (NaPi) dont il existe trois types (I, II et III), et les transporteurs de phosphate sodium-indépendant.

1.1.1. Transporteurs de phosphate sodium-dépendant

Les analyses cinétiques ont pu mettre en évidence deux types de transporteurs sodium-dépendant: les transporteurs à faible affinité ($K_m=1.3$ mM), forte capacité ($V_{max}= 1.1$ nmol/s par mg protéines), qui transportent des phosphates divalents, et les transporteurs à forte affinité ($K_m=0.03$ mM), faible capacité ($V_{max}= 0.04$ nmol/s par mg protéines) qui transportent les phosphates mono ou divalents [69] [70].

L'entrée de phosphate à travers la membrane apicale au niveau de la bordure en brosse est couplée énergétiquement au mouvement du sodium. En effet, dans ce transport actif secondaire, l'énergie nécessaire à l'entrée du phosphate contre son gradient résulte du gradient électrochimique du sodium. Ce gradient est créé grâce à l'action du transporteur Na^+ - K^+ -ATPase qui entraîne l'extrusion de sodium au niveau basolatérale de la cellule et permet donc le maintien d'une faible concentration de sodium au sein de la cellule [64]. L'entrée de phosphate couplée au sodium est l'étape limitante de l'absorption et est donc régulée par l'action d'hormones endocriniennes, qui agissent en régulant le nombre de cotransporteurs exprimés [71].

1.1.1.1. Transporteurs haute affinité, faible capacité

Trois types de cotransporteurs de phosphate sodium-dépendant (Na-Pi) ont été identifiés sur la base de leur structure (cf figure 12), de leur expression tissulaire et de leur caractéristique biochimique. Les Na-Pi de type I et II sont exprimés dans l'épithélium rénal et intestinal et jouent un rôle important dans l'homéostasie du phosphate (cf figure 12). On les retrouve également dans d'autres tissus tels que le foie ou le cerveau. Les Na-Pi de type III sont exprimés de manière dite ubiquitaire mais avec des niveaux d'expression variables selon les tissus. Ils sont plus fortement exprimés dans les reins, le foie, les poumons, le cœur, le cerveau, les ostéoblastes, les odontoblastes et les chondrocytes [64].

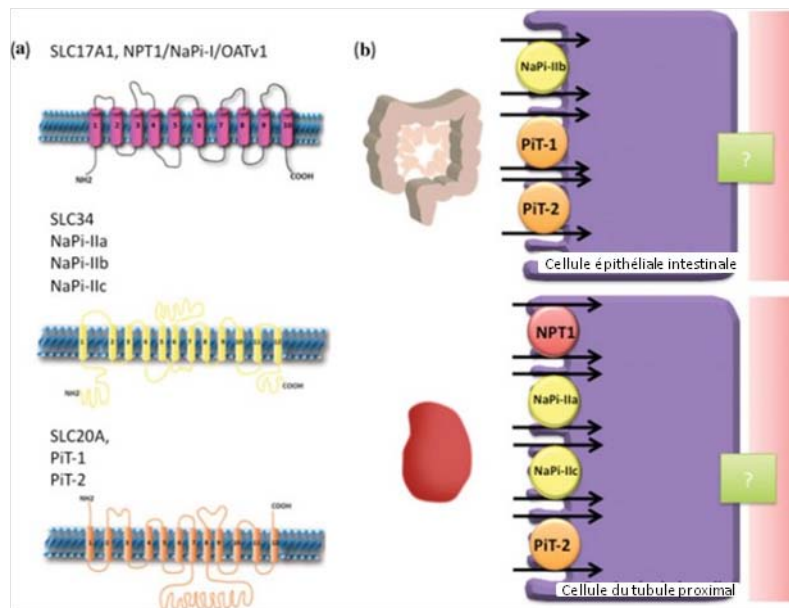


Figure 12: Représentation schématique des transporteurs de phosphate sodium-dépendant (NaPi) issue de [72]. (a) Représentation de la structure membranaire des trois types de transporteurs NaPi : SLC17A1 (NPT1/NaPi-I), SLC34 (NPT2a, NPT2b, NPT2c), et SLC20 (PiT1/2). (b) Localisation des NaPi au niveau des cellules rénales et intestinales.

1) SLC17A1/Npt1/ NaPi type I

La famille des SLC17 comprend neuf membres chez l'Homme. Les NaPi de type I (SLC17A1 et SLC17A3) sont principalement présents dans la membrane luminale des tubules rénaux. Une autre étude a reporté leur expression dans le cerveau.

Les membres de cette famille ont originellement été reportés appartenir à la famille des transporteurs de phosphate. En effet, dans des études menées dans des ovocytes de xénope, il a été montré que NPT1 produisait un transport électrogène de phosphate mais uniquement en présence de concentrations très élevées de Pi extracellulaire (>3 mM).

Afin de comprendre la contribution de NPT1 dans la régulation de l'homéostasie du phosphate, des souris invalidées pour le gène *Npt1* ont été étudiées. Ces souris présentent un niveau de calcium et de phosphate plasmatique physiologique.

Par la suite, il a été montré que ces protéines sont impliquées dans le transport d'autres anions [72] et que des mutations de ces protéines favorisent l'apparition de la goutte [73].

2) SLC34

Il existe trois isoformes du cotransporteur sodium phosphate de la famille SLC34 (NaPi-IIa, NaPi-IIb, NaPi-IIc), qui sont sélectifs pour les ions phosphates divalents (HPO_4^{2-}) [64]. La capacité de transport est fortement dépendante du pH. En effet, le pH définit la forme sous laquelle se trouve le phosphate (monovalent ou divalent) et les protons modulent directement la cinétique du transport [71]. A pH 7.4, ces cotransporteurs présentent tous trois une affinité quasi identique pour leur substrat : $100\mu\text{M}$ pour le Pi et 40 mM pour le Na^+ . Ces valeurs sont plus faibles que la concentration physiologique trouvée dans les tubules rénaux proximaux, donc ces protéines fonctionnent à taux plein, au moins dans le segment S1.

NaPi-IIa and NaPi-IIb sont électrogéniques (stoechiométrie Na^+ -Pi 3:1), tandis que NaPi-IIc est électroneutre (stoechiométrie Na^+ -Pi 2:1). Cette différence de stoechiométries signifie que NaPi-IIa/b ont la capacité de concentrer en théorie cent fois plus de Pi que NaPi-IIc, avec une entrée d'ions Na^+ dix fois plus forte que NaPi-IIc et un flux de charges qui doivent être compensés par l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase [64] (cf figure 13).

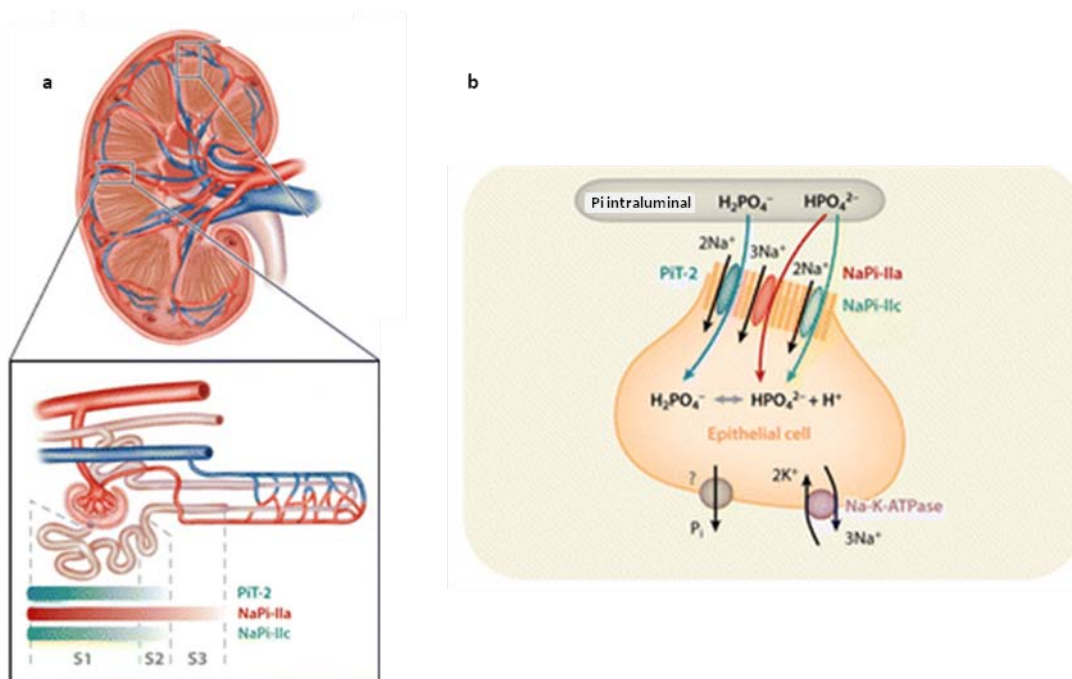


Figure 13: Représentation de la distribution et la la localisation des transporteurs de phosphate dans le tissu rénal d'après [71]. (a) Coupe d'un rein et localisation de PiT-2, NaPi-IIa et NaPi-IIc au niveau des segments des tubules proximaux. (b) Représentation schématique du flux de phosphate (sous forme mono ou divalent) au sein d'une cellule épithéliale rénale.

- SLC34A1/Npt2a/NaPi-IIa

NaPi-IIa est principalement exprimé dans les tubules proximaux du rein, au niveau de la membrane apicale des cellules rénales. Son expression est plus élevée au niveau du segment S1 mais s'étend à S2/S3 lors d'une diminution de la concentration en phosphate [89] (cf figure 13). L'ARN messager de NaPi-IIa a également été détecté dans l'os et le cerveau, mais son expression protéique dans ces tissus n'a pas été confirmée [74].

Le rôle de ce transporteur, étudié par le biais des mutations, n'est pas encore complètement élucidé. Dans des études sur des souris knockout (Npt2a^{-/-}), la réabsorption rénale de Pi est fortement réduite, ce qui résulte en une hyperphosphaturie et une hypophosphatémie. Les concentrations sériques en Vitamine D₃ et en calcium sont augmentées et une hypercalciurie est également observée. Les souris Npt2a^{-/-} ne présentent aucune anomalie osseuse. Dans le modèle murin, NaPi-IIa joue un rôle majeur dans la réabsorption rénale du Pi (70 à 80% de la réabsorption) [74].

Chez l'Homme, les mutations touchant NaPi-IIa causent le syndrome autosomal récessif de Fanconi, caractérisé par un rachitisme hypophosphatémique [65].

L'expression de ce transporteur est stimulée dans le cadre d'un régime pauvre en Pi, et inversement, elle est inhibée en présence d'un régime riche en Pi, de PTH et de FGF-23 [65].

- SLC34A2/Npt2b/ NaPi-IIb

NaPi-IIb est une protéine dont l'expression a été détectée dans de nombreux tissus, à savoir les poumons, les glandes salivaires, la thyroïde, l'intestin grêle, le foie, les glandes mammaires et l'utérus [74]. Au niveau de l'intestin grêle, cette protéine est retrouvée au niveau de la bordure en brosse (luminale), dans le duodénum et le jéjunum chez le rat et l'Homme, et dans l'iléum principalement chez la souris [64].

Les souris knock-out pour NaPi-IIb ne sont pas viables. La délétion par recombinaison homologue de ce gène chez des souris adultes entraîne une calcification pulmonaire et une absorption réduite de phosphate. Ces calcifications pulmonaires sont retrouvées chez des patients dont le gène SLC34A2 présente des mutations [64].

Basé sur plusieurs études de souris hétérozygotes NaPi-IIb (Npt2b^{+/-}) et knock-out conditionnelles, NaPi-IIb semble être le transporteur transcellulaire le plus important.

L'expression de ce transporteur est stimulée dans le cadre d'un régime pauvre en Pi, et inversement, elle est inhibée en présence d'un régime riche en Pi. Le 1,25-dihydroxyvitamine D₃ stimule l'expression intestinale de NaPi-IIb [65].

- SLC34A3/Npt2c/ NaPi-IIc

NaPi-IIc est localisé chez l'Homme principalement au niveau du tissu rénal, et particulièrement au niveau de la bordure en brosse des cellules du tubule proximal (segment S1) [74] (cf figure 13). Lors d'une déprivation de Pi, cette protéine est également détectée au niveau des néphrons superficiels. NaPi-IIc semble également se trouver au niveau de l'os mais son rôle dans ce tissu n'est pas encore élucidé [64].

Des études fonctionnelles suggèrent que les mutations sur le gène de NaPi-IIc diminuent de manière significative l'activité de transport de phosphate dans les ovocytes de xénope et les cellules rénales de l'opossum [65].

Chez l'Homme, les mutations de Npt2c conduisent à un rachitisme hypophosphatémique hypercalciurique héréditaire (HHRH). Cette pathologie s'explique par une diminution d'absorption rénale du phosphate, conduisant à des défauts de croissance et de minéralisation osseuse. En contrepartie, on observe une augmentation de synthèse de la 1,25-OH₂ Vitamine D₃ qui stimule l'absorption intestinale de phosphate et de calcium, qui va entraîner une excrétion prononcée de calcium dans les urines, qui sera à l'origine de néphrolithiase et de néphrocalcinose [65].

De manière inattendue, les souris invalidées pour ce gène ne présentent aucun phénotype remarquable. Ce qui suggère que NaPi-IIc joue un rôle majeur chez l'Homme, contrairement à ce qui se passe au niveau du modèle murin. Seules les souris double knock-out pour NaPi-IIa/NaPi-IIc présentent les caractéristiques similaires aux patients HHRH [65].

L'expression de NaPi-IIc est stimulée en réponse à un régime pauvre en Pi et supprimée par un régime riche en Pi, par le PTH et le FGF-23 [65].

3) SLC20A

La famille des transporteurs SLC20 comporte deux membres incluant PiT-1 (SLC20A1) et PiT-2 (SLC20A2). Les transporteurs NaPi de type III ont été initialement décrits en tant que

récepteurs rétroviraux. Ce n'est que plus tard qu'a émergé l'idée qu'ils appartaient à la famille des transporteurs de phosphate chez les mammifères.

Ces transporteurs ont une affinité plus élevée pour les phosphates monovalents et leur activité ne varie pas en fonction du pH. Ceci suggère que ce sont ces NaPi qui assurent le transport de phosphate dans des conditions où les NaPi de type II ne sont pas fonctionnels [71].

PiT-1 and PiT-2 sont exprimés de manière ubiquitaire et auraient des fonctions de régulation de l'entrée du Pi dans les cellules (protéines de ménage ou "housekeeping") [72].

- SLC20A1/PiT-1

Des études récentes ont suggéré que PiT-1 jouerait un rôle important dans la physiologie osseuse et vasculaire. Afin de mieux comprendre le rôle de PiT-1 *in vivo*, des souris knock-out pour PiT-1 ont été créées par deux groupes différents. Les embryons de ces souris présentent de sévères anémies et ne sont pas viables.

De nombreuses études ont montré que PiT-1 serait impliqué dans le développement osseux et la minéralisation. Ainsi, PiT-1 est détecté dans le modèle murin dès le stade embryonnaire dans des chondrocytes hypertrophiques qui initient la minéralisation. Ces fonctions seront revues dans la seconde partie de ce chapitre.

PiT-1 est également impliqué dans des phénomènes de minéralisations pathologiques de cellules musculaires lisses vasculaires. De récentes études lui ont également attribué un rôle dans la prolifération cellulaire [75, la maturation des cellules érythroïdes {Forand, 2013 #110} et le développement embryonnaire [72].

D'autres investigations sont nécessaires pour appréhender le rôle de ces transporteurs et déterminer leur implication fonctionnelle dans différentes cellules telles que les cellules thyroïdiennes ou les ostéoclastes [76].

Le Pi extracellulaire et d'autres facteurs, tels que l'épinéphrine, l'insulin-like growth factor 1, et la BMP-2, régulent l'expression de PiT-1 au sein de différents types cellulaires, dont les cellules osseuses [72].

- SLC20A2/PiT2

PiT-2 est également exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme.

Des études récentes ont montré qu'une mutation autosomale dominante de PiT-2 serait impliquée dans la maladie de Fahr (familial idiopathic basal ganglia calcification (FIBCG)), caractérisée par des calcifications au niveau du ganglion basal. Aucun phénotype osseux n'est décrit dans cette pathologie. Ces mêmes caractéristiques sont trouvées chez des souris invalidées pour PiT-2 [76]. Son implication éventuelle dans les phénomènes de minéralisation sera discutée dans la section suivante.

Par ailleurs, PiT-2 semble être un nouveau médiateur de la réabsorption de Pi dans les tubules rénaux proximaux dans des conditions de déprivation en Pi [77].

1.1.1.2. Transporteurs à faible affinité, forte capacité

Certaines études ont montré que les transporteurs à faible affinité forte capacité se situent au niveau des bordures en brosse des membranes des cellules du tissu cortical superficiel situé au niveau des tubules proximaux, tandis que les transporteurs à forte affinité faible capacité sont localisés au niveau des bordures en brosse des membranes des cellules du tissu médullaire [78].

Les propriétés de ces deux types de transporteurs de phosphate sodium-dépendant sont différentes. Ainsi, les transporteurs haute affinité, faible capacité sont inhibés de manière compétitive par 1mM d'acide phosphonoformique (PFA) et leur action est complètement inhibée à 20mM de PFA. En revanche, les transporteurs faible affinité et haute capacité sont insensibles face à 1 mM de PFA, et ils sont inhibés de manière compétitive à 20mM de PFA [79].

Bien que leurs propriétés aient été mises en évidence, la nature et le rôle exacts de ces transporteurs à faible affinité haute capacité restent à être élucidés.

1.1.2. Transporteurs de phosphate sodium-indépendant

Des études ont été menées sur l'entrée de phosphate au niveau des bordures en brosse des cellules du tissu médullaire rénal en l'absence de sodium à 21°C et à pH 8. L'existence de transporteurs de phosphate sodium-indépendant a été mise en évidence par ce biais [80].

Des études récentes menées sur des cellules ostéoclastiques ont montré que l'entrée de phosphate au sein de ces cellules était couplée à une acidification du milieu. Les

caractéristiques fonctionnelles de ces transporteurs ont été grandement étudiées dans différents types cellulaires, mais leur identité moléculaire reste à être déterminée [81].

1.2. Exportation de phosphate et transporteurs XPR1

Le modèle de transport reconnu dans les cellules épithéliales consiste en une entrée de phosphate par un mécanisme actif secondaire via des cotransporteurs NaPi au niveau de la membrane apicale comme décrit précédemment, et une sortie passive de phosphate sodium-indépendant au niveau de la membrane basolatérale. Des études menées sur des cellules rénales issues d'animaux déprivés en phosphate et des cellules rénales du tubule proximal d'opossum, souvent utilisées en tant que modèle du tissu proximal rénal, montrent que les concentrations intracellulaires en phosphate sont faibles, ce qui va à l'encontre d'une diffusion passive de phosphate à travers la membrane basolatérale des cellules. Ceci suggère donc qu'il existe des transporteurs médiant la sortie du phosphate de ces cellules [81].

Cependant, les caractéristiques et l'identité moléculaire des transporteurs impliqués au niveau basolatéral des cellules rénales ne sont pas bien établies. Par ailleurs, quelques études ont examiné la sortie de phosphate dans d'autres types cellulaires tels que des cellules pancréatiques, des cellules nerveuses, ou des ostéoclastes sans toutefois identifier les transporteurs impliqués [76].

Les transporteurs étudiés dans les cellules ostéoclastiques ont une activité augmentée par le Pi extracellulaire mais non par le citrate ou le glutamate, contrairement à ce qui se passe au sein des cellules rénales, ce qui suggère que différents systèmes d'exportation d'anions existent spécifiquement en fonction des cellules [81].

L'un des candidats possibles pour les cellules ostéoclastiques est la protéine XPR1, qui est une protéine membranaire identifiée originellement en tant que récepteur pour des retrovirus. Il a été montré qu'une surexpression de XPR1 induisait une exportation de phosphate, alors qu'à l'inverse, un knock-down de cette protéine diminuait la sortie de phosphate des cellules de mammifères [82]. Par ailleurs, des mutations sur le gène codant pour XPR1 et conduisant à une perte de fonction de cette protéine ont récemment été corrélées à des cas de calcifications cérébrales primaires familiales [83]. Néanmoins, les mécanismes précis médiés par ce transporteur ne sont pas encore connus.

2. Implication fonctionnelle des transporteurs de phosphate dans la minéralisation

Le phosphate, à l'instar du calcium, joue un rôle dans l'odontogenèse et l'ostéogenèse à la fois en tant que constituant du minéral dentaire ou osseux, mais également comme molécule de signalisation. De nombreuses études ont montré qu'un déséquilibre au niveau de l'homéostasie du Pi avait une incidence sur la formation des tissus dentaires chez l'Homme et chez les rongeurs [66]. Les transporteurs de phosphate, localisés au niveau rénal ou intestinal et impliqués dans la régulation du phosphate sérique, peuvent ainsi jouer indirectement un rôle sur les processus de minéralisation.

Au niveau local, pendant les processus de minéralisation osseuse, les ions calcium et phosphate doivent être déplacés de la circulation vers les sites de formation du minéral. Afin que les cellules puissent réguler le taux de minéralisation en fonction des besoins de l'organisme, il est logique de penser que les mécanismes de transport se font de manière contrôlée et non par simple diffusion. Les concentrations des ions sont plus importantes au niveau de la bordure ostéoïde ou de la prédentine que dans le fluide extracellulaire, ce qui suggère que les transports sont ATP-dépendant et partiellement transcellulaires. Par ailleurs, il n'est pas connu dans quelle mesure les transporteurs de phosphate et l'influx de Pi dans la cellule affectent les voies de signalisation intracellulaire et peuvent influencer de manière directe ou indirecte sur les mécanismes de minéralisation au cours de l'ostéogenèse ou de l'odontogenèse.

De nombreuses données sont disponibles sur le transport et le rôle du calcium au cours de la minéralisation, en revanche, le métabolisme du phosphate a reçu beaucoup moins d'attention. Nous nous attacherons dans cette dernière partie à étudier l'expression des transporteurs de phosphate et leur rôle au cours de l'odontogenèse. Les données sont incomplètes et souvent contradictoires et nécessitent donc d'être confirmées. Les tissus osseux et dentaires partageant un certain nombre de caractéristiques communes et les mécanismes de transport présents étant similaires, il est intéressant d'établir un parallèle entre ces deux tissus.

2.1. Expression et rôle des transporteurs de Pi dans les odontoblastes

Les odontoblastes jouent un rôle actif dans le transport des ions calcium et phosphate au niveau du front de minéralisation. Il a été montré que les odontoblastes font entrer le Pi par

l'intermédiaire de transporteurs sodium-dépendant [67], tandis que les mécanismes impliqués dans l'extrusion du phosphate au niveau apical ne sont pas connus.

PiT-1 et PiT-2 ont été les premiers transporteurs de phosphate à avoir été identifiés dans des cellules de tissus minéralisés [67]. Cependant, l'expression de ces transporteurs varie selon les études ou selon les lignées cellulaires utilisées. Ainsi, certaines études ont montré une faible expression de PiT-1 et une expression plus élevée de PiT-2 dans les odontoblastes issus d'incisives de rat [67], tandis que d'autres études ont montré que les odontoblastes et les cémentoblastes n'expriment pas PiT-2 [83]. Dans certaines lignées cellulaires *in vitro*, il a été montré que seuls ces deux transporteurs de phosphate sont exprimés [85]. Les transporteurs PiT-1 semblent impliqués dans la minéralisation des tissus dentaires, cependant les mécanismes mis en oeuvre dans la transduction des signaux intracellulaires ne sont pas encore élucidés [68]. Particulièrement, il semblerait que ces transporteurs soient impliqués dans les mécanismes de minéralisation impliquant les vésicules matricielles (cf section 2.4.3). Le rôle de ces protéines dans ces mécanismes est décrit au sein des ostéoblastes et des chondrocytes, qui expriment également PiT-1 et PiT-2 (cf le paragraphe suivant), et ressemblerait à ce qui se passe lors de la formation du manteau dentinaire par les odontoblastes.

De plus, des études *in vitro* menées sur des modèles de cellules odontoblastiques, les MRPC-1, mettent en évidence la co-expression de NaPi-IIa et NaPi-IIb. Cette co-expression semble être caractéristique des cellules formant du minéral et tranche avec ce qui se passe au niveau rénal ou intestinal, où seul l'un ou l'autre type de transporteur est exprimé. Dans les MRCP-1, les protéines NaPi-IIa et le transport de phosphate sont augmentés avant la formation de minéral *in vitro*, ce qui donne une preuve supplémentaire du rôle décisif joué par le transport cellulaire d'ions pendant la formation du minéral [86].

Ces cotransporteurs NaPi sont exprimés dans les odontoblastes produisant l'orthodentine mais pas dans les odontoblastes impliqués dans la formation du manteau dentinaire, ce qui confirme que ces deux types de dentine sont formés de manière différente [67]. Ces transporteurs ne sont pas mis en évidence par des colorations immunohistochimiques sur des organes dentaires avant le début de la minéralisation. Ces transporteurs NaPi-IIa et NaPi-IIb ont été localisés au niveau du pôle faisant face à la pulpe dans les odontoblastes, et de manière surprenante au niveau du pôle faisant face à la prédentine. Ces transporteurs face à la prédentine peuvent être impliqués dans une régulation fine du phosphate à ce niveau. En effet, l'extrusion du phosphate étant suspectée de se faire de manière non régulée, une réabsorption

active de Pi peut être effectuée de la prédentine par ces transporteurs afin d'en retirer l'excès d'ions [67].

Il a été montré dans des cellules issues de pulpe humaine que le phosphate régule l'expression de certaines protéines telle que la BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) en activant la voie de signalisation intracellulaire médiée par ERK1/2 après son entrée dans la cellule via les transporteurs PiT-1 et PiT-2. Ceci est suggéré par l'utilisation de PFA, qui est, comme vu précédemment, un inhibiteur des transporteurs NaPi. Cependant, cette hypothèse doit être confirmée car d'une part le PFA est un faible inhibiteur des transporteurs de type III et d'autre part, le PFA inhibe la formation des cristaux d'hydroxyapatite qui pourraient être à l'origine de la régulation de l'expression de BMP-2 via l'activation des MAPK [87].

Par ailleurs, des études menées sur des souris *hyp*, possédant une mutation du gène Phex (phosphate regulating gene homologies to endopeptidase sur le chromosome X), montrent qu'elles présentent une réduction de l'expression de Npt-2a et 2c au niveau rénal et de Npt-2b au niveau intestinal, ce qui explique l'hypophosphatémie observée chez ces animaux. De plus, une diminution de l'expression de Npt-2a au niveau des germes dentaires est également relevée, qui est corrélée à une hypominéralisation osseuse, dentinaire et des défauts au niveau de l'émail. Il est cependant intéressant de noter que la régulation de l'expression des transporteurs de phosphate implique une régulation hormonale (via le FGF-2) au niveau rénal, contrairement à ce qui se passe au niveau dentaire [88].

2.2. Expression et rôle des transporteurs de Pi dans les améloblastes

Le transport de Pi et de calcium dans la matrice amélaire est essentiel dans la formation d'un émail correctement minéralisé. Alors que les mécanismes et les facteurs gouvernant la transport de calcium dans l'émail ont été extensivement investigués, les caractéristiques et la régulation du transport de Pi dans cette structure demeurent peu connues [68].

PiT-1 est exprimé dans les améloblastes au stade sécrétoire et dans les cellules du stratum intermedium [68]. Des études ont été menées sur l'expression spatio-temporelle de PiT-2 pendant le développement dentaire chez la souris. L'expression de PiT-2 est retrouvée dans les améloblastes de la phase sécrétoire, la papille dentaire, et le stratum intermedium (cf figure14) [84]. Ces données suggèrent que l'entrée de phosphate est nécessaire pour l'activité de ces cellules et/ou pour la progression de la minéralisation amélaire pendant la phase sécrétoire.

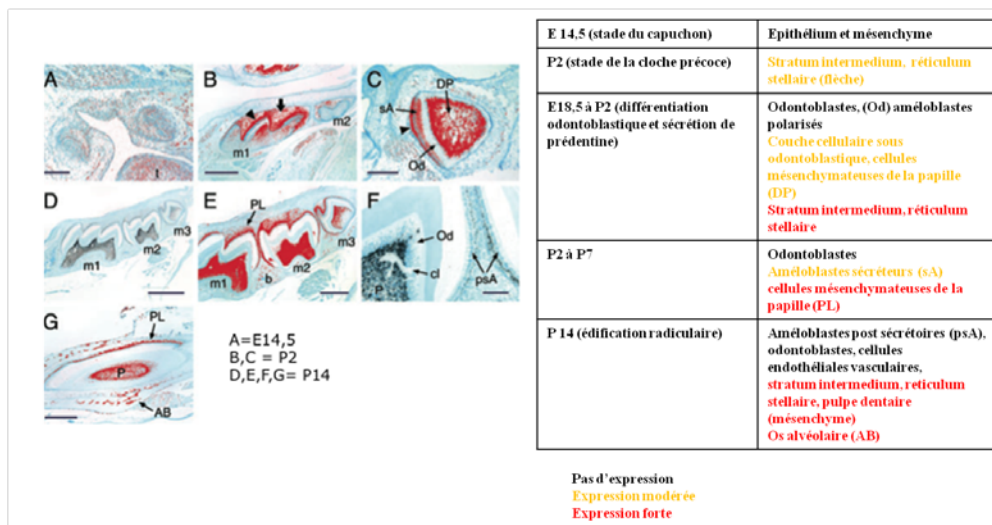


Figure 14: Hybridation in situ montrant l'expression spatio-temporelle de PiT-2 pendant différents stades du développement dentaire murin, issu de [83] et tableau récapitulatif (Dr L. Merametdjian)

Les NaPi-IIa et NaPi-IIb sont également exprimés dans les améloblastes, comme ce qui a été vu dans les odontoblastes et les cellules osseuses, pendant et après le stade de sécrétion, ce qui indique que la présence de ces deux transporteurs est une caractéristique commune des cellules formant du minéral [67]. L'activité de ces transporteurs serait liée à un transport transcellulaire de Pi. Il a été montré que ce transport d'ions à travers la couche d'améloblastes est dépendant du stade développemental de ces cellules [67].

Une étude menée sur des tissus dentaires issus de rats transgéniques surexprimant le transporteur PiT-1 a montré une minéralisation retardée uniquement au niveau de l'émail des incisives mandibulaires, ce qui suggère des différences dans les mécanismes mis en jeu entre la mandibule et le maxillaire. Les améloblastes issus de ces rats perdent leur polarité au stade de maturation, ce qui pourrait conduire à un émail plus fragile selon les auteurs.

Par ailleurs, des anomalies de différenciation des améloblastes apparaissent dès l'âge de 4 semaines chez ces rats, âge pour lequel aucune anomalie dans les concentrations sériques de phosphate et de calcium n'a été détectée, ce qui suggère que non seulement l'homéostasie du phosphate au niveau sérique importe, mais la régulation régionale du phosphate entre également en ligne de compte dans le développement dentaire [68].

2.3. Rôle et expression des transporteurs de phosphate dans les ostéoblastes et chondrocytes

PiT-1 et PiT-2 sont tous deux exprimés par les ostéoblastes et les chondrocytes, cependant PiT-1 semble être le médiateur majeur de l'entrée de Pi dans ces types cellulaires. Ces transporteurs de phosphate sont régulés par un certain nombre de facteurs ostéogéniques, tels que la BMP-2 [86]. Les souris inactivées pour PiT-1 n'étant pas viables à la naissance, des études ont été menées chez des souris dont les deux allèles de PiT-1 sont hypomorphes. Chez ces souris, PiT-1 n'est exprimé qu'à 15% de son expression comparé aux souris sauvages, cependant ces souris ne présentent pas de phénotype osseux. Par ailleurs, il a pu être observé une augmentation de l'expression de PiT-2 chez ces souris. Ces résultats suggèrent donc que soit PiT-1 joue un rôle mineur dans la minéralisation osseuse, soit sa faible expression est suffisante pour remplir ses fonctions, soit l'augmentation de PiT-2 compense l'activité de PiT-1, les autres transporteurs étant faiblement exprimés [89].

Des études ont également montré, à l'instar des odontoblastes, que les ostéoblastes expriment également NaPi-IIa et NaPi-IIb. Le phénotype osseux partiellement perturbé décrit pour les souris *npt2a*^{-/-} peut s'expliquer par une compensation de l'activité de NaPi-IIa par d'autres transporteurs dont NaPi-IIb [67].

Comme mentionné dans le chapitre précédent, des vésicules matricielles semblent être impliquées dans la formation de minéral dans les odontoblastes, les ostéoblastes et les chondrocytes. Des études ont montré une augmentation de l'expression de PiT-1 dans les chondrocytes hypertrophiques, corrélée à l'enrichissement de Pi dans les vésicules matricielles, pour promouvoir la minéralisation matricielle [58]. Des études menées sur une invalidation conditionnelle de PiT-1 dans les chondrocytes montrent peu d'effet sur la minéralisation. En revanche, des souris à la fois knock-out pour Phospho-1 et invalidées de manière conditionnelle pour PiT-1 [*Phospho-1*^{-/-}; *Pit1*^{col2/col2}] présentent un déficit de minéralisation plus sévère que des souris uniquement invalidées pour Phospho-1, ce qui met en évidence le rôle de PiT-1 dans l'initiation de la minéralisation dans les chondrocytes. Mais ces défauts de minéralisation restent toutefois moins sévères que chez des souris doublement invalidées pour Phospho-1 et ALP. Ceci peut s'expliquer d'une part parce que chez les souris [*Phospho-1*^{-/-}; *Pit1*^{col2/col2}], l'expression de PiT-1 n'est inhibée qu'à 70%. Une autre

explication serait la possibilité d'une compensation de l'activité de PiT-1 par d'autres transporteurs de phosphate (tels que PiT-2 ou d'autres transporteurs non déterminés) [90].

Les mêmes mécanismes peuvent probablement être appliqués aux vésicules matricielles présentes dans les ostéoblastes et les odontoblastes. Cependant, les études concernant les transporteurs de phosphate dans les ostéoblastes et les chondrocytes sont parfois contradictoires et incomplètes et des investigations plus poussées sont nécessaires pour mieux appréhender les rôles et la nature des protéines impliquées.

CONCLUSION

Les dents et leur parodonte sont des organes d'origine épithéliomésenchymateuse complexes, qui sont produits par des cellules spécialisées. Les quatre tissus minéralisés qui les composent, à savoir l'émail, la dentine, le ciment et l'os alvéolaire, sont constitués de cristaux d'hydroxyapatite mais ils possèdent chacun une structure et des propriétés qui leur sont propres.

La formation de ces différents tissus dépend de différents mécanismes généraux encore à l'étude impliquant une matrice collagénique et/ou des protéines non collagéniques. A la différence des matériaux synthétiques, réalisés sous des conditions extrêmes, les biominéraux se forment à température et pression ambiantes à partir de composés de faible résistance pris individuellement, cependant une fois formés, ces biominéraux ont des propriétés remarquables dues à leur organisation structurale et à l'interaction entre les composants minéraux et organiques au niveau moléculaire. La compréhension de ces mécanismes lance la génération de matériaux synthétiques biomimétiques dont la synthèse se fait en calquant les principes biologiques d'assemblage et d'organisation et donne des perspectives excitantes dans le domaine de l'ingénierie et de la régénération tissulaires des tissus durs [91].

Le phosphate inorganique joue un rôle prépondérant dans ces mécanismes de minéralisation en tant que constituant principal des cristaux d'hydroxyapatite avec le calcium. A partir du plasma, le phosphate entre dans les cellules via des protéines spécifiques, les transporteurs de phosphate, et est incorporé à la matrice des tissus minéralisés. La régulation de l'homéostasie du phosphate au niveau sérique (par le rein, l'intestin et l'os) et au niveau cellulaire est donc primordiale pour le développement, la maintenance et la réparation (et de manière supposée la régénération) des tissus minéralisés, incluant la dent. De nombreuses études ont en effet montré des anomalies squelettiques ou dentaires liées à des mutations ou des invalidation des transporteurs de phosphate. Par ailleurs, le phosphate, outre son rôle en tant que constituant du minéral, a été montré cette dernière décennie jouer un rôle prépondérant de

molécule de signalisation [92], impliquée dans la différenciation et la prolifération cellulaires. Il peut ainsi être impliqué de manière indirecte dans la minéralisation en contrôlant l'expression de gènes engagés dans la régulation de la minéralisation. Cependant, l'implication des transporteurs de phosphate dans ce rôle n'est pas bien établie et nécessite de nouvelles études.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ohazama, A., et al., *Ectoderm, endoderm, and the evolution of heterodont dentitions*. *Genesis*, 2010; **48**(6): p. 382-9.
2. Jheon, A.H., et al., *From molecules to mastication: the development and evolution of teeth*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2013. **2**(2): p. 165-82.
3. Kawashima, N. and T. Okiji, *Odontoblasts: specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex*. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2016.
4. Pansky, B., *Review of Medical Embryology*. Macmillan: Paperback ed., 1982: 496.
5. Mina, M. and E.J. Kollar, *The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium*. *Arch Oral Biol*, 1987; **32**(2): p. 123-7.
6. Thesleff, I. and M. Tummers, *Tooth organogenesis and regeneration*. Cambridge. StemBook, ed. the Stem Cell Research Community, 2009; stembook.1.37.1, <http://www.stembook.org>
7. Goldberg, M. and A.J. Smith, *Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: a Biological Basis for Repair and Tissue Engineering*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004; **15**(1): p. 13-27.
8. Maurin, J.C., et al., [*Odontoblast: a key cell involved in the perception of dentinal pain*]. *Med Sci (Paris)*, 2013; **29**(3): p. 293-9.
9. Love, R.M. and H.F. Jenkinson, *Invasion of dentinal tubules by oral bacteria*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002; **13**(2): p. 171-83.
10. Goldberg, M., et al., *Dentin: structure, composition and mineralization*. *Front Biosci*, 2012; **3**: p. 711-35.
11. Smith, A.J., et al., *Influence of substrate nature and immobilization of implanted dentin matrix components during induction of reparative dentinogenesis*. *Connect Tissue Res*, 1995; **32**(1-4): p. 291-6.

12. Gotliv, B.A. and A. Veis, *Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: role of a phospholipid-proteolipid complex*. *Calcif Tissue Int*, 2007; **81**(3): p. 191-205.
13. Arana-Chavez, V.E. and L.F. Massa, *Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004; **36**(8): p. 1367-73.
14. Zheng, L., et al., *The tick tock of odontogenesis*. *Exp Cell Res*, 2014. **325**(2): p. 83-9.
15. Farges, J.C., et al., *Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries*. *Mediators Inflamm*, 2015; p. 230-251.
16. Goldberg, M., A. Njeh, and E. Uzunoglu, *Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration?* *Mediators Inflamm*, 2015; p. 347-49.
17. Mitsiadis, T.A. and D. Graf, *Cell fate determination during tooth development and regeneration*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2009; **87**(3): p. 199-211.
18. Bei, M., *Molecular genetics of ameloblast cell lineage*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2009; **312B**(5): p. 437-44.
19. Margolis, H.C., S.Y. Kwak, and H. Yamazaki, *Role of mineralization inhibitors in the regulation of hard tissue biomineralization: relevance to initial enamel formation and maturation*. *Front Physiol*, 2014; **5**: p. 339.
20. Moradian-Oldak, J., *Protein-mediated enamel mineralization*. *Front Biosci*, 2012; **17**: p. 1996-2023.
21. Young, M.F., *Skeletal biology: Where matrix meets mineral*. *Matrix Biol*, 2016; **52-54**: p. 1-6.
22. Lignon, G., et al., *[Enamel: a unique self-assembling in mineral world]*. *Med Sci (Paris)*, 2015; **31**(5): p. 515-21.
23. Zhao, N., B.L. Foster, and L.F. Bonewald, *The Cementocyte-An Osteocyte Relative?* *J Dent Res*, 2016; **88**(5): p. 230-234.
24. Bosshardt, D.D., *Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype?* *J Dent Res*, 2005; **84**(5): p. 390-406.
25. Avery JSK, S.P., Avery N, *Oral Development and Histology*. Thieme Medical ed. 2002; Stuttgart. 435.
26. Foster, B.L., et al., *Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration*. *Curr Top Dev Biol*, 2007; **78**: p. 47-126.
27. Brash, J.C., *The Growth of the Alveolar Bone and Its Relation to the Movements of the Teeth Including Eruption*. *Int. J. Orthodontia*, 1928; **14**: p. 196.
28. McKee, M.D., et al., *Extracellular matrix mineralization in periodontal tissues: Noncollagenous matrix proteins, enzymes, and relationship to hypophosphatasia and X-linked hypophosphatemia*. *Periodontol 2000*, 2013; **63**(1): p. 102-22.

29. McKee, M.D., W.N. Addison, and M.T. Kaartinen, *Hierarchies of extracellular matrix and mineral organization in bone of the craniofacial complex and skeleton*. Cells Tissues Organs, 2005; **181**(3-4): p. 176-88.
30. Landis, W.J., et al., *Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography*. Microsc Res Tech, 1996; **33**(2): p. 192-202.
31. McCulloch, C.A., P. Lekic, and M.D. McKee, *Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament*. Periodontol 2000, 2000; **24**: p. 56-72.
32. Berendsen, A.D. and B.R. Olsen, *Bone development*. Bone, 2015; **80**: p. 14-8.
33. Proff, P. and P. Romer, *The molecular mechanism behind bone remodelling: a review*. Clin Oral Investig, 2009; **13**(4): p. 355-62.
34. Beniash, E., J.P. Simmer, and H.C. Margolis, *The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro*. J Struct Biol, 2005; **149**(2): p. 182-90.
35. Baldassarri, M., H.C. Margolis, and E. Beniash, *Compositional determinants of mechanical properties of enamel*. J Dent Res, 2008; **87**(7): p. 645-9.
36. Glimcher, M.J., *The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification*. Instr Course Lect, 1987; **36**: p. 49-69.
37. Boonrungsiman, S., et al., *The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012; **109**(35): p. 14170-5.
38. Glimcher, M.J., *Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1984; **304**(1121): p. 479-508.
39. Giachelli, C.M., *Inducers and inhibitors of biomineralization: lessons from pathological calcification*. Orthod Craniofac Res, 2005; **8**(4): p. 229-31.
40. Boskey, A.L., *Biomineralization: an overview*. Connect Tissue Res, 2003; **44 Suppl 1**: p. 5-9.
41. Bonar, L.C., et al., *Structural and composition studies on the mineral of newly formed dental enamel: a chemical, x-ray diffraction, and 31P and proton nuclear magnetic resonance study*. J Bone Miner Res, 1991; **6**(11): p. 1167-76.
42. Posner, A.S., *The mineral of bone*. Clin Orthop Relat Res, 1985; (200): p. 87-99.
43. Pasteris, J.D.B., and Eugenia , B. Wopen, and E. Valsami-Jones, *Bone and Tooth Mineralization: Why Apatite?* Elements (Que), 2008; **4**(2): p. 97-104.

44. Yamauchi, M., et al., *Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues*. *Connect Tissue Res*, 1989; **21**(1-4): p. 159-67; discussion 168-9.
45. Landis, W.J. and R. Jacquet, *Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues*. *Calcif Tissue Int*, 2013; **93**(4): p. 329-37.
46. Beniash, E., *Biomaterials--hierarchical nanocomposites: the example of bone*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2011; **3**(1): p. 47-69.
47. Weiner, S. and W. Traub, *Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils*. *FEBS Lett*, 1986; **206**(2): p. 262-6.
48. George, A. and A. Veis, *Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition*. *Chem Rev*, 2008; **108**(11): p. 4670-93.
49. Boskey, A.L., et al., *Variation in mineral properties in normal and mutant bones and teeth*. *Cells Tissues Organs*, 2005; **181**(3-4): p. 144-53.
50. Nudelman, F., et al., *In vitro models of collagen biomineralization*. *J Struct Biol*, 2013; **183**(2): p. 258-69.
51. Staines, K.A., V.E. MacRae, and C. Farquharson, *The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling*. *J Endocrinol*, 2012; **214**(3): p. 241-55.
52. Linde, A. and M. Goldberg, *Dentinogenesis*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993; **4**(5): p. 679-728.
53. Landis, W.J., et al., *Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging*. *J Struct Biol*, 1996; **117**(1): p. 24-35.
54. Silver, F.H. and W.J. Landis, *Deposition of apatite in mineralizing vertebrate extracellular matrices: A model of possible nucleation sites on type I collagen*. *Connect Tissue Res*, 2011; **52**(3): p. 242-54.
55. Takano, Y., et al., *Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum*. *Bone*, 2000; **26**(4): p. 333-9.
56. Goldberg, M. and D. Septier, *Visualization of predentine matrix components and endocytic structures in rat incisor odontoblasts with tannic acid*. *J Biol Buccale*, 1989; **17**(4): p. 245-54.
57. Anderson, H.C., *Calcifying matrix vesicles of skeletal tissues*. *Annu Meet Am Inst Oral Biol*, 1974; p. 2-12.
58. Cui, L., et al., *Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation*. *Bone*, 2016; **87**: p. 147-58.

59. Zhou, X., et al., *Phosphate/pyrophosphate and MV-related proteins in mineralisation: discoveries from mouse models*. Int J Biol Sci, 2012; **8**(6): p. 778-90.
60. Golub, E.E., *Biom mineralization and matrix vesicles in biology and pathology*. Semin Immunopathol, 2011; **33**(5): p. 409-17.
61. Termine, J.D. and A.S. Posner, *Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions*. Science, 1966; **153**(3743): p. 1523-5.
62. Hu, J.C., et al., *Enamel formation and amelogenesis imperfecta*. Cells Tissues Organs, 2007; **186**(1): p. 78-85.
63. Margolis, H.C., E. Beniash, and C.E. Fowler, *Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation*. J Dent Res, 2006; **85**(9): p. 775-93.
64. Gattineni, J. and P.A. Friedman, *Regulation of hormone-sensitive renal phosphate transport*. Vitam Horm, 2015; **98**: p. 249-306.
65. Segawa, H., et al., *The roles of Na/Pi-II transporters in phosphate metabolism*. Bone, 2009; **45 Suppl 1**: p. S2-7.
66. Davidovich, E., et al., *Pathophysiology, therapy, and oral implications of renal failure in children and adolescents: an update*. Pediatr Dent, 2005; **27**(2): p. 98-106.
67. Lundquist, P., *Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis*. Swed Dent J Suppl, 2002; (154): p. 1-52.
68. Yoshioka, H., et al., *Incisor enamel formation is impaired in transgenic rats overexpressing the type III NaPi transporter Slc20a1*. Calcif Tissue Int, 2011; **89**(3): p. 192-202.
69. Bindels, R.J., L.A. van den Broek, and C.H. van Os, *Effect of pH on the kinetics of Na⁺-dependent phosphate transport in rat renal brush-border membranes*. Biochim Biophys Acta, 1987; **897**(1): p. 83-92.
70. Quamme, G.A., *Effect of pH on Na⁽⁺⁾-dependent phosphate transport in renal outer cortical and outer medullary BBMV*. Am J Physiol, 1990; **258**(2 Pt 2): p. F356-63.
71. Biber, J., N. Hernando, and I. Forster, *Phosphate transporters and their function*. Annu Rev Physiol, 2013; **75**: p. 535-50.
72. Miyamoto, K., et al., *Sodium-dependent phosphate cotransporters: lessons from gene knockout and mutation studies*. J Pharm Sci, 2011; **100**(9): p. 3719-30.
73. Chiba, T., et al., *NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout*. Arthritis Rheumatol, 2015; **67**(1): p. 281-7.
74. Wagner, C.A., et al., *The SLC34 family of sodium-dependent phosphate transporters*. Pflugers Arch, 2014; **466**(1): p. 139-53.

75. Beck, L., et al., *Identification of a novel function of PiT1 critical for cell proliferation and independent of its phosphate transport activity*. J Biol Chem, 2009; **284**(45): p. 31363-74.
76. Albano, G., et al., *Sodium-dependent phosphate transporters in osteoclast differentiation and function*. PLoS One, 2015; **10**(4): p. e0125104.
77. Villa-Bellosta, R., et al., *The Na⁺-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009; **296**(4): p. F691-9.
78. Yusufi, A.N., et al., *Differential properties of brush-border membrane vesicles from early and late proximal tubules of rat kidney*. Biochim Biophys Acta, 1994; **1191**(1): p. 117-32.
79. Tenenhouse, H.S., A.H. Klugerman, and J.L. Neal, *Effect of phosphonoformic acid, dietary phosphate and the Hyp mutation on kinetically distinct phosphate transport processes in mouse kidney*. Biochim Biophys Acta, 1989; **984**(2): p. 207-13.
80. Quamme, G.A., J.J. Walker, and T.S. Yan, *pH gradient-stimulated phosphate transport in outer medullary brush-border membranes*. Am J Physiol, 1989; **257**(4 Pt 2): p. F639-48.
81. Ito, M., et al., *Unique uptake and efflux systems of inorganic phosphate in osteoclast-like cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007; **292**(1): p. C526-34.
82. Giovannini, D., et al., *Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor XPR1 in metazoans*. Cell Rep, 2013; **3**(6): p. 1866-73.
83. Legati, A., et al., *Mutations in XPR1 cause primary familial brain calcification associated with altered phosphate export*. Nat Genet, 2015; **47**(6): p. 579-81.
84. Zhao, D., et al., *Expression of Pit2 sodium-phosphate cotransporter during murine odontogenesis is developmentally regulated*. Eur J Oral Sci, 2006; **114**(6): p. 517-23.
85. Merametdjian, L., et al., *Expression of phosphate transporters in optimized cell culture models for dental cells biomineralization*. Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol, 2016; **53**(1): p. e16.
86. Lundquist, P., H. Murer, and J. Biber, *Type II Na⁺-Pi cotransporters in osteoblast mineral formation: regulation by inorganic phosphate*. Cell Physiol Biochem, 2007; **19**(1-4): p. 43-56.
87. Tada, H., et al., *Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells*. Bone, 2011; **48**(6): p. 1409-16.
88. Onishi, T., et al., *Phex mutation causes the reduction of npt2b mRNA in teeth*. J Dent Res, 2007; **86**(2): p. 158-62.

89. Bourguine, A., et al., *Mice with hypomorphic expression of the sodium-phosphate cotransporter *PiT1/Slc20a1* have an unexpected normal bone mineralization*. PLoS One, 2013; **8**(6): p. e65979.
90. Yadav, M.C., et al., *Skeletal Mineralization Deficits and Impaired Biogenesis and Function of Chondrocyte-Derived Matrix Vesicles in *Phospho1(-/-)* and *Phospho1/Pit1* Double-Knockout Mice*. J Bone Miner Res, 2016; **31**(6): p. 1275-86.
91. Palmer, L.C., et al., *Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel*. Chem Rev, 2008; **108**(11): p. 4754-83.
92. Khoshniat, S., et al., *The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals*. Cell Mol Life Sci, 2011; **68**(2): p. 205-18.

KHOSHNIAT (Solmaz). –Transporteurs de phosphate et minéralisation dentaire.- 61f. ; ill. ; tabl. ; 82 ref. ; 30 cm (Thèse : Chir. Dent. ; Nantes ; 2016)

RESUME

La dent et son parodonte contiennent les quatre types de tissus minéralisés trouvés chez les vertébrés, à savoir la dentine, l'émail, le ciment et l'os. Bien que tous ces tissus soient constitués de cristaux d'hydroxyapatite, ils ont une structure architecturale et une composition chimique propre. L'étude des mécanismes de minéralisation impliqués dans la formation de ces tissus met en avant le rôle de nombreuses protéines dans la régulation de ce processus, ainsi que l'importance de l'homéostasie du phosphate au niveau local et régional. Le rôle majeur des transporteurs de phosphate sodium-dépendants (NaPi) dans le contrôle de cette homéostasie, et par conséquent de la minéralisation, est suggéré par l'étude de mutations ou d'invalidation des gènes codant pour ces transporteurs.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT : Biologie

MOTS CLEFS MESH

Odontogenèse- Odontogenesis

Calcification dentaire- Tooth calcification

Protéines de transport de phosphate- Phosphate transport proteins

JURY

Assesseur : Docteur Fabienne JORDANA

Assesseur : Professeur Philippe LESCLOUS

Directeur de thèse : Docteur Laure MERAMETDJIAN

Président : Professeur Pierre WEISS

Membre invité : Docteur Laurent BECK

ADRESSE DE L'AUTEUR

1 rue des Genévriers- 44 980 Ste Luce-sur-Loire

Solmazkhoshniat@gmail.com