



HAL
open science

Identification de nouveaux gènes impliqués dans les anomalies crânio-faciales et bucco-dentaires

Mathilde Huckert

► **To cite this version:**

Mathilde Huckert. Identification de nouveaux gènes impliqués dans les anomalies crânio-faciales et bucco-dentaires. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ033 . tel-01363012

HAL Id: tel-01363012

<https://theses.hal.science/tel-01363012>

Submitted on 9 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire de Génétique Médicale UMR_S 1112

THÈSE présentée par :

Mathilde HUCKERT

soutenue le : 8 septembre 2015

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Vie et Santé

**Identification de nouveaux gènes
impliqués dans les anomalies
crânio-faciales et bucco-dentaires**

THÈSE dirigée par :

Mme BLOCH-ZUPAN Agnès
Mme DOLLFUS Hélène

Professeur, Université de Strasbourg
Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme TARDIEU Corinne
Mme POLIARD Anne

Professeur, Université Aix-Marseille
Professeur, Université Paris-Descartes

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M CHELLY Jamel
Mme MILETICH Isabelle

Professeur, IGBMC, Illkirch
Docteur, King's College London, United Kingdom

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Agnès Bloch-Zupan

Je souhaite vous adresser toute ma reconnaissance pour ces années passées à me former, me guider, et m'encadrer. Vous avez suscité chez moi un réel intérêt pour le domaine de la génétique dentaire dès le début de mon cursus. Puis, vous avez mis en œuvre les moyens nécessaires, tant sur le plan technique que relationnel, pour me permettre de réaliser ce travail.

A Madame le Professeur Hélène Dollfus

Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire dès le Master 2, et su orienter mes études grâce à vos précieux conseils. Je tiens également à vous exprimer toute mon admiration pour vos multiples activités : recherche, clinique, soin... que vous menez avec enthousiasme et passion.

A Madame le Professeur Corinne Tardieu

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en siégeant dans ce jury en tant que rapporteur externe. Merci pour toutes nos conversations autour de l'activité hospitalo-universitaire lors des congrès de la SFOP, notamment à Chypre où vous avez eu un réel rôle de confidente pour moi.

A Madame le Professeur Anne Poliard

Merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de me faire bénéficier de vos connaissances scientifiques. Permettez-moi également de vous remercier pour nos échanges lors du TMD à La Londe-les-Maures et de vous rappeler l'excellent moment passé à Porquerolles !

A Monsieur le Professeur Jamel Chelly

Je tiens à vous faire part de toute ma gratitude pour l'intérêt porté à ce travail et votre présence à cette soutenance de thèse.

A Madame le Docteur Isabelle Miletich

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté aussi rapidement de siéger dans ce jury et de faire le déplacement pour évaluer mes recherches.

A Madame Corinne Stoetzel

Présente depuis mon 1^{er} jour de Master 2, tu as pris le temps de me former aux techniques et manipulations de laboratoire, alors que je n'avais jamais fait de « paillasse » ! Merci pour tes conseils et ton soutien.

A tous les membres de l'équipe du laboratoire : Megana, Elise, Sophie S, Cathy, Jean-Marc, Véronique, Kirsley, Xiang-Xiang, Vincent, Julia, Agnès, Yvan, Tun, Fanny, Jean, Malika... Merci pour votre savoir faire, votre disponibilité et la bonne humeur que vous m'avez apportée.

A l'équipe du Centre de référence des manifestations odontologiques des maladies rares et l'odontologie Pédiatrique : Vanessa, Marzena, Sébastien, Virginie, Elodie, Pr. Manière, François, Sophie J, Coralie, Claudia, Claudine, Céline... Merci pour votre soutien et votre collaboration depuis toutes ces années.

Aux patients, à leurs familles et au Projet INTERREG IV/Offensive Sciences A27 « Manifestations bucco-dentaires des maladies rares » sans qui rien n'aurait été possible.

A l'équipe du "libéral" : JFG, Lucile, Sylvie, Anh, Maxime et Marie. Merci pour votre écoute attentive et félicitations pour votre patience avec moi au quotidien ! Vous me faites voir la vie mieux qu'en "rose" : en "orange" !!

Aux amis et "collègues-amis" : Sophie J, François, Catherine, j'ai essayé de suivre votre exemple, en marchant dans vos pas ! Anne M, Aymeric, Prune, Romain, Catherine, Thomas, Emilie, Stéphanie, Delphine W, merci pour les séances de "remotivation" autour des cafés du Mess des internes ! Manu, Benji, Julie, Cédric, Noëlle, Benoit Le, Céline, Mathieu merci pour les moments "détente" et "recharge de batterie" lors des week-ends et vacances. Aux musiciens d'Arcadie et de Hoenheim qui m'apportent une petite note de gaieté à chaque répétition. Anne J et Elise, grâce à qui le mardi est ma journée préférée !! Caro, j'avais tellement apprécié notre thèse d'exercice en binôme, que j'ai enchaîné... "thèse un jour, thèse toujours"! Les 2 Anaïs ("l'une" et "l'autre") : Anaïs M "desperate labwife" des débuts... et Anaïs F mon éternel soutien...

Enfin et surtout à ma famille : mes parents Bernadette et Fernand, mes frères, sœurs, "pièces rapportées" et leur "descendance" Alex, Dèdè, Kiko, Taz, Arthur et Augustin, ma "belle-famille" Gisèle et Benoît Lo. Vous avez toujours cru en moi et su me donner les moyens de réussir. Merci pour votre amour, votre confiance, votre soutien matériel et surtout moral depuis toutes ces années... Il va falloir me trouver un nouveau surnom pour remplacer celui de "l'éternelle étudiante" !!

Pour finir...toujours "le meilleur pour la fin" : **Anthony**, mon meilleur supporter, mon meilleur réconfort. Tu m'accompagnes depuis tout ce temps avec toujours autant d'amour, de respect, de bienveillance et de patience. En un seul mot : "merci".

TABLE DES MATIERES

Table des Matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	5
INTRODUCTION	10
CHAPITRE I : L' Amélogenèse.....	12
I. L'émail dentaire et l'améloblaste	13
A. Le développement dentaire	13
B. La formation de l' émail par les améloblastes.....	14
1. Le stade présécrétoire	16
2. Le stade sécrétoire.....	16
3. Le stade de maturation.....	17
II. Structure de l'émail	18
A. Structures primaires.....	19
1. Prismes d'émail.....	19
2. Email inter-prismatique	19
3. Cristaux d'hydroxyapatite	20
4. Gaine du prisme	20
B. Structures secondaires.....	20
1. Lignes ou stries de Retzius	21
2. Périlymaties.....	21
3. Bandes d'Hunter-Schreger	21
4. Lamelles et touffes de l'émail	22
5. Fuseaux de l'émail.....	22
CHAPITRE II : Amélogenèses imparfaites et gènes connus	23
I. Les anomalies de l'émail.....	24
II. Les Amélogenèses Imparfaites.....	24
A. Classification clinique	24

1.	La forme hypoplasique.....	25
2.	La forme hypominéralisée	25
3.	La forme hypomature	26
4.	Lien entre le type d'AI et la constitution de l'émail.....	26
B.	Bilan et diagnostic différentiel	26
C.	Le traitement.....	27
III.	Gènes connus impliqués dans les AI	29
A.	AI non-syndromiques hypoplasiques	29
1.	<i>AMELX, AMELY</i>	29
2.	<i>ENAM</i>	31
3.	<i>AMBN</i>	32
4.	<i>LAMB3</i>	32
5.	<i>LAMA3</i>	33
6.	<i>COL7A1</i>	33
7.	<i>COL17A1</i>	33
B.	AI non-syndromiques hypominéralisées.....	34
1.	<i>FAM83H</i>	34
2.	<i>C4orf26</i>	34
3.	<i>SLC24A4</i>	34
4.	<i>ITGB6</i>	35
C.	AI non-syndromiques hypomatures.....	35
1.	<i>MMP20</i>	35
2.	<i>KLK4</i>	36
3.	<i>WDR72</i>	36
4.	<i>STIM1</i>	36
5.	<i>TUFT1</i>	37
D.	AI syndromiques.....	37

1.	<i>DLX3</i>	37
2.	<i>FAM20A</i>	37
3.	<i>TP63</i>	38
4.	<i>CNNM4</i>	38
5.	<i>ROGDI</i>	39
6.	<i>LTBP3</i>	39
7.	<i>FAM20C</i>	40
8.	Autres syndromes	40
E.	Tableau récapitulatif	41
CHAPITRE III : Stratégies de recherche de nouveaux gènes.....		45
I.	Projet recherche	46
A.	Le registre D[4]/Phenodent.....	47
B.	Prélèvements biologiques	47
1.	Prélèvements salivaires	47
2.	Extraction d'ADN.....	48
3.	Quantification Qubit™	48
II.	Séquençage Sanger	49
A.	Notion de gène candidat	49
B.	Etapas du séquençage Sanger	49
1.	Séquence de référence	49
2.	Choix des amorces	50
3.	PCR (Polymérase Chain Reaction), mise au point.....	50
4.	Amplification.....	50
5.	L'électrophorèse	50
6.	Purification/suspension	51
7.	Lecture des séquences.....	51
C.	Validation, ségrégation familiale.....	51

D.	Prédiction	51
III.	Cartographie par zones homozygotie	51
A.	Les puces	52
B.	Cartographie résolutive.....	52
C.	Sélection des gènes candidats.....	54
D.	Séquençage et analyse des séquences des gènes candidats sélectionnés.....	54
IV.	Séquençage nouvelle génération (NGS).....	54
A.	Analyse par “whole exome sequencing” (WES).....	54
B.	Séquençage à haut débit ciblé	55
V.	Validation fonctionnelle	55
	RESULTATS-PUBLICATIONS.....	57
I.	A Novel Mutation in the <i>ROGDI</i> Gene in a Patient with Kohlschütter-Tönz Syndrome [119]	59
II.	Homozygous and compound heterozygous <i>MMP20</i> mutations in amelogenesis imperfecta [89] 67	
III.	Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive <i>FAM20A</i> mutations [110].....	74
IV.	Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive <i>FAM20A</i> mutations [111].....	81
V.	Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta [123].....	95
	DISCUSSION-PERSPECTIVES.....	114
	CONCLUSIONS	118
	ANNEXES.....	123
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133

INTRODUCTION

Les anomalies crânio-faciales et bucco-dentaires sont des manifestations phénotypiques des maladies rares et constituent un axe de recherche en génétique médicale.

Selon les définitions nationales, les maladies rares ont une prévalence de moins de 1/2000 et sont actuellement au nombre de 6000 à 8000. Ces maladies rares touchent près de 3 millions de personnes en France et 30 millions en Europe. 80% de ces affections ont une origine génétique et environ 900 ont des manifestations bucco-dentaires. Rapporté au nombre d'habitants, environ 300000 personnes présenteraient des maladies rares dans la Région Métropolitaine Trinationale du Rhin Supérieur (RMT), et 90000 en Alsace.

L'étude de ces altérations bucco-dentaires telles que les Amélogenèses Imparfaites (AI), groupe d'anomalies affectant la structure et l'apparence clinique de l'émail dentaire, permet d'améliorer la compréhension des mécanismes du développement et passe par l'identification de nouveaux gènes.

Ce travail de thèse est centré sur l'étude de familles informatives présentant des AI de type isolées ou syndromiques. Le projet repose sur différentes observations telles que le phénotype clinique des patients, l'analyse de l'arbre généalogique ou le mode de transmission supposé. En fonction de ces éléments, un protocole de recherche peut être mis en place avec différents outils d'analyse dans le but d'établir un génotype.

En effet, si certains gènes impliqués dans les AI sont déjà connus *AMEL*, *ENAM*, *AMBN*, *LAMB3*, *LAMA3*, *COL7A1*, *COL17A1*, *FAM83H*, *C4orf26*, *SLC24A4*, *ITGB6*, *MMP20*, *KLK4*, *WDR72*, *STIM1*, *TUFT1* pour les formes isolées ou *DLX3*, *FAM20A*, *TP63*, *CNNM4*, *ROGDI*, *FAM20C* pour les formes syndromiques, d'autres restent à découvrir et de nouvelles mutations peuvent être identifiées.

Ainsi pour certaines familles, à partir de l'observation du phénotype, des gènes connus peuvent être considérés comme candidats et un séquençage par technique de Sanger peut permettre de valider des mutations et la ségrégation familiale. Pour d'autres familles, l'analyse est plus complexe, et les stratégies de recherche vont reposer sur des techniques telles que la création d'outils de haut débit à visée diagnostique, l'utilisation de puces d'homozygotie ou encore l'analyse de résultats d'exomes.

Ces différentes approches ont pour objectif principal d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans les maladies crânio-faciales et bucco-dentaires. Ces données aident au diagnostic pour les patients et leur famille, permettent d'orienter, d'améliorer le conseil génétique et ont pour perspectives la prise en charge globale et le traitement des patients. Par ailleurs, dans le domaine de la recherche en génétique, ces informations supplémentaires pourront faire progresser la compréhension du rôle de ces protéines et gènes dans la pathophysiologie et la genèse de ces anomalies du développement.

CHAPITRE I :

L' Amélogénèse

I. L'émail dentaire et l'améloblaste

A. Le développement dentaire

Le développement dentaire débute tôt dans l'embryogenèse avec la formation de la lame dentaire dès la 6^{ème} semaine de gestation. Cette lame se forme grâce à des interactions épithélio-mésenchymateuses entre l'ectoderme oral et les cellules ecto-mésenchymateuses issues de la crête neurale céphalique (au niveau du maxillaire et de la mandibule, structures issues du 1^{er} arc branchial). Puis cette lame s'invagine et induit la formation de l'organe de l'émail en passant par différents stades : placode dentaire, bourgeon dentaire, capuchon dentaire et cloche dentaire, étape où les améloblastes se différencient [Fig.1 et 2].

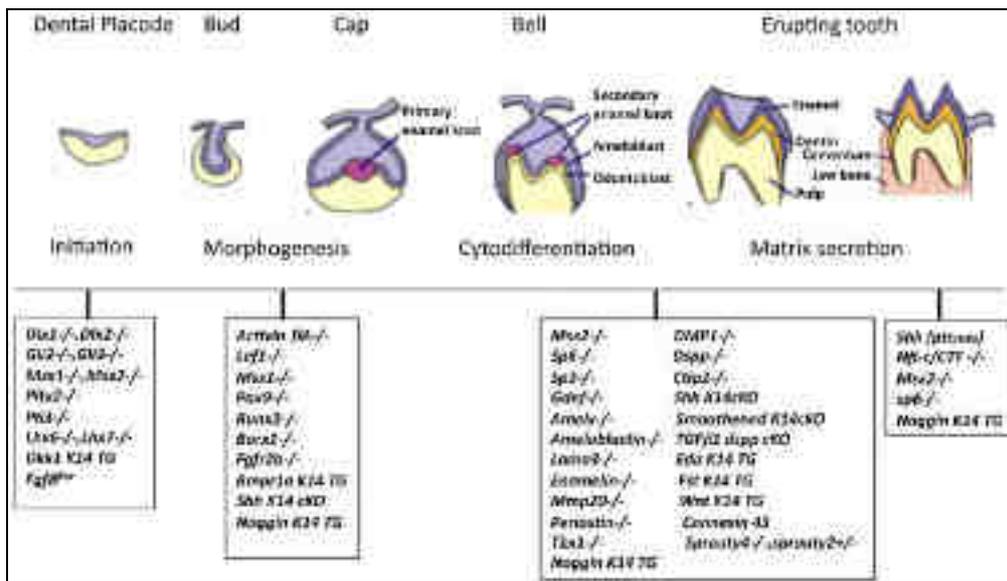


Figure 1 : Stades du développement dentaire : lame, placode, bourgeon, capuchon, et gènes associés à ces mécanismes de différenciation [1].

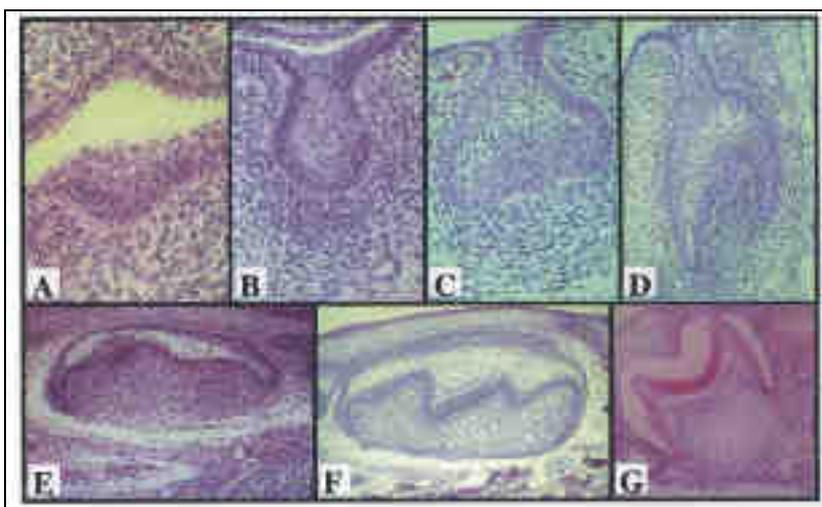


Figure 2 : Vues histologiques des stades du développement dentaire sur une molaire de modèle murin. A : initiation. B : bourgeon. C : capuchon. D-F : cloche. G : formation radiculaire [2].

L'amélogénèse et la dentinogénèse sont des processus de développement imbriqués. Les cellules mésenchymateuses faisant face à la membrane basale se différencient en odontoblastes qui sécrètent la matrice dentinaire servant d'échafaudage pour le dépôt des cristaux d'hydroxy-apatite. Les cellules épithéliales de l'épithélium dentaire interne se différencient en améloblastes qui sécrètent et résorbent les protéines de l'émail. La différenciation terminale des odontoblastes et des améloblastes se fait selon un gradient de différenciation temporo-spatial du sommet des cuspidés vers le collet, mais décalé dans le temps. Il faut, en effet, des odontoblastes différenciés et de la prédentine, pour initier la différenciation terminale des améloblastes. En prélude à cette différenciation il y a une disparition de la membrane basale (fragmentée, puis phagocytée par les améloblastes) [3]. Une première couche d'émail (aprismatique interne) est alors déposée au contact de la dentine. Cette première couche d'émail apparaît chez l'embryon humain au cours de la 14^{ème} semaine de développement au niveau des incisives maxillaires temporaires et vers la naissance pour les 1^{ères} molaires permanentes. Après l'histodifférenciation terminale des odontoblastes et améloblastes, la formation radiculaire débute et l'organe dentaire fait son éruption ([4] cité par [5]).

Tout au long de ce développement dentaire, les grandes voies de signalisation telles que les «Wingless» (Wnt), «fibroblasts growth factor» (Fgf), «bone morphogenetic proteins» (Bmp), «sonic hedgehog homolog» (Shh), «transforming growth factor» (Tgf), «nuclear factor-kappa B» (NF-κB) ou «tumor necrosis factor» (TNF) interviennent. L'expression de facteurs de transcription tels que les gènes à «homéoboucle divergents» et de molécules «signal» dans les centres de signalisation appelés «nœuds de l'émail» vont définir des territoires d'expression dans le maxillaire et la mandibule et guider l'odontogénèse [6, 7].

B. La formation de l' émail par les améloblastes

L'émail dentaire, structure acellulaire, avasculaire et non innervée, est le tissu le plus minéralisé et le plus dur de l'organisme. Il est constitué d'une phase minérale (96-98%) sous la forme d'un réseau cristallin d'hydroxyapatites $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ parfois substitué et d'une phase organique (2%) composée de protéines de structure, de lipides, de phospholipides, d'enzymes et d'eau. Cette matrice organique est présente de façon temporaire, afin de guider la mise en place du réseau cristallin.

Le processus d'amélogénèse est limité dans le temps : pour chaque dent, l'émail se forme durant une période donnée. Si une anomalie pouvant affecter la structure de ce tissu intervient durant ce temps, seules les dents dont la formation de l'émail est en cours seront atteintes (sites concomitants de minéralisation).

Ainsi, issu de l'ectoderme oral, puis de l'épithélium dentaire interne, l'organe de l'émail se forme et lors de la différenciation terminale, l'améloblaste est une cellule qui passe par plusieurs stades : le stade présécrétoire, sécrétoire, de maturation, de minéralisation, qui correspondent à la vie d'un améloblaste [Fig. 3]. Cet améloblaste sera successivement : présécréteur, sécréteur sans prolongement de Tomes, sécréteur avec prolongement de Tomes, de maturation et de protection [Fig. 4] [1, 8].

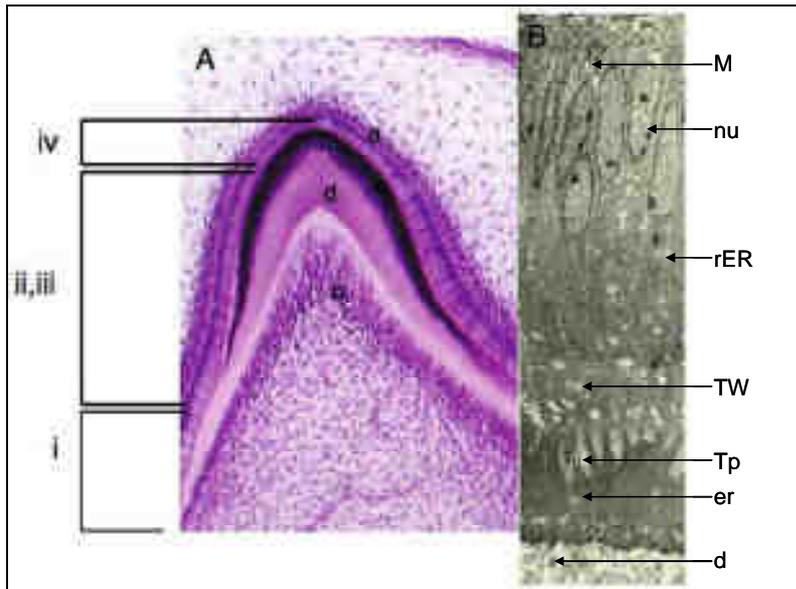


Figure 3 : Cycle de vie de l'améloblaste. (A) coloration à l'hématoxyline et éosine d'une incisive, montrant le cycle de vie des améloblastes. (i) stade pré-sécrétoire ; (ii) et (iii) : stade sécrétoire (sans prolongement de Tomes) et améloblastes sécrétoires (avec prolongement de Tomes sécrétant l'émail ; (iv) stade de maturation. a : améloblaste ; o : odontoblastes ; e : matrice amélaire ; d : dentine. (B) : microscopie électronique à transmission des améloblastes au stade sécrétoire. La cellule est caractérisée par un large réticulum endoplasmique rugueux, un appareil de Golgi localisé au centre du cytoplasme, des granules sécrétoires qui migrent en direction distale de la cellule. Après la première couche d'émail sécrétée, les améloblastes migrent en direction proximale et le prolongement de Tomes se développe. La bordure de l'améloblaste est marquée par la présence d'un complexe de jonction. M : mitochondrie ; nu : noyau ; rER :reticulum Endoplasmique Rugueux ; TW : Terminal Web ; Tp : prolongement de Tomes ; er : prisme de l'émail ; d : dentine [8].

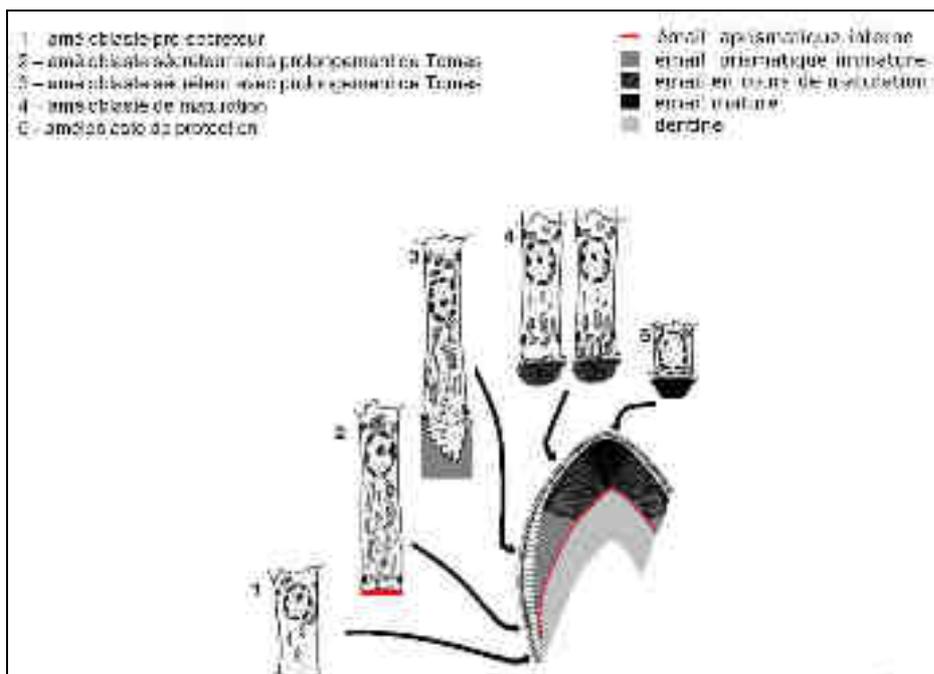


Figure 4 : Schéma des différents stades de l'améloblaste [9].

1. Le stade présécrétoire

Lors du stade présécrétoire, des cellules sortent du cycle cellulaire et deviennent des pré-améloblastes qui se différencient ensuite en améloblastes pré-sécréteurs. Le pré-améloblaste s'allonge, son noyau et ses mitochondries migrent vers le stratum intermedium. La cellule se polarise, puis la membrane basale qui sépare les pré-améloblastes des pré-odontoblastes disparaît, au profit d'un manteau dentinaire [10].

2. Le stade sécrétoire

Le stade sécrétoire est caractérisé par la cytodifférenciation des améloblastes pré-sécréteurs en améloblastes sécréteurs sans prolongement de Tomes [Fig. 5 et 6]. Lors de cette étape les protéines de l'émail : amélogénine, énaméline, améloblastine, tuftéline sont sécrétées et les premiers cristaux d'hydroxyapatite se forment. Cette première couche de matrice de l'émail, déposée directement au contact du manteau dentinaire, est appelée émail aprismatique interne. Et la zone de cohésion entre les deux structures est assurée par la jonction émail-dentine.

Par la suite, le prolongement de Tomes va se former. Au niveau de ce prolongement, une matrice organique est sécrétée pour l'élaboration de la substance interprismatique (par libération des granules de sécrétions contenant les protéines de l'émail) et chaque améloblaste donne naissance à un prisme d'émail.

Les prolongements de Tomes sont des structures présentant plusieurs parties, riches en éléments du cytosquelette pour orienter les vésicules de sécrétion. La partie proximale responsable des sécrétions et réabsorptions, un centre contenant les granules et la partie apicale (distale) qui devient de manière cyclique d'une forme triangulaire à une forme effilée, comprimant l'émail intraprimatique en formation et créant des résidus membranaires riches en cholestérol, pris au piège dans cet émail prismatique. Ces reliquats lipidiques, pourraient, après dégradation, contribuer aux processus de minéralisation.

La matrice amélaire organique est composée de protéines non-collagéniques comme les protéines de l'émail (amélogénine, énaméline, améloblastine, produites au niveau du réticulum endoplasmique rugueux), des enzymes (MMP20, KLK4) et sert d'échafaudage pour contrôler l'organisation des cristallites (ions calcium, phosphates, cristaux d'hydroxyapatite) de la phase minérale [11]. Cette matrice est alors partiellement minéralisée par une enzyme : la phosphatase alcaline.

A ce stade, l'émail prismatique est immature, composé de 37 % de minéral, 19 % de substance organique et 44 % d'eau. Avant la maturation, la majorité des protéines extracellulaires de la matrice sont dégradées par des protéases. La matrice amélaire organique post-éruptive ne constitue plus que 1% de l'émail, contient des fragments protéolysés et les protéines insolubles. La composition moléculaire de cette couche de matrice amélaire organique reste difficile à définir et à étudier du fait de l'insolubilité et de la résistance à la dissolution [12]. Un quart des améloblastes disparaît par apoptose et les cellules restantes se réduisent en taille et synthétisent une nouvelle membrane basale au contact de l'émail immature [9].

3. Le stade de maturation

Ce stade correspond à la croissance des cristaux d'émail (en épaisseur et en largeur) par dégradation des protéines de la matrice via les protéases telles que MMP20 ou KLK4. Le processus de modulation consiste en la transformation des pôles distaux des améloblastes restants : bordure plissée ou lisse pour permettre la régulation du pH, l'élimination des fragments protéiques de l'amélogénine et le transport des ions calcium et phosphate nécessaire à la croissance des cristaux. L'améloblaste est à l'état plissé 80% de son temps et 20% à l'état lisse, l'alternance ou « modulation » se faisant 5 à 7 fois.

Cet améloblaste plissé a une activité d'endocytose très élevée et contient un nombre très important de lysosomes, de protéines de liaison au calcium, et d'adénosines triphosphatases (ATPases) membranaires associées au calcium, qui entraînent le pompage des ions calcium durant la phase de maturation. L'améloblaste lisse quant à lui, a une activité d'endocytose faible, ne possède quasiment pas d'ATPases membranaires et une fuite des petites protéines et autres molécules est observée.

Lorsque la cellule possède un aspect lisse, des ions calciums diffusent à travers la membrane de l'améloblaste en direction de l'émail. Lorsque la cellule est plissée, le niveau de calcium est le plus élevé. Ainsi, on observe une expansion du cristal de l'émail, associé à une diminution du pH et des échanges ioniques importants.

Durant ces phases de sécrétions et de réabsorptions, l'incorporation des ions dans le cristal de l'émail est en rapport avec l'état plissé des bordures. Cependant la résorption active des protéines intactes de la matrice organique de l'émail par les améloblastes n'est pas le mécanisme principal observé durant la phase de maturation. En effet, des enzymes de dégradation agissent dans le compartiment extracellulaire pour digérer les protéines matricielles en des fragments plus petits qui peuvent quitter la couche amélaire. Les fragments polypeptidiques quittant l'émail passent par les jonctions lâches du pôle distal des améloblastes lisses et diffusent latéralement, pour être réabsorbées sur la surface basolatérale. Quand la cellule devient plissée, car le complexe de jonction proximal est à son tour lâche, certains peptides diffusés latéralement pourraient se disperser à travers la couche papillaire et peut-être au-delà. Certains fragments protéiques de la couche amélaire sont réabsorbés par endocytose grâce aux invaginations membranaires de la bordure plissée [10].

La notion de balance entre l'acidification et la neutralisation du pH semble essentielle. En effet, pour MMP20 et KLK4, les conditions optimales sont celles d'un milieu légèrement acide. L'améloblaste à bordure plissée sécrète une quantité importante d'anhydrase carbonique de type II qui libère des protons, acidifiant ainsi le milieu extracellulaire. Les protéases vont alors agir notamment en fragmentant les amélogénines. Puis le pH de la matrice est neutralisé par sécrétion d'ions bicarbonates des améloblastes plissés et passage de fluides interstitiels vers l'émail depuis les améloblastes lisses [8].

Ainsi, du côté de la matrice organique de l'émail, sécrétée pendant le stade de formation, la majorité de la structure est dégradée enzymatiquement et éliminée au cours du stade de maturation pour permettre la croissance en épaisseur et largeur des cristallites. Les améloblastes vont remplacer cette phase organique par une phase minérale afin d'obtenir l'émail, tissu le plus minéralisé de l'organisme.

Ces améloblastes deviennent améloblastes de protection, de forme cubique avec une adhésion à la membrane basale par des hémidesmosomes [13]. Ces cellules vont constituer la couche papillaire, l'épithélium réduit de l'émail dont le rôle est de protéger l'émail du follicule dentaire jusqu'à l'éruption de la dent.

Notons l'importance des systèmes d'attache (desmosomes, hémidesmosomes) de la cellule à sa matrice et à l'émail formé au cours de la différenciation. En effet, une modification de ces systèmes aura une implication en pathologie, comme par exemple dans l'épidermolyse bulleuse (cf. chapitre gènes connus : *LAMA3*, *LAMB3*, *COL7A1*, *COL17A1*).

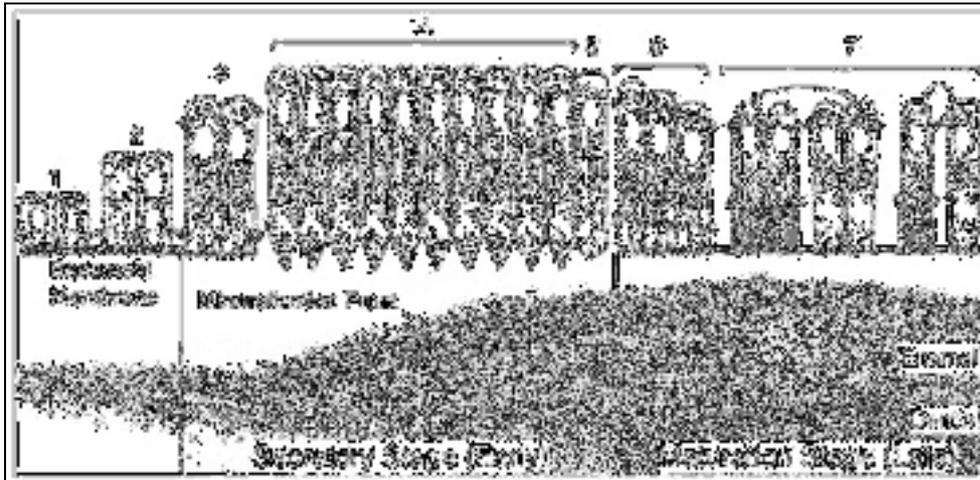


Figure 5 : Etapes de la formation amélaire. La partie supérieure de la figure représente les cellules épithéliales (Améloblastes) au cours du développement de la dent. L'émail est progressivement sécrété (early stage), puis les améloblastes sécrètent les protéines de minéralisation (astérisques), les prismes de l'émail s'allongent et l'étape tardive (late stage) est l'étape de maturation [14].

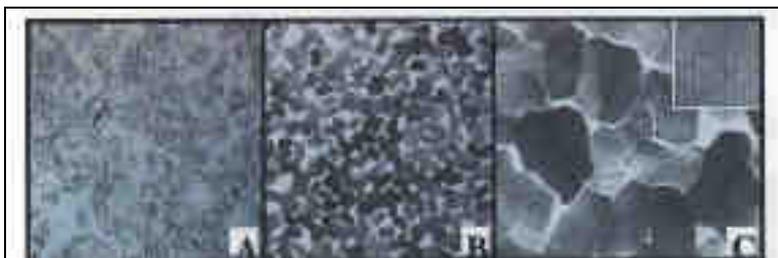


Figure 6 : Section en coupe de cristal de l'émail (A) : stade sécrétoire (x 160,000), (B) stade de maturation (x 160,000), (C) stade éruptif (x 780,000). Les cristaux de l'émail s'allongent durant la phase sécrétoire et grandissent en largeur et en épaisseur pendant la maturation. Comme les cristaux cherchent le contact avec les cristaux adjacents, leur espacement détermine l'épaisseur finale [2].

II. Structure de l'émail

L'émail est constitué de trois couches toutes constituée par les cristaux d'hydroxyapatites qui ont la même orientation, il y a donc une continuité de structure entre ces éléments :

- La couche aprismatique : en contact avec la jonction amélo-dentinaire, elle correspond à la première couche d'émail synthétisée par les améloblastes sans prolongement de Tomes (environ 10 μm).

- La couche prismatique : constituée par les prismes de l'émail, l'émail inter-prismatique et la gaine du prisme.
- La couche aprismatique de surface : qui correspond à la dernière couche d'émail synthétisée après l'involution des prolongements de Tomes. Elle disparaît suite à l'usure physiologique de la dent au niveau occlusal, mais persiste en général au niveau cervical (environ 30 μm) [15].

Au niveau microscopique, des structures primaires et secondaires peuvent être observées. Parmi les structures primaires, on distingue le prisme de l'émail, l'émail inter-prismatique, les cristaux d'hydroxyapatite et la gaine du prisme. Les structures secondaires sont représentées par les stries de Retzius, les périkymaties, les bandes d'Hunter-Schreger, les lamelles et touffes de l'émail ainsi que les fuseaux de l'émail.

A. Structures primaires

1. Prismes d'émail

Les prismes d'émail correspondent chacun à une cellule (leur diamètre est d'environ 5 μm) sont constitués de milliers de cristaux d'hydroxyapatite et de matière organique [Fig. 7]. Ils sont parallèles entre eux et perpendiculaires à la jonction émail-dentine (JED) sur les coupes longitudinales. Classiquement, ces microstructures sont décrites comme des « trous de serrure » ou « arcades » en coupe transversale [Fig. 8 et 9].

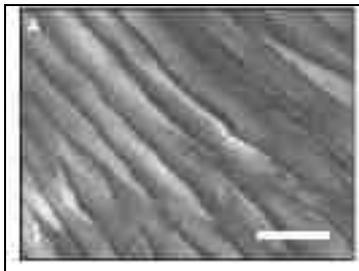


Figure 7 : imagerie en coupe (100 μm) par microscopie électronique à balayage. Cristaux d'hydroxyapatites en prismes réguliers [16].

2. Email inter-prismatique

L'émail inter-prismatique borde chaque prisme en coupe longitudinale. Il a une composition proche de l'émail prismatique, mais est légèrement plus chargé en eau. La distinction s'effectue également en fonction de l'orientation des cristaux d'hydroxyapatite (angle de 60° entre l'émail inter-prismatique et les prismes).

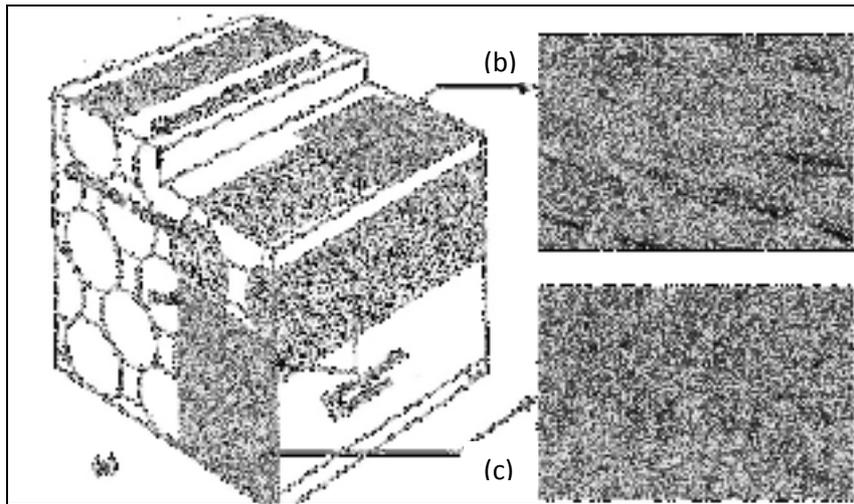


Figure 8 : Représentation schématique de l'émail prismatique et interprismatique (a) et coupes longitudinale (b) et transversale (c) de l'émail prismatique et interprismatique visible en microscopie électronique à balayage. R (rod) : prisme ; IR (interrod) : émail interprismatique [17].

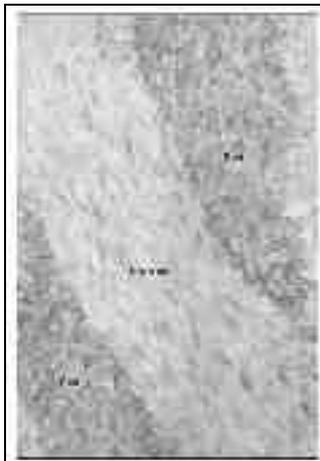


Figure 9 : Email prismatique (Rod) et interprismatique (Interrod) au microscope électronique [10].

3. Cristaux d'hydroxyapatite

Les cristaux d'hydroxyapatite sont des nanostructures de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, de forme hexagonale, et de dimension moyenne 60×20 nm avec 100 nm de diamètre. L'ion OH^- peut être remplacé par le fluor (F) dans la fluoroapatite, augmentant ainsi la résistance du cristal aux attaques acides (et à la déminéralisation).

4. Gaine du prisme

La gaine, composée d'éléments organiques, est située à l'interface entre prisme et interprisme. C'est une fine bordure (1000 \AA) qui permet les échanges physico-chimiques avec le milieu buccal.

B. Structures secondaires

La complexité des structures de l'émail et son degré de minéralisation vont déterminer la dureté de l'émail et sa résilience aux chocs et forces de mastication.

1. Lignes ou stries de Retzius

Les stries de Retzius sont des lignes brunâtres visibles sur les coupes en microscopie, qui correspondent à un ralentissement périodique et temporaire de la formation de l'émail. Ces stries de Retzius sont les plus proéminentes des lignes transversales qui reflètent le rythme circadien de l'activité des améloblastes. Un intervalle de répétition est discernable entre chaque strie de Retzius. Cet espace est identique pour toutes les dents d'un individu, mais variable entre et au sein d'une espèce. Grâce à ces mesures, on peut déterminer le temps passé entre les stries (7 à 11 jours chez l'homme) et quantité d'émail synthétisée (environ 4µm/jour chez l'homme).

2. Périkymaties

Les périkymaties correspondent à l'abouchement des stries de Retzius en coupe longitudinale. Elles forment des sillons parallèles au collet de la dent espacés plus ou moins régulièrement de 60 à 120 µm. Absentes au niveau des cuspidés, leur nombre augmente en direction cervicale [Fig. 10].

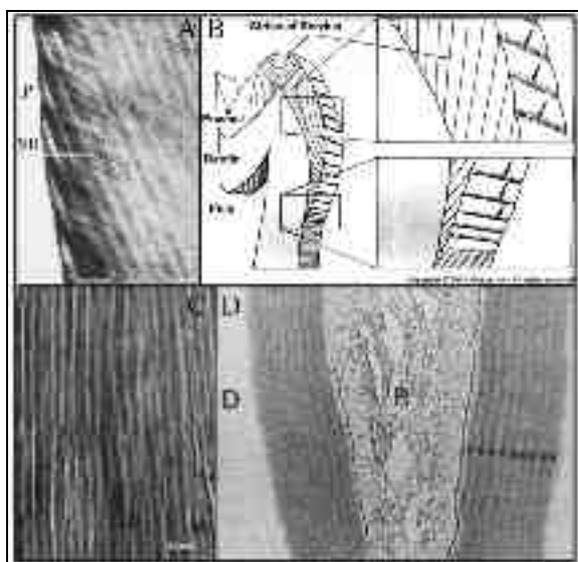


Figure 10 : Structures secondaires : (A) Section d'émail montrant que les périkymaties (P) sont des manifestations de surface des stries de Retzius (SR). (B) Strie de Retzius d'une molaire. La strie de Retzius se constitue sur une longue période (6 à 11 jours) et s'étend de la jonction amélo-dentinaire à la surface amélaire. Il n'y a pas de périkymaties au niveau des pointes cuspidiennes, car les stries de Retzius se dirigent en formant un arc elliptique de la jonction amélo-dentinaire d'un côté de la cuspide à l'autre sans atteindre la surface. (C) Section de dentine montrant une courte période de lignes de croissance (von Ebner's lines : courbes périodiquement répétées en forme de « V » inversé). (D) Radiographie d'une section de dentine de rat montrant 9 bandes circulaires (après injection de proline durant 10 jours) suggérant les fluctuations quotidiennes de sécrétion collagénique [6].

3. Bandes d'Hunter-Schreger

Les bandes d'Hunter-Schreger sont constituées par des regroupements de prismes d'émail [Fig. 11]. Les groupes sont qualifiés par les termes « diazonie » lorsque les prismes sont sectionnés transversalement ou « parazonie » lorsque les prismes sont sectionnés longitudinalement et sont organisés en double hélice autour du noyau interne de dentine. Cette architecture est en rapport direct avec les mouvements des améloblastes lors de l'amélogénèse.



Figure 11 : Bandes d'Hunter-Schreger [18].

4. Lamelles et touffes de l'émail

Les lamelles de l'émail sont des structures secondaires de l'émail, fines et longitudinales, elles sont essentiellement organiques et correspondent à des microfissures post-traumatiques.

Les touffes de l'émail quant à elles sont des enchevêtrements de prismes ou des accumulations de matériel organique « tuft protein » [Fig. 12].



Figure 12 : Touffes de l'émail, dent sèche X200 [19].

5. Fuseaux de l'émail

Les prolongements cytoplasmiques des odontoblastes renfermés au cours de l'amélogénèse sont appelés fuseaux de l'émail [15].

Il existe deux niveaux de croisement de ces fuseaux : les bandes d'Hunter-Schreger et la divergence d'orientation des cristaux d'hydroxyapatites entre les prismes d'émail et l'émail interprismatique. Grâce à ce maillage, l'émail est plus résistant aux contraintes ([4] cité par [20]).

CHAPITRE II :

Amélogenèses imparfaites et gènes connus

I. Les anomalies de l'émail

Les anomalies de l'émail visibles lors de l'éruption de la dent sont des anomalies de structure qui peuvent être d'origine génétique ou acquise et existent avant la mise en place de la dent sur l'arcade. L'examen clinique et radiographique est primordial afin de diagnostiquer ces anomalies, de les caractériser et de rechercher leurs étiologies.

Aussi, dans le cadre d'une anomalie isolée (atteinte d'une dent), l'étiologie est la plupart du temps locale ou traumatique (séquelles de traumatismes ou infection d'une dent temporaire par exemple).

Lors de l'atteinte d'un groupe de dents, si la période de minéralisation est identique, il faut rechercher la toxicité environnementale ou systémique (exposition chimique, antibiotique, tétracyclines, fluorose, carence, MIH) [21].

Enfin l'atteinte de toutes les dents et des deux dentures est le signe d'une étiologie génétique. Ces défauts se retrouvent dans les amélogenèses imparfaites [Fig. 13].

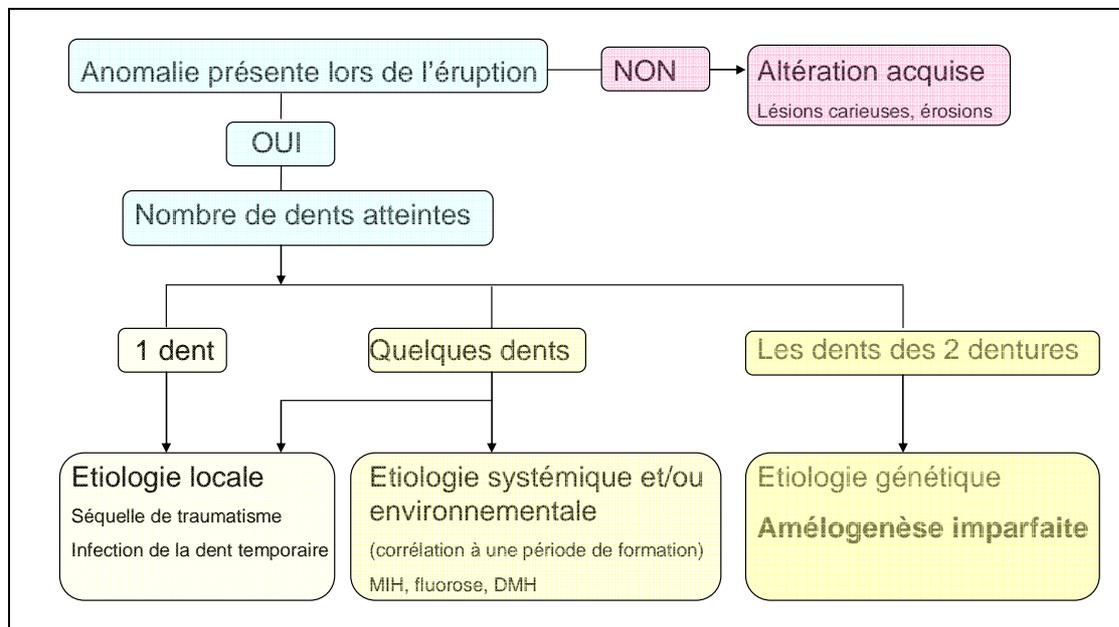


Figure 13 : Diagnostic des anomalies de l'émail (schéma adapté à partir de [22]).

II. Les Amélogenèses Imparfaites

Les amélogenèses imparfaites sont un groupe hétérogène d'altérations de l'émail dentaire d'origine génétique. Ces maladies affectent le processus d'odontogenèse et conduisent à la modification de la structure et de l'apparence clinique de l'émail [23]. De nombreuses classifications ont été proposées et le plus souvent elles reposent sur la forme clinique [24, 25].

A. Classification clinique

L'amélogenèse imparfaite peut exister de manière isolée ou être associée à d'autres symptômes dans le cadre de syndromes. Sa prévalence varie de 1/700 à 1/14000 selon les études et plusieurs modes de transmission ont été décrits : autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X

Les amélogénèses imparfaites sont classées en trois grandes catégories selon le type de défaut amélaire: hypoplasique, hypominéralisée ou hypomature, cependant plusieurs formes peuvent exister chez le même patient, voire sur la même dent [26]. Cliniquement, une dyschromie, une hypersensibilité et des pertes de substance sont observées. Par ailleurs, un taurodontisme [27], une béance antérieure, des anomalies gingivales, d'éruption et de résorption peuvent s'ajouter au tableau clinique. Cette affection est une maladie rare et complexe, à l'origine de problèmes sociaux, esthétiques, fonctionnels, d'inconfort, et dont le diagnostic n'est pas toujours aisé [28].

1. La forme hypoplasique

La forme hypoplasique représente d'un défaut quantitatif. Elle se manifeste par une faible épaisseur, voire une absence d'émail et la présence de puits ou de stries. L'émail est néanmoins dur, translucide et parfois d'aspect rugueux ou piqueté. Il n'est pas prédisposé à l'usure [Fig. 14].



Figure 14 : Amélogénèses Imparfaites de type hypoplasique en denture temporaire (photographie de droite) et en denture permanente (photographie de gauche). Photographies du Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg), Pr. Bloch-Zupan.

2. La forme hypominéralisée

La forme hypominéralisée est un défaut qualitatif. L'émail est d'épaisseur normale, mou et non résistant au sondage, de couleur jaune brun intrinsèque et se clive rapidement [Fig. 15]. Radiographiquement, il n'existe pas de différence de radio-opacité émail-dentine.



Figure 15 : Amélogénèse Imparfaites de type hypominéralisée. Photographies du Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg), Pr. Bloch-Zupan.

3. La forme hypomature

La forme hypomature est un défaut qualitatif. L'émail est d'épaisseur normale, relativement dur, avec pas ou peu de contraste avec la dentine et présente des colorations allant du blanc crayeux au jaune brun [Fig. 16].



Figure 16 : Amélogénèse Imparfaite de type hypomature. Photographies du Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg), Pr. Bloch-Zupan.

4. Lien entre le type d'AI et la constitution de l'émail

Les différents types d'AI sont en corrélation les phases de l'amélogénèse. L'expression des gènes selon une certaine chronologie aux différentes étapes du développement et l'intervention des différentes protéines expliquent ces formes d'AI si différentes [29].

Ainsi la forme hypoplasique est plutôt en lien avec les protéines matricielles (AMEL, ENAM, AMBN), alors que la forme hypomature illustre les anomalies de fonction des protéases (MMP20, KLK4) [20]. Enfin la forme hypominéralisée pourrait être en lien avec des éléments du métabolisme phosphocalcique [30].

B. Bilan et diagnostic différentiel

Dans le cadre du diagnostic d'Amélogénèse imparfaite, le bilan clinique et radiographique va permettre de détailler le phénotype [Fig. 17]. La pathologie étant d'origine génétique, un examen des apparentés se révèle très utile (parents, fratrie...). Ce bilan permet d'établir un arbre généalogique pour préciser le mode de transmission.

Par ailleurs le diagnostic différentiel se fait avec le MIH (Molar Incisor Hypominéralisation), la fluorose, les séquelles de traumatismes, la dentinogenèse imparfaite...etc

Lors de ce bilan, différents signes sont à rechercher afin de déterminer si l'AI est syndromique ou isolée. Un examen des phanères, des reins, des vertèbres, de l'œil ou des antécédents d'épilepsie peuvent orienter ce diagnostic. De plus l'interaction avec l'équipe médicale : le généticien, le pédiatrique, est indispensable pour une bonne prise en charge du patient et pour inscrire les observations phénotypiques dans le dossier médical du patient [31].

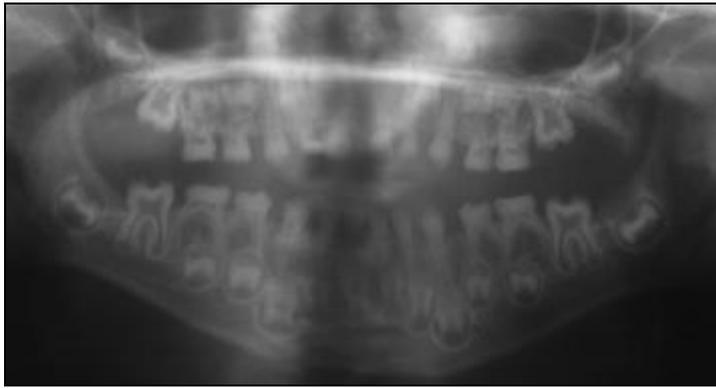


Figure 17 : Radiographie panoramique d'un enfant de 5 ans, pris en charge au Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg). Le cliché montre une absence de contraste émail-dentine, l'émail est absent aussi bien sur les dents temporaires que permanentes, le taurodontisme des molaires est également caractéristique de certaines formes d'AI.

C. Le traitement

Le bilan permet de mettre en œuvre des traitements selon un gradient thérapeutique en fonction de la gravité de l'AI et favorise toujours la conservation tissulaire. Le traitement est scindé en 2 phases : provisoire en denture temporaire et durant la croissance, puis prothèses d'usage en denture permanente [32, 33].

Selon le degré d'atteinte tissulaire, le niveau de malocclusion et la croissance, différentes solutions thérapeutiques peuvent être envisagées, intégrant le recours à des solutions esthétiques (recouvrement des surfaces dentaires à l'aide de composites, couronnes provisoires en composite de laboratoire durant les phases de croissance, couronnes céramo-céramiques...) et fonctionnelles. Dans tous les cas le suivi régulier est indispensable afin de garantir la pérennité des restaurations [34].

Traitements proposés :

- Enseignement à l'hygiène bucco-dentaire (EHBD) : l'émail étant plus susceptible à la carie dentaire, une bonne hygiène est indispensable pour limiter l'inflammation gingivale.
- La fluoruration : cette technique de prévention permet une reminéralisation de l'émail et donc une diminution de l'hypersensibilité
- La micro-abrasion, l'air-abrasion, la sono-abrasion peuvent être employés pour réduire certaines colorations, tout comme les techniques d'éclaircissement [35]
- L'infiltration résineuse, les scellements prophylactiques, la mise en place de CVI (ciment verre-ionomère), de composites font partie des gestes conservateurs réalisables afin de protéger les surfaces dentaires [2]
- Enfin des coiffes pédodontiques (métallique préformée CPP ou Zircone) [33], inlay-onlay, facettes, couronnes céramo-métalliques peuvent être proposées [Fig. 18 et 19].

La prise en charge bucco-dentaire est multidisciplinaire et fait intervenir les spécialités d'odontologie pédiatrique, d'orthopédie dento-faciale, parfois la chirurgie maxillo-faciale, l'oto-rhino-laryngologie, surtout pour les cas complexes avec une béance antérieure importante [36, 37].

Souvent le chirurgien-dentiste spécialiste en odontologie pédiatrique va avoir recours à des techniques de sédation consciente ou à l'anesthésie générale, car les enfants traités sont jeunes, les hypersensibilités rendent les anesthésies locales parfois difficiles et le nombre de dents à soigner rend les séances de soin longues [38].

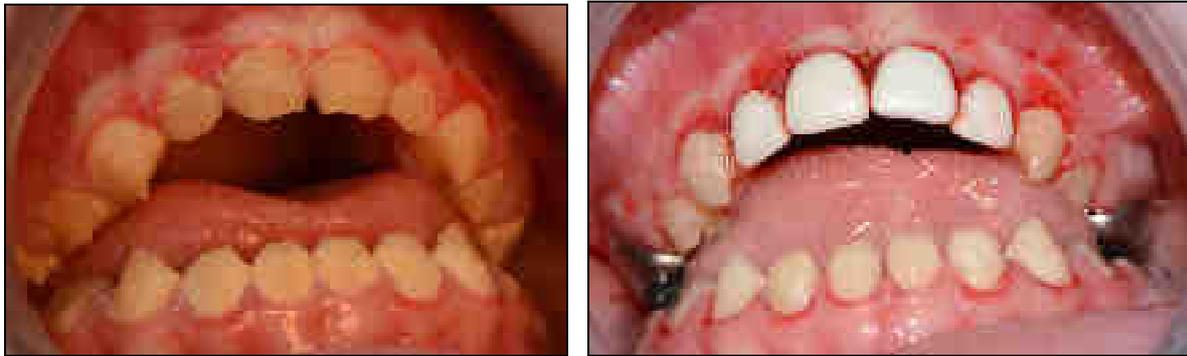


Figure 18 : Patiente âgée de 5 ans, suivie au Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) présentant une amélogenèse imparfaite hypoplasique isolée, associée à une béance antérieure aggravée par la succion digitale. Traitement par coiffes en zircone (NuSmile®) sur les incisives maxillaires, coiffes pédodontiques préformées (CPP) sur les 2^{èmes} molaires temporaires et composites de recouvrement (soins réalisés sous anesthésie générale avec Prune Sadonès, interne en médecine bucco-dentaire).



Figure 19 : Patiente âgée de 13 ans, suivie au Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) présentant un syndrome de Jalili (mutation du gène CNNM4 c.586T>C ; Ser196Pro). Traitement par coiffes métalliques préformées sur les molaires permanentes maxillaires (soins réalisés sous MEOPA).

III. Gènes connus impliqués dans les AI

Plusieurs gènes impliqués dans les AI ont été identifiés. Il s'agit, par exemple, de gènes codant pour des protéines de structure de l'émail (AMELX, ENAM) mais aussi pour des enzymes résorbant la matrice protéique (MMP20, KLK4) en prélude à une minéralisation optimale ; des facteurs de transcription (DLX3) et des protéines impliquées dans le métabolisme phosphocalcique.

Ces différents gènes sont présentés ci-après pour les AI isolées ou syndromiques et classés selon le type clinique d'AI : hypoplasique, puis hypominéralisée et enfin hypomature. Cependant la classification n'est pas toujours évidente, car pour certains gènes plusieurs types d'AI peuvent exister et la frontière entre AI syndromique et non syndromique est parfois floue [28].

Signalons qu'il existe un cluster (ensemble de gènes qui codent pour le même produit) de gènes de l'émail situé au niveau du chromosome 4 en position 4q21. Ainsi, les gènes *ENAM* et *AMBN* sont localisés dans cette région. L'hypothèse émise est celle d'un ancêtre commun entre le cluster de la dentine et celui de l'émail par une duplication de *SPARC* [39, 40].

A. AI non-syndromiques hypoplasiques

1. AMELX, AMELY

Le gène *AMELX* (OMIM 300391) (*AMELOGENIN, ALGN, AMG, AMGL, AIH1*), composé de 7 exons, est situé sur le chromosome X, en position Xp22.2, et code pour l'amélogénine, une protéine très conservée au cours de l'évolution, sécrétée par les améloblastes et qui constitue 90% de la matrice organique de l'émail [41].

Les amélogénines forment une famille de protéines riches en proline, en glutamine, en leucine et histidine. Elles sont phosphorylées, mais non glycosylées, très hydrophobes et relativement basiques. Leur poids moléculaire varie de 5 à 25 kDa en raison d'un épissage alternatif des messagers et de protéolyse extracellulaire. Ces protéines s'auto-assemblent pour former des agrégats sphériques appelés nanosphères d'amélogénine. Ces nanosphères ont une forte affinité pour l'hydroxyapatite et vont contrôler l'orientation des cristaux en s'intercalant entre 2 cristaux d'émail et en empêchant ainsi les interactions électrostatiques.

AMELX est inclus dans l'intron 1 de *ARHGAP6* (dans l'orientation opposée), un gène qui intervient dans la polymérisation de l'actine.

Comme son nom l'indique, le mode de transmission de *AMELX* est lié à l'X. Chez la femme, il y aura donc un phénomène de lyonisation (inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X). Chez l'homme, le gène *AMELY* (OMIM 410000) (*AMELOGENIN, Y-CHROMOSOMAL*), au locus Yp11.2 code pour seulement 10% de l'amélogénine [42]. Ainsi, le phénotype clinique chez l'homme sera plus sévère que chez la femme, car la quantité d'amélogénine ne pourra pas être compensée. Notons qu'à ce jour, aucun cas d'AI en rapport avec une forme liée à l'Y n'a été rapporté.

En cas de mutation d'*AMEL*, les formes AI hypoplasique, hypomature ou les deux associées sont observées en denture temporaire comme permanente. Le plus souvent, chez la femme, des colorations, rainures ou bandes verticales hypoplasiques sont présentes, ce qui correspond au patron d'expression de l'allèle normal et muté.

Une AI avec des "snow capped teeth" ou spots blanchâtres, crayeux peut également être observée[43-46].

C'est en 1991 que l'équipe de Lagerstrom a mis en évidence la 1^{ère} délétion de 5kb de l'amélogénine chez des hommes présentant une AI hypoplasique [47]. Depuis, de nombreuses mutations ont été identifiés [43, 48, 49][Fig. 20].

Accession NCBI	Accession	Structure	Waltz génotype	Références
g:118770-1	c:118770-1	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-2	c:118770-2	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-3	c:118770-3	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-4	c:118770-4	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-5	c:118770-5	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-6	c:118770-6	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-7	c:118770-7	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-8	c:118770-8	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-9	c:118770-9	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-10	c:118770-10	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-11	c:118770-11	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-12	c:118770-12	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-13	c:118770-13	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-14	c:118770-14	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-15	c:118770-15	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-16	c:118770-16	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-17	c:118770-17	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-18	c:118770-18	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-19	c:118770-19	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)
g:118770-20	c:118770-20	g:118770	Amélogénine hypoplasique (Amélogénine)	Amélogénine (1991)

Figure 20 : Table répertoriant différentes mutations d'AMELX [49] avec les références [44, 45, 47, 50-52].

En 2009, Hobson *et al.* ont décrit une large délétion du chromosome X, responsable d'une microphthalmie avec stries linéaires cutanées (MLS) associée à une amélogénèse imparfaite. En effet, les délétions Xpter peuvent emporter les gènes *HCCS* (impliqué dans MLS) et *AMELX* (impliqué dans AI) [Fig. 21]. Le gène *SHOX* (Short Stature Homeobox) peut également être inclus dans cette zone délétée et être à l'origine d'une petite taille [53].



Figure 21 : Patiente âgée de 8 ans, présentant un syndrome MLS, un retard de croissance et une amélogénèse imparfaite. A l'examen intra-buccal, des rainures et stries verticales de l'émail sont observables. L'analyse génétique met en évidence une délétion Xpter Xp22.33p22.2 d'une taille de 12.599.808pb (de la position génomique 125.958 à 12.725.766) incluant, entre-autres les gènes *AMELX*, *HCCS* et *SHOX*. Photographies du Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg), Pr. Bloch-Zupan.

Afin de mieux définir l'implication des mutations sur un phénotype clinique, il existe des logiciels de prédiction qui référencent les interactions potentielles entre les protéines. Ainsi, pour AMELX, des liens directs sont référencés avec ENAM, AMTN, MMP20 par exemple [Fig. 22].

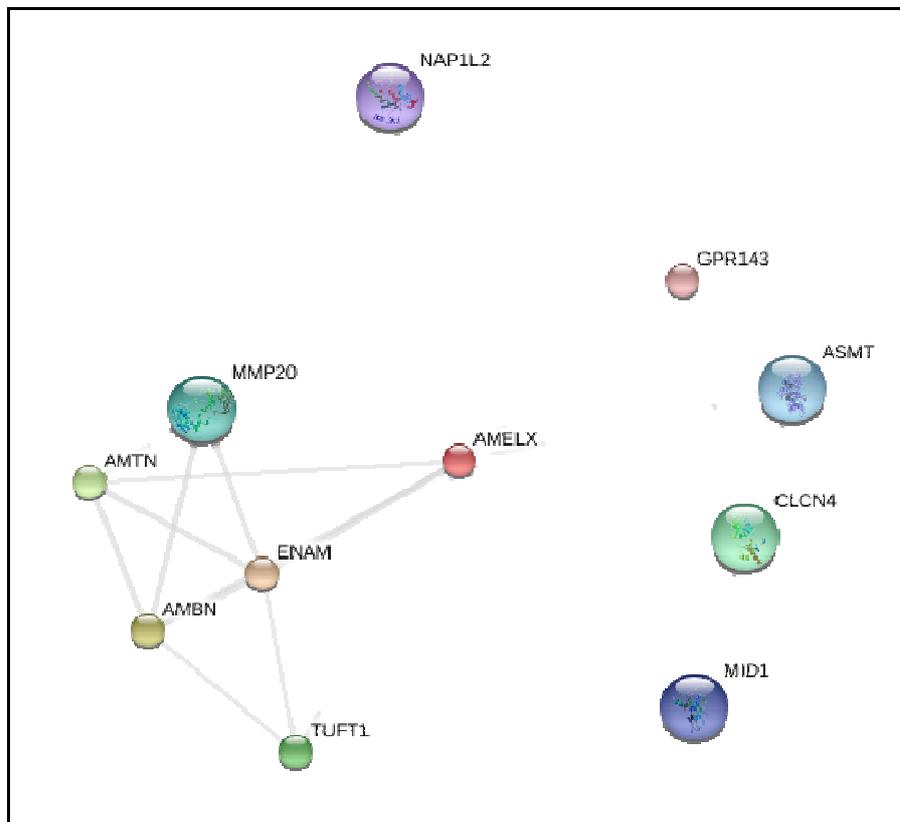


Figure 22 : Exemple de prédiction d'interaction de AMELX (String Database, [En ligne]. http://string-db.org/newstring.cgi/show_network_section.pl (consulté le 23 août 2015)).

2. ENAM

Le gène *ENAM* (OMIM 606585) (*ENAMELIN*, *AH2*), composé de 9 exons, est situé sur le chromosome 4, en position 4q13.3. Il code pour l'énameline (5% de la matrice protéique), la plus grande des phosphoprotéines de l'émail (PM : 186 kD) qui intervient dans la nucléation et élongation du cristal (car elle a une forte affinité pour l'hydroxyapatite). Elle est très rapidement dégradée après sa sécrétion par des protéases, tout d'abord à son extrémité carboxyterminale, ce qui donne naissance à des énamelines de plus faible poids moléculaire que l'on retrouve au niveau des prismes et de la substance interprismatique [14, 54].

Les modes de transmission rapportés sont autosomique dominant et autosomique récessif.

Cliniquement, le phénotype est différent selon le type de mutation et la transmission [Fig. 23]. Dans la littérature, des cas d'AI hypoplasiques localisées ou généralisées et hypomatures sont décrits avec des stries horizontales, des puits localisés, un clivage secondaire de l'émail et une béance [54-56]. Les patients homozygotes ou hétérozygotes composites ont des défauts amélaire plus sévères, qui peuvent être associés à des manifestations de type : béance antérieure, hyperplasie gingivale, résorption, ankylose [57].

TABLEAU 1. Mutations de l'AMBN				
Chromosome	Coordonnées	Nucléotide	Mutacotype	Référence
4q13.3	178743700-178743700	G>A	Aspartate hypoglycosylé	Schmitt et al. [2007]
4q13.3	178743700-178743700	G>A	Aspartate hypoglycosylé	Schmitt et al. [2007]
4q13.3	178743700-178743700	G>A	Aspartate hypoglycosylé	Schmitt et al. [2007]
4q13.3	178743700-178743700	G>A	Aspartate hypoglycosylé	Schmitt et al. [2007]

Figure 23: Tableau répertoriant différentes mutations de ENAM [48], auquel il faut ajouter de nouvelles mutations découvertes notamment dans l'exon 10 [43, 58].

3. AMBN

Le gène *AMBN* (OMIM 601259) (*AMELOBLASTIN ENAMEL MATRIX PROTEIN*), composé de 13 exons, est situé sur le chromosome 4, en position 4q13.3 et code pour l'améloblastine qui est la 2^{ème} protéine de la matrice amélaire la plus abondante durant l'amélogenèse [59, 60]. Le rôle indispensable de l'*AMBN* dans la formation de l'émail a été confirmé par des modèles animaux de souris, cependant aucune mutation associée à une AI n'avait été identifiée chez l'homme [61].

Dans la publication de 2014, Poulter décrit une délétion de l'exon 6, transmise de manière autosomique récessive, associée à une AI hypoplasique. Les cas rapportés présentent un émail à la surface poreuse, mais dure. Il conclut également que *AMBN* doit avoir un rôle dans le développement osseux, car sa localisation est proches d'autres gènes intervenant dans les tissus minéralisés (ostéopontine, sialoprotéine osseuse...) [61].

Cette protéine se localise à proximité de la membrane du prolongement de Tomes. Elle possède 2 sites de liaison à la membrane cellulaire. L'améloblastine est rapidement scindée après sécrétion. Les fragments s'incorporent à la gaine des prismes et auraient pour rôle d'éviter la fusion entre prismes et substance interprismatique.

4. LAMB3

Le gène *LAMB3* (OMIM 150310) (*LAMININ BETA-3, LAMININ B3, LAMININ 5 BETA-3 SUBUNIT, LAM5 BETA-3 SUBUNIT, BM600-125kDa, kalinin-140kDa, LAMNB1, nicein-125kDa*), composé de 22 exons, est situé sur le chromosome 1, en position 1q32.2. Ce gène code une protéine appelée laminine beta3 qui est une sous-unité de la laminine 5. Son domaine d'action se situe au niveau transmembranaire de la membrane basale et elle intervient dans la croissance et l'adhésion cellulaire [62].

Le mode de transmission est autosomique dominant avec un phénotype d'AI hypoplasique sur les dents temporaires et permanentes. Une teinte blanchâtre, des puits et stries verticales ainsi que des bords triturants crénelés peuvent être observés [63].

Ce gène *LAMB3*, tout comme *COL17A1* et *LAMA3*, est également responsable d'une autre pathologie appelée JEB : épidermolyse bulleuse jonctionnelle, lorsque les mutations concernent les deux allèles [64].

Les épidermolyses bulleuses héréditaires constituent un groupe de génodermatoses caractérisées par la formation de bulles et d'érosions cutané-muqueuses qui se forment spontanément ou à la suite de traumatismes minimes. Il en existe une trentaine de formes, classées en sous-types selon la localisation du clivage au niveau de la jonction dermo-épidermique (forme épidermolytique, avec un clivage de l'épiderme ; forme jonctionnelle, avec un clivage de la Lamina lucida ; forme dystrophique, avec un clivage de la Lamina densa ; syndrome de Kindler, avec des niveaux de clivages variables). Cette fragilité cutané-muqueuse se manifeste par des atteintes générales (décollement bulleux-muqueux, fibrose cicatricielle) et bucco-dentaires (ankyloglossie, microstomie) [65].

5. LAMA3

Le gène *LAMA3* (OMIM 600805) (*LAMININ ALPHA-3, LAMA3, LAMININ A3, LAMININ5 ALPHA-3 SUBUNIT, LAM5 ALPHA-3 SUBUNIT, EPILIGRIN 170-KD SUBUNIT, BM600, BM600-150kDa, epiligrin, kalinin-165kDa, LAMNA, nicein-150kDa*) composé de 75 exons, est situé sur le chromosome 18, en position 18q11.2. Ce gène code pour la laminine alpha3 qui est également une sous-unité de la laminine 5 (cf. *LAMB3*) [66].

Des mutations de ce gène sont rattachées à des épidermolyses bulleuses, et au syndrome Laryngo-onycho-cutané (LOC, OMIM 245660) qui est un sous-type d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle caractérisé par une production anormale de tissu de granulation (qui affecte principalement les voies respiratoires, la conjonctive et les régions unguéales) [67].

Récemment, des mutations de *LAMA3* ont été décrites dans le cadre de défauts amélaire [68].

6. COL7A1

Le gène *COL7A1* (OMIM 120120) (*COLLAGEN, TYPE VII, ALPHA-1, LONG-CHAIN COLLAGEN, LC COLLAGEN, EBD1, EBDCT, EBR1*), composé de 118 exons, est situé sur le chromosome 3, en position 3q21.31 et code pour la chaîne alpha-1 du collagène de type VII. Le collagène VII est le constituant principal de la lame basale et forme des fibrilles permettant l'ancrage au tissu conjonctif sous-jacent [69].

COL7A1 est le gène causal de l'épidermolyse bulleuse dystrophique (transmission autosomique récessive ou dominante) [70], cependant l'équipe de Umemoto a également mis en évidence des défauts de formation de l'émail (lors de la différenciation des améloblastes) dus à une déficience en collagène VII [71].

7. COL17A1

Le gène *COL17A1* (OMIM 113811) (*COLLAGEN TYPE XVII ALPHA-1, COL17A1, BULLOUS PEMPHIGOID ANTIGEN 2, BPAG2, BP180*), composé de 56 exons, est situé sur le chromosome 10, en position 10q24.3-q25.1 et code pour le collagène XVII comme son nom l'indique [72].

Ce gène va intervenir au niveau des hémidesmosomes de la membrane basale et être à l'origine d'épidermolyses bulleuses jonctionnelles lorsqu'il est muté [65].

De la même façon que *LAMA3*, *LAMB3* ou *COL7A1*, le gène *COL17A1* va pouvoir dans certains type de mutations être à l'origine d'une AI [73].

B. AI non-syndromiques hypominéralisées

1. *FAM83H*

Le gène *FAM83H* (OMIM 611927) (*FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY, MEMBER H, FLJ46072*), composé de 5 exons, est situé sur le chromosome 8, en position 8q.24.3 et code pour une protéine intracellulaire qui semble intervenir dans la différenciation des pré-améloblastes en améloblastes fonctionnels et dans la minéralisation de la matrice amélaire [74].

Le mode de transmission est autosomique dominant et le type d'AI hypominéralisé généralisé ou localisé.

Des mutations ont été rapportées dans des familles de toutes origines ethniques : coréenne, hispanique, asiatique, caucasienne, turques [58, 75]. Toutes ces mutations sont situées au niveau de l'exon 5 du gène *FAM83H* [76].

Cliniquement, les dents temporaires et permanentes sont atteintes et présentent des défauts de minéralisation avec un émail mou, rugueux, poreux. L'épaisseur de l'émail est initialement normale, puis une usure importante se produit [77]. Les analyses céphalométriques de certains patients ont mis en évidence des malocclusions de classe III ainsi que des béances antérieures [78].

2. *C4orf26*

Le gène *C4ORF26* (OMIM 614829) (*CHROMOSOME 4 OPEN READING FRAME 26, FLJ23657*), composé de 2 exons, est situé sur le chromosome 4, en position 4q21.1 et code pour un acide phosphoprotéique de la matrice extra-cellulaire. D'après l'étude de Parry et al. 2012, le gène aurait une fonction dans la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite après phosphorylation de la région C-terminale [79].

Le mode de transmission est autosomique récessif et le phénotype celui d'une AI hypominéralisée sur les dents temporaires comme permanentes avec une teinte jaune-brune, des sensibilités, du biofilm et une usure prématurée [79].

3. *SLC24A4*

Le gène *SLC24A4* (OMIM 609840) (*SOLUTE CARRIER FAMILY 24, SODIUM/POTASSIUM/CALCIUM EXCHANGER, MEMBER 4, NCKX4*), composé de 17 exons, est situé sur le chromosome 14, en position 14q32.12 et code pour une protéine jouant un rôle d'échangeur d'ions (transporteur d'ions calcium/sodium /potassium dépendant) [80, 81].

La transmission se fait sur le mode autosomique récessif et le phénotype est celui d'une AI hypominéralisée avec une teinte ambrée et de l'émail qui se clive.

Par ailleurs, ce gène a fait l'objet d'une étude de variants (SNP : single nucleotide polymorphism) concernant les cheveux, la pigmentation de l'oeil, la sensibilité de la peau au soleil et les tâches de rousseur parmi 2718 islandais et 1214 hollandais. L'équipe de Sulem conclue à l'association d'un variant de *SLC24A4* avec la pigmentation de l'oeil et des cheveux [82].

4. *ITGB6*

Le gène *ITGB6* (OMIM 147558) (*INTEGRIN, BETA-6*), composé de 15 exons, est situé sur le chromosome 2, en position 2q24.2 et code pour une intégrine (glycoprotéine de l'adhésion cellulaire) retrouvée uniquement sur les cellules épithéliales. *ITGB6* jouerait un rôle au niveau des récepteurs de la fibronectine et dans l'activation de *MMP20* [83].

Le mode de transmission des mutations décrites est autosomique récessif [84]. Les formes cliniques retrouvées sont soit une AI hypoplasique avec un clivage variable de l'émail [83], soit une AI hypominéralisée pigmentée avec des puits et des colorations exogènes [85].

C. AI non-syndromiques hypomatures

1. *MMP20*

Le gène *MMP20* (OMIM 604629) (*MATRIX METALLOPROTEINASE, ENAMELYSIN*), composé de 10 exons, est situé sur le chromosome 11, en position 11q22.2 [Fig. 24]. Il code pour l'énamélysine, une protéinase de l'émail intervenant dans la dégradation de la matrice organique en phase de maturation amélaire. En effet, *MMP20* modifie la structure des amélogénines de haut poids moléculaire en éliminant leur domaine C-terminal au stade de maturation. Ceci entraîne la dégradation des nanosphères et permet la croissance en épaisseur et en largeur des cristaux de l'émail [86, 87].

Le mode de transmission est autosomique récessif et le phénotype celui d'une AI hypoplasique-hypomature pigmenté ou hypomature pigmenté.

Lorsque l'hypoplasie est combinée à l'hypomaturation, l'aspect de l'émail est poreux, jaune opaque avec une usure prématurée [88].

Lorsqu'il s'agit d'une AI hypomature pigmentée, l'épaisseur de l'émail est normale, cependant l'apparence est crayeuse, marbrée, et propice aux fractures [89-91].

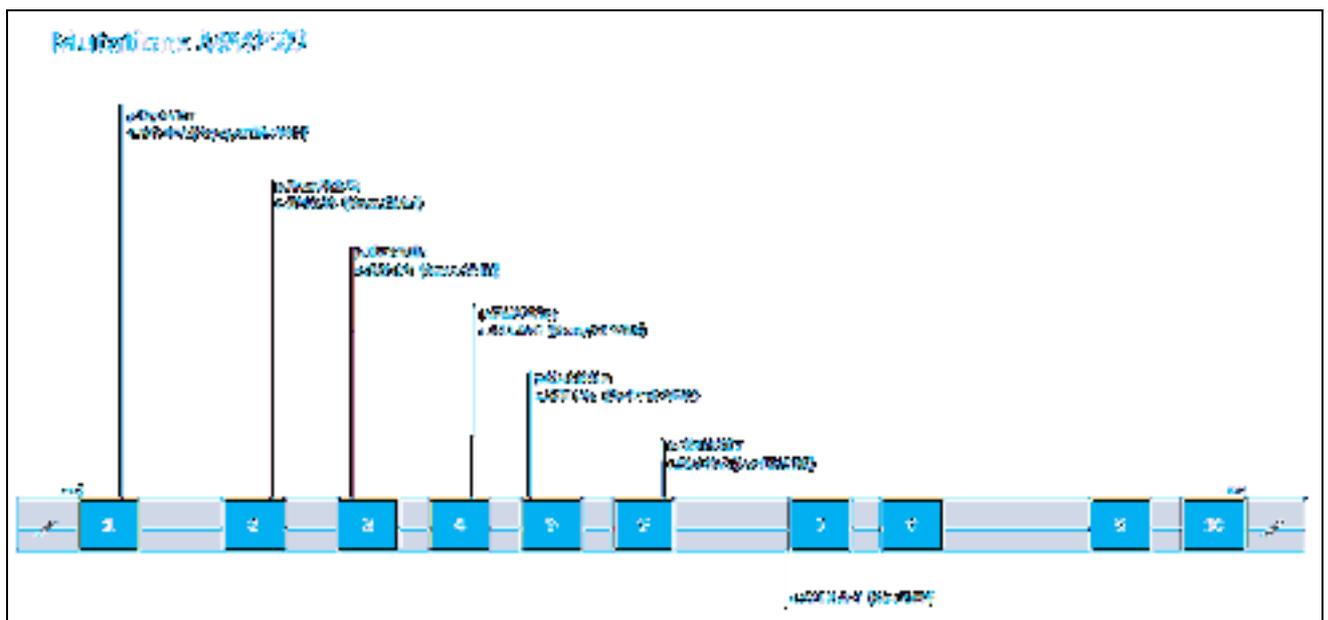


Figure 24 : Répartitions des mutations *MMP20* connues sur les différents exons du gène [88-93].

Les informations concernant ce gène sont développées de manière plus approfondies dans la publication n°2 du chapitre « Résultats ».

2. *KLK4*

Le gène *KLK4* (OMIM 603767) (*KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASE 4, KALLIKREIN 4, KLK-L1, PROTEASERINE 17, PRSS17, PROSTASE, PSTS, EMSP, ENAMEL MATRIX SERINE PROTEINASE 1, EMSP1*), composé de 5 exons codants (sur 6 décrits) [94], est situé sur le chromosome 19, en position 19q13.41 et code pour une sérine protéinase qui joue un rôle dans les étapes de nucléation et de minéralisation de l'émail .

Le mode de transmission est autosomique récessif et le type d'AI hypomature avec des colorations jaunâtres, marbrées, une surface rugueuse, mais une épaisseur normale [Fig. 25]. Ce phénotype est très proche de celui décrit pour le gène *MMP20* [92].

Conséquences	Chrom	Protéine	Phénotype	Localisation
<i>KLK4</i> mutations	19q13.41	Sérine protéinase	AI hypomature avec colorations jaunâtres, marbrées, surface rugueuse	Minéralisation de l'émail
<i>MMP20</i> mutations	11q24.3	Méthylgénéralphosphatase	AI hypomature avec colorations jaunâtres, marbrées, surface rugueuse	Minéralisation de l'émail

Figure 25 : Tableau répertoriant différentes mutations de *MMP20* et *KLK4* [48] auquel il faut ajouter [92, 95].

3. *WDR72*

Le gène *WDR72* (OMIM 613214) (*WD REPEAT-CONTAINING PROTEIN 72, FLJ38736*), composé de 20 exons (dont le 1^{er} est non codant), est situé sur le chromosome 15, en position 15q21.3 et code pour une protéine intervenant au niveau des membranes cellulaires lors de la minéralisation de l'émail. D'après Katsura et al. 2014, *WDR72* aurait une action dans la mobilisation des vésicules d'endocytose [96].

La transmission de l'affection est autosomique récessive et les signes cliniques ceux d'une AI hypomature. Les dents temporaires comme permanentes possèdent un émail d'épaisseur normale, cependant d'importantes colorations de teinte crème ou jaune-brun sont observables, ainsi que des usures prématurées et fractures secondaires [77, 97].

4. *STIM1*

Le gène *STIM1* (OMIM 605921) (*STROMAL INTERACTION MOLECULE 1, D11S4896E, GOK*), composé de 12 exons, est situé sur le chromosome 11, en position 11p15.4 et code pour un capteur de calcium (qui opère le transfert d'ions calcium du réticulum endoplasmique à la membrane cellulaire via les canaux calciques). *STIM1* aurait une action lors de la maturation de l'émail via ce transport trans-cellulaire des ions calcium [81, 98].

Ce gène est également responsable de pathologies telles que le déficit immunitaire combiné par déficit en *STIM1* (immunodéficiência 10 IMD10, OMIM 612783) [99], la myopathie avec agrégats tubulaires (*TAM1*, OMIM 160565) [100], et le syndrome de Stormorken-Sjaastad-Langset

(thrombocytopathie, asplénie, myosis, OMIM 185070) [101]. En 2009, l'article de Picard rapporte le cas de patients atteints du syndrome d'immunodéficience 10 ayant des défauts amélaire [99].

5. TUFT1

Le gène *TUFT1* (OMIM 600087) (*TUFTELIN 1*), composé de 13 exons, est situé sur le chromosome 1, en position 1q21.3 et code pour une acido-protéine hydrophile (PM : 66kDa) retrouvée dans la matrice amélaire en formation et au stade de maturation. La tuftéline comprend 7 sites de phosphorylation qui pourraient servir à fixer les ions calcium. Sa localisation n'est pas homogène : elle est en quantité importante à la jonction émail-dentine et dans la substance interprismatique. Sa fonction n'est pas encore totalement définie, cependant ce gène jouerait un rôle majeur dans la nucléation du cristal de l'émail et l'équipe de Deutsch en 1994 a avancé l'hypothèse d'une forme d'AI autosomique dominante liée à une mutation dans ce gène [102]. A ce jour aucune AI avec mutation dans ce gène n'a été trouvée.

Par ailleurs, ce gène pourrait également être impliqué dans la prédisposition individuelle au MIH (Molar-Incisor-Hypomineralization) [103].

D. AI syndromiques

Certains gènes connus sont impliqués dans des AI syndromiques, cependant les limites sont parfois floues. En effet, *AMELX*, par exemple, peut être retrouvé dans des AI isolées ou dans le syndrome MLS. Pour *DLX3* également, l'AI peut être isolée ou associée au syndrome tricho-dento-osseux.

1. DLX3

Le gène *DLX3* (OMIM 600525) (*DISTAL-LESS HOMEODOMAIN 3*), composé de 3 exons, est situé sur le chromosome 17, en position 17q21.33 et code pour une protéine à homéoboîte divergente. Avec *Msx2*, *Dlx5* et *Runx2*, *Dlx3* joue un rôle dans la régulation de l'expression de l'ostéocalcine durant l'embryogenèse chez la souris [104] et notamment lors des stades de minéralisation et de la différenciation ostéoblastique.

DLX3 est impliqué des AI hypomature-hypoplasiques à transmission autosomique dominante, avec un taurodontisme et de larges chambres pulpaire. Ces AI peuvent être associées au syndrome tricho-dento-osseux (TDO) [105].

Le TDO (OMIM 190320) est une forme de dysplasie ectodermique caractérisées par le phénotype suivant : des cheveux bouclés à frisés, une AI, une augmentation de la densité minérale osseuse (DMO) et de l'épaisseur de la corticale des os du crâne [106].

L'expression de cette maladie est très variable. La mutation la plus commune est une délétion de 4pb (c.571_574delGGGG) [107] qui se manifeste par un émail hypoplasique, hypomature, une teinte jaunâtre, une usure prématurée avec parfois exposition pulpaire et un taurodontisme. Cependant Wright décrit une mutation 560delCT à l'état hétérozygote avec un phénotype atténué (moins de pertes capillaires, et des manifestations dentaire et osseuses moindres) [108].

2. FAM20A

Le gène *FAM20A* (OMIM 611062) (*FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 20 MEMBER A*, *DKFZp434F2322*), composé de 11 exons, est situé sur le chromosome 17, en position 17q24.2. Ce

gène fait partie de la famille des *FAM20* au même titre que *FAM20B* et *FAM20C* et coderait pour une protéine kinase intervenant dans la minéralisation de l'émail et la différenciation des cellules hématopoïétiques [109].

Ce gène est impliqué dans une AI syndromique appelée ERS pour émail-rein syndrome (OMIM 204690) (Annexe 1). Cette maladie se transmet sur le mode autosomique récessif et est caractérisée par une AI hypoplasique, une néphrocalcinose, une hyperplasie gingivale, un retard éruption dentaire, des inclusions dentaires, des hyperplasies des sacs folliculaires et des pulpolites [110, 111].

Les informations concernant ce gène sont développées de manière plus approfondies dans les publications n°3 et 4 du chapitre « Résultats ».

3. TP63

Le gène *TP63* (OMIM 603273) (*TUMOR PROTEIN p63*, *TUMOR PROTEIN p73-LIKE*, *TP73L*, *p53-RELATED PROTEIN p63*, *p63*, *KET*, *EEC3*, *NBP*, *OFC8*, *p51*, *p53CP*, *p73H*, *SHFM4*, *TP53CP*, *TP53L*, *TP73L*), composé de 14 exons, est situé sur le chromosome 3, en position 3q28 et code pour un facteur de transcription essentiel dans l'initiation du développement dentaire. Cette protéine est sécrétée par les cellules épithéliales et envoie des signaux aux cellules ecto-mésenchymateuses [112].

Des mutations dans ce gène vont être à l'origine du syndrome EEC (dysplasie ectodermique avec ectrodactylie et fente palatine, OMIM 129900) associé à une AI [113].

Dans ce syndrome, le phénotype est celui d'une dysplasie ectodermique avec une peau sèche des cheveux clairsemés, effilochés, à croissance lente. Des doigts et orteils peuvent être fusionnés et une fente labio-palatine peut être observée [114]. Par ailleurs, des cas de prémolaires surnuméraires et incisives mandibulaires fusionnées ont déjà été rapportés. L'AI, quant à elle, peut être hypoplasique, hypomature ou hypominéralisée et se manifeste en denture temporaire et permanente [113].

4. CNNM4

Le gène *CNNM4* (OMIM 607805) (*CYCLIN M4*, *ANCIENT CONSERVED DOMAIN PROTEIN 4*, *ACDP4*, *KIAA1592*), composé de 7 exons, est situé sur le chromosome 2, en position 2q11.2. La protéine *CNNM4* va intervenir dans l'homéostasie des ions métalliques de magnésium [Fig. 26]. Ce transport ionique est essentiel pour la formation du cristal de l'émail [16].

Les mutations de ce gène sont responsables du syndrome de Jalili aussi appelé Dystrophie des cônes et des bâtonnets (OMIM 217080). Dans ce syndrome à transmission autosomique récessive, les manifestations oculaires sont celles d'une rétinite pigmentaire, avec une baisse de l'acuité visuelle centrale et périphérique, une altération de la vision des couleurs, une photophobie, et peut aboutir à une cécité nocturne. Les manifestations bucco-dentaires vont être l'AI hypoplasique et/ou hypominéralisée avec un délabrement important de l'émail (fêlures, aspect jaunâtre et rugueux). Par ailleurs un taurodontisme des molaires et des béances antérieures sont souvent observées [115].

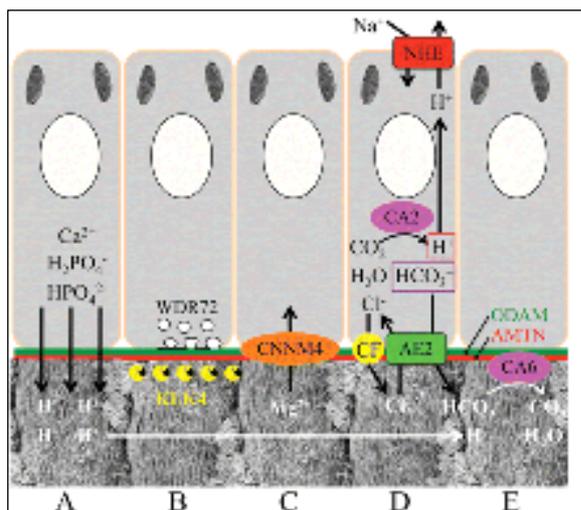


Figure 26 : Homéostasie des ions métalliques de Mg^{2+} lors de la formation de l'émail dentaire [6].

5. *ROGDI*

Le gène *ROGDI* (OMIM 614574) (*ROGDI DROSOPHILA HOMOLOG OG, FLJ22386*), composé de 7 exons, est situé sur le chromosome 16, en position 16p13.3 et code pour une protéine dont la fonction est encore inconnue, mais qui interagirait avec les MAP Kinase (mitogen activating protein) dans le cycle cellulaire. Par ailleurs, il semblerait que *ROGDI* interagisse avec *DISC1* (Disrupted In Schizophrenia 1, OMIM 605210), une protéine impliquée dans la stabilité du cytosquelette, la migration neuronale, le transport intracellulaire et la division cellulaire [116-118].

La transmission se fait sur le mode autosomique récessif [116, 117].

Des mutations dans ce gène sont à l'origine du syndrome de Kohlschütter-Tönz (KTZS, OMIM 226750) (Annexe 2). Il s'agit d'un syndrome neurodégénératif (amélo-cérébro-hypohidrotique) qui associe une AI, une épilepsie et une régression mentale. D'autres signes tels que l'hypersudation, une myopie, un taux de sodium et de potassium élevé peuvent aussi être observés et des cas d'hypertrophie ventriculaire, d'hypoplasie du vermis cérébelleux ont été retrouvés. Au niveau bucco-dentaire, l'AI est hypominéralisée-hypomature, la couche d'émail est très fine et s'use très rapidement [119, 120].

Les informations concernant ce gène sont développées de manière plus approfondies dans la publication n° 1 du chapitre « Résultats ».

6. *LTBP3*

Le gène *LTBP3* (OMIM 602090) (*LATENT TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA BINDING PROTEIN 3, LTBP2, FORMERLY*), composé de 28 exons, est situé sur le chromosome 11, en position 11q13.1 et code pour une protéine de la voie de signalisation TGF-beta, intervenant dans la production et la dégradation des matrices extracellulaires [121].

Initialement, le syndrome de Verloes-Bourguignon (OMIM 601216), décrit en 1996 désignait un phénotype de brachyolmie associée à une AI, transmis de façon autosomique récessive [122]. Récemment le gène *LTBP3* a été reconnu comme causal de cette pathologie [123]. La brachyolmie est un groupe hétérogène de dysplasies squelettiques avec comme principale caractéristique un

retard de croissance staturale disproportionné. Radiographiquement, une platyspondylie généralisée sans modification importante des épiphyses ou métaphyses des os longs est observée. Dans le cadre de ce syndrome, l'AI décrite est hypoplasique avec un taurodontisme et de larges chambres pulpaire. Par ailleurs, certains cas présentent une classe III squelettique, des retards d'éruption et des oligodonties [124-126].

Les informations concernant ce gène sont développées de manière plus approfondies dans la publication n°5 du chapitre « Résultats ».

7. *FAM20C*

Le gène *FAM20C* (OMIM 611061) (FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 20 MEMBER C, DENTIN MATRIX PROTEIN 4, DMP4, DKFZp547D065), composé de 10 exons, est situé sur le chromosome 7, en position 7p22.3 code pour une protéine de la famille des FAM [109].

En 2007, cette protéine de la matrice dentinaire a été isolée dans les odontoblastes de rat, cependant une expression plus faible a également été retrouvée dans les os, le rein, le foie, le cerveau et les poumons [127]. Cette protéine DMP4 interviendrait dans la régulation de la minéralisation de la dentine, mais également dans la phosphorylation des caséines et de certaines protéines de la biominéralisation [128].

Des mutations de ce gène *FAM20C* ont été rapportées dans le cadre du syndrome de Raine (RNS, OMIM 259775). Ce syndrome de dysplasie osseuse ostéosclérotique létale, très rare, à transmission autosomique récessive, est caractérisé par une ostéosclérose généralisée, une ossification périostique, une dysmorphie faciale caractéristique, des anomalies intracérébrales et une létalité dans la période néonatale. Au niveau bucco-dentaire, une hypertrophie gingivale, des dents néonatales, une fente palatine ou une lèvre bifide peuvent être observées. Les angles mandibulaires sont obtus et les corticales hyperostotiques. Initialement, cette pathologie était considérée comme létale durant l'enfance, cependant la survie jusqu'à l'âge adulte est possible [129]. Récemment, en 2015, l'équipe d'Acevedo a rapporté 5 cas issus de 2 familles brésiliennes consanguines avec un syndrome de Raine atténué. Ces patients présentaient une Amélogénèse imparfaite hypoplasique et des mutations homozygotes (c.784+5G>C) pour la première famille et (c.1487C>T;p.P496L) pour la deuxième [130]. Cet article montre la variabilité du phénotype bucco-dentaire dans cette maladie.

8. Autres syndromes

Il existe d'autres syndromes décrits dans la littérature, dont l'origine génétique n'est pas encore établie. C'est le cas du syndrome de Heimler (1991) et du syndrome rapporté par Witkop en 1975.

- Syndrome de Heimler (OMIM 234580). Il s'agit d'une AI associée à une surdité neurosensorielle et anomalies des ongles [131].
- Syndrome de Witkop (ou syndrome dents et ongles, OMIM 189500) dans lequel est décrit une hypoplasie de l'émail, une onycholyse terminale (décollement de l'ongle du lit unguéal à départ disto-latéral) et une hypohidrose à transmission autosomique dominante. Il s'agirait d'une forme d'ectodermie dysplasique avec intervention du gène *MSX1* [132].

Enfin dans de nombreux syndromes, des anomalies de l'émail, qualifiées d'hypoplasies sont recensées. Citons, le 3M syndrome comme exemple ("gloomy face", AI et petite taille, OMIM 273750) [133].

E. Tableau récapitulatif

Le tableau ci-dessous récapitule les informations précédentes concernant les gènes connus et l'Amélogénèse Imparfaite. Les synonymes du gène, la position chromosomique, le nombre d'exons, le mode de transmission, la fonction protéique et le phénotype sont répertoriés [Fig. 27]

Nom du gène (OMIM)	Synonymes	Position	Nombre d'exons Transmission	Protéine codée	Phénotype de l'AI Syndrome associé
AMELX (300391)	AMELOGENIN ALGN AMG AMGL	Xp22.2 inclus dans ARHGAP6	7 liée à l'X	Amélogénine Protéine de la matrice de l'émail	Hypoplasique ou hypomature Stries verticales (peut être associé au Syndrome MLS)
AMELY (410000)		Yp11.2			
ENAM (606585)	ENAMELIN AIH2	4q13.3	9 AD AR	Protéine de la matrice de l'émail	Hypoplasique dents lisses, puits béance antérieure
AMBN (601259)	AMELOBLASTIN ENAMEL MATRIX PROTEIN	4q13.3	13 AR	Protéine de la matrice de l'émail	Hypoplasique
LAMB3 (150310)	LAMININ B3 LAMININ 5, BETA- 3 SUBUNIT LAM5, BETA-3 SUBUNIT BM600-125kDa, kalinin-140kDa, LAMNB1, nicein- 125kDa	1q32.2	22 AD	Protéine de l'émail	Hypoplasique Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)
LAMA3 (600805)	LAMININ,ALPHA-3 LAMININ5,ALPHA- 3 SUBUNIT LAM5,ALPHA-3 SUBUNIT EPILIGRIN,170-KD	18q11.2	75 AD	Protéine de l'émail	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)

	<i>SUBUNIT BM600 KALININ-165kDa, LAMNA, NICEIN-150kDa</i>				
<i>COL7A1 (120120)</i>	<i>COLLAGEN, TYPE VII, ALPHA-1, EBD1 EBDCT EBR1 LONG-CHAIN COLLAGEN</i>	3q21.31	118 AD	Protéine de l'émail	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)
<i>COL17A1 (113811)</i>	<i>BP180 BULLOUS PEMPHIGOID ANTIGEN 2 BPAG2</i>	10q24.3-q25.1	56 AD	Protéine de l'émail	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)
<i>FAM83H (611927)</i>	<i>FLJ46072</i>	8q24.3	5 AD	Protéine intracellulaire intervenant dans la différenciation des améloblastes	Hypominéralisée Classe III Béance antérieure
<i>C4orf26 (614829)</i>	<i>FLJ23657</i>	4q21.1	3 AR	Acide phospho- protéique de la matrice extra- cellulaire	Hypominéralisée
<i>SLC24A4 (609840)</i>	<i>NCKX4 SOLUTE CARRIER FAMILY 24 (SODIUM, POTASSIUM, CALCIUM EXCHANGER) MEMBER4</i>	14q32.12	17 AR	Echangeur d'ions (transporteur d'ions calcium/sodium /potassium dépendant)	Hypominéralisée
<i>ITGB6 (147558)</i>	<i>INTEGRIN, BETA-6</i>	2q24.2	15 AR	Intégrine des cellules épithéliales	Hypominéralisée pigmentée ou Hypoplasique

<i>MMP20</i> (604629)	<i>ENAMELYSIN</i>	11q22.2	10 AR	Métalloprotéase	Hypomature
<i>KLK4</i> (603767)	<i>KALLIKREIN 4</i> <i>PROTEASE SERINE 17</i> <i>PRSS17</i> <i>PROSTASE PSTS</i> <i>EMSP1</i>	19q13.41	5 AR	Sérine protéase	Hypomature Pigmentée
<i>WDR72</i> (613214)	<i>FLJ38736</i>	15q21.3	20 AR	Protéine cytoplasmique intervenant dans la minéralisation de l'émail	Hypomature
<i>STIM1</i> (605921)	<i>STROMAL INTERACTION MOLECULE 1</i> <i>D11S4896E</i> <i>GOK</i>	11p15.4	12 AR	Capteur de calcium	Gène impliqué dans : - le déficit immunitaire combiné par déficit en <i>STIM1</i> (immunodéficiences 10 IMD10) - la myopathie avec agrégats tubulaires (<i>TAM1</i>) - le syndrome de Stormorken-Sjaastad-Langslet (thrombocytopathie, asplénie, myosis)
<i>TUFT1</i> (600087)	<i>TUFTELIN</i>	1q21.3	13	Acido-protéine de la matrice amélaire	Prédisposition individuelle au MIH (Molar-Incisor-Hypomineralization)[103]
<i>DLX3</i> (600525)	<i>DISTAL-LESS</i> <i>HOMEODOMAIN 3</i>	17q21.33	3 AD	Facteur de transcription	Hypoplasique Hypomature Taurodontisme Anomalies cheveux et os
<i>FAM20A</i> (611062)	<i>DKFZp434F2322</i>	17q24.2	11 AR	Glycoprotéine sécrétée	Hypoplasique Hyperplasie gingivale Néphrocalcinose
<i>TP63</i> (603273)	<i>TUMOR PROTEIN p63-LIKE, TP73L</i> <i>p53-RELATED</i> <i>PROTEIN p63</i>	3q28	14 AD	Facteur de transcription	Syndrome EEC (dysplasie ectodermique avec ectrodactylie et fente palatine)

	<i>p63</i> <i>EEC3, KET, NBP,</i> <i>OFC8, p51,</i> <i>p53CP, p63,</i> <i>p73H, p73L,</i> <i>SHFM4, TP53CP,</i> <i>TP53L, TP73L</i>				
<i>CNNM4</i> (607805)	<i>ACDP4</i> <i>KIAA1592</i>	2q11.2	7 AR	Transporteur de métaux	Dystrophie cônes et bâtonnets (syndrome de Jalili)
<i>ROGDI</i> (614574)	<i>ROGDI</i> <i>DROSOPHILA</i> <i>HOMOLOG OF,</i> <i>FLJ22386</i>	16p13.3	11 AR	Fonction inconnue, mais interaction avec MAP Kinase et DISC1	Hypominéralisée-Hypomature Syndrome de Kohlschütter-Tönz
<i>LTBP3</i> (602090)	<i>LATENT</i> <i>TRANSFORMING</i> <i>GROWTH</i> <i>FACTOR-BETA-</i> <i>BINDING PROTEIN</i> <i>3</i> <i>LTBP2 FORMERLY</i>	11q13.1	28 AR	Production et dégradation de la matrice extracellulaire, interaction avec la fibrillin1 [134]	Brachyolmie
<i>FAM20C</i> (611061)	<i>FAMILY WITH</i> <i>SEQUENCE</i> <i>SIMILARITY 20</i> <i>MEMBER C,</i> <i>DENTIN MATRIX</i> <i>PROTEIN 4,</i> <i>DMP4,</i> <i>DKFZp547D065</i>	7p22.3	10 AR	Protéine de la matrice dentinaire	Syndrome de Raine

Figure 27 : Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI. (AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif).

CHAPITRE III :
Stratégies de recherche de nouveaux gènes

I. Projet recherche

Ce projet de recherche repose sur la constitution d'une cohorte de patients présentant une amélogénèse imparfaite isolée ou associée à d'autres symptômes dans le cadre de syndromes. Il est soutenu par l'Université de Strasbourg, le Ministère de la Santé (Projet Hospitalier de Recherche Clinique PHRC 2008 No.4266 « Etude clinique et moléculaire des amélogénèses imparfaites »), les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (API, 2009-2012, « Développement de la cavité buccale : du gène au phénotype clinique chez l'Homme ») et cofinancé par le Fond Européen de Développement Régional (FEDER) de l'Union européenne dans le cadre du programme INTERREG IV Rhin supérieur/Offensive Sciences A27 "Manifestations bucco-dentaires des maladies rares" (www.genosmile.eu).

Cette étude clinique a obtenu les autorisations légales sous les numéros : NCT01746121 and NCT02397824 (www.clinicaltrials.gov) et a été agréée par le Ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche, DGRI / Cellule de bioéthique DC-2012-1677.

Une information éclairée et des formulaires de consentement sont fournis afin d'assurer le respect de vie privée et les droits du patient (enregistrement D4 selon l'agrément CCTIRS 09.11.2008 et l'autorisation de la CNIL (Commission nationale de l'informatique et des libertés) 05.18.2009, sous le numéro 908416). Les échantillons biologiques (salive ou sang) pour l'extraction d'ADN; les dents temporaires exfoliées ou les échantillons issus d'actes chirurgicaux (dents permanentes avulsées, fibroblastes gingivaux) sont collectés.

Différents partenaires sont réunis afin de mener à bien les recherches, notamment : le Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg), le Laboratoire de Génétique Médicale UMR_S 1112, unité INSERM 1112 (Faculté de Médecine de Strasbourg, Pr. Dollfus), plusieurs équipes de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Illkirch).

L'approche expérimentale repose sur une recherche translationnelle. A partir de l'observation précise du phénotype clinique des patients atteints, un protocole de recherche est mis en place au laboratoire et permet d'identifier de nouvelles mutations ou de nouveaux gènes. Ainsi la stratégie de recherche est centrée sur l'étude de familles informatives, le plus souvent avec un mode de transmission récessif, recrutées dans le centre de référence.

Dans un premier temps, après signature du consentement éclairé, l'examen clinique, radiographique et l'analyse familiale sont répertoriés dans une base de données (D[4]/Phenodent), puis des prélèvements biologiques peuvent être proposés aux familles.

A. Le registre D[4]/Phenodent

Diagnostiquer les Défauts Dentaires, base de Données, D[4]/Phenodent est un protocole d'examen et de recherche clinique matérialisé par la constitution d'un registre informatique, multicentrique, base de données biomédicales. Ce registre est interfacé à un site web dynamique Phenodent, permettant la collecte et l'analyse de données phénotypiques bucco-dentaires humaines dans le but de :

- Recueillir de manière standardisée des données cliniques bucco-dentaires et oro-faciales dans le cadre de consultations cliniques spécialisées en odontogénétique (formulaire d'enregistrement des données phénotypiques, examens complémentaires radiographiques, clichés photographiques numérisés). Ces informations peuvent être complétées par une analyse histopathologique des tissus dentaires et des prélèvements biologiques éventuels.
- Obtenir des données épidémiologiques sur la fréquence de ces pathologies
- Stimuler le recrutement de ces patients et installer la base d'une analyse moléculaire et histopathologique
- Promouvoir des projets de recherche dans ce domaine d'investigation ; les projets suivants peuvent être envisagés :
 - Analyses de phénotypes bucco-dentaires dans le cadre de syndrome, Identification de mutations dans les gènes connus responsables de ces pathologies
 - Corrélation phénotype-génotype, identification de nouveaux gènes (approche familiale)
 - Comparaison des données bucco-dentaires humaines et des anomalies constatées dans des modèles animaux.
- Faciliter le diagnostic et la compréhension des pathologies dentaires et orales et des maladies ou symptômes associés.

B. Prélèvements biologiques

1. Prélèvements salivaires

Les échantillons salivaires sont prélevés à l'aide du kit Oragene®•DNA (OG-250) (2 mL sample volume). Il s'agit d'un kit permettant de collecter la salive de manière non invasive, de la stabiliser et de la transporter afin d'en extraire l'ADN.

Protocole [Fig. 28]:

- Commencer à déposer la salive dans le collecteur
- Continuer jusqu'au niveau indiqué (sans bulles)
- Poser le flacon sur une surface plane et fermer le bouchon de manière étanche
- Agiter pendant 10 secondes

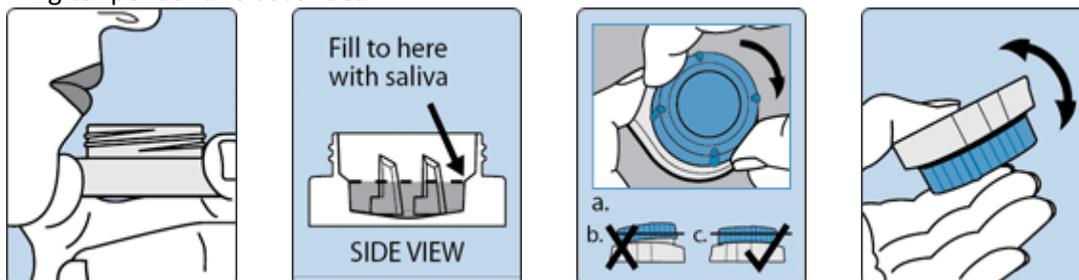


Figure 28 : Protocole de prélèvement salivaire (kit Oragene®•DNA)

2. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN issu de prélèvements salivaires se fait selon le protocole prepIT®•L2P du kit Oragene-DNA :

- Incuber à 50°C à l'étuve durant 2 heures
- Transférer 0,5mL des échantillons salivaires dans des microtubes
- Ajouter 20µL de solution Oragene-DNA Purifier (OG-L2P)
- Incuber sur la glace 10min
- Transférer le surnageant dans un nouveau tube
- Ajouter 500µL d'éthanol à 95-100%. Mélanger
- Laisser précipiter 10min à température ambiante
- Centrifuger 3min à 13000 rpm dans une orientation connue
- Eliminer le surnageant
- Laver avec 250µL d'éthanol à 70%, laisser 1 min puis éliminer l'éthanol.
- Centrifuger 5min à 13000 rpm
- Ajouter 100µL de TE 20 :1 (20mM Tris, 1mM EDTA, pH8)
- Suspendre le culot par aspiration/refoulement
- Laisser l'ADN s'hydrater 1h à 50°C sous agitation douce
- Quantifier l'ADN (protocole Qubit™) et sa pureté (migration par électrophorèse sur gel d'agarose)

3. Quantification Qubit™

L'ADN est quantifié à l'aide d'un fluorimètre (Qubit™) [Fig. 29]. Il s'agit d'une mesure de concentration basée sur la détection de cibles-spécifiques fluorescentes. Il est possible d'utiliser ce système pour quantifier l'ADN, l'ARN ou les protéines. Les résultats seront plus précis qu'avec une quantification par UV-absorbance ou densité optique.

Qubit™ Assays
www.lifetech.com/qubit

QUICK REFERENCE CARD

NOTE: For best results, store the dye and the buffer at room temperature. Store the DNA, RNA, and protein standards at 4°C. Ensure that all assay reagents are at **room temperature** before you begin.

1. Set up two Assay Tubes for the standards (three for the protein assay) and one tube for each user sample.
2. Prepare the Qubit™ Working Solution by diluting the Qubit™ reagent 1:200 in Qubit™ buffer. Prepare 200 µL of Working Solution for each standard and sample.
3. Prepare the Assay Tubes according to the table below.

	Standard Assay Tubes	User Sample Assay Tubes
Volume of Working Solution from 200 µL to add	190 µL	180–190 µL
Volume of Standard from 10 µL to add	10 µL	—
Volume of User Sample to add	—	5–20 µL
Total Volume in each Assay Tube	200 µL	200 µL

* Use only 2-mL, clear 1.5 mL PCR tubes. Acceptable tubes include Qubit™ assay tubes (set of 500, Cat. no. Q02850) or Eppendorf Eppendorf tubes (Eppendorf, part no. 04811-4200).

4. Vortex all tubes for 2–3 seconds.
5. Incubate the tubes for 2 minutes at room temperature (15 minutes for the Qubit™ protein assay).
6. Insert the tubes in the Qubit™ 2.0 Fluorometer and take readings. For detailed instructions, refer to the Qubit™ 2.0 Fluorometer manual.
7. (Optional) Using the Dilution Calculator feature of the Qubit™ 2.0 Fluorometer, determine the stock concentration of your original sample.

Life Technologies | **Qubit™ Assays**
 Molecular Biology Division
 10000 Rockville Pike, Gaithersburg, MD 20878
 © 2014 Life Technologies Corporation. All rights reserved. Qubit™ is a registered trademark of Life Technologies Corporation. Qubit™ Assays are trademarks of Life Technologies Corporation. All other trademarks are the property of their respective owners.

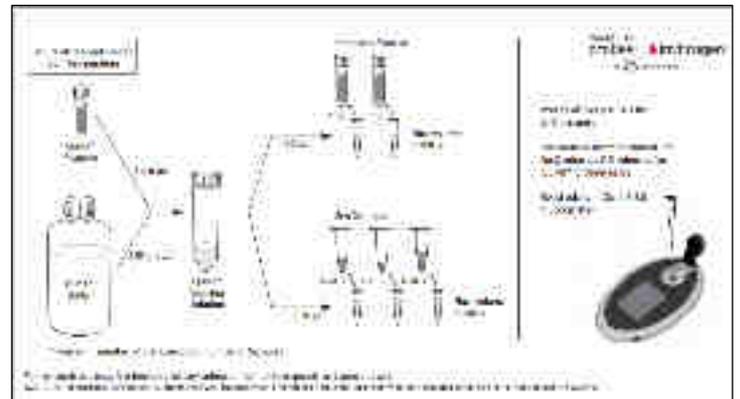


Figure 29 : Protocole de quantification (Qubit™).

II. Séquençage Sanger

A. Notion de gène candidat

A partir de l'ADN obtenu, face à un phénotype classique et caractéristique, des gènes connus sont proposés comme "candidats" et peuvent être validés par une technique de séquençage Sanger.

En cas de phénotype exceptionnel, le plus souvent chez des familles présentant des liens de consanguinité, d'autres méthodes peuvent être déployées pour identifier de nouveaux gènes. Il s'agit de la cartographie par zones d'homozygotie, du séquençage haut débit ciblé ou encore de l'analyse par « exome ». Ces moyens permettent de définir des listes de gènes candidats qui seront étudiés les uns après les autres.

B. Etapes du séquençage Sanger

1. Séquence de référence

Pour un gène donné, les séquences de référence (ADN génomique gDNA, ADN complémentaire cDNA du transcrit codant) peuvent être téléchargées sur le site Ensembl.

2. Choix des amorces

A partir des séquences de références, des oligonucléotides amorces (Forward : F et Reverse : R) sont déterminés grâce à des logiciels de design comme Primer 3. L'unicité des amorces est vérifiée dans In-Silico PCR (UCSC-Genome Browser), puis les oligonucléotides sont créés par la société Sigma®.

3. PCR (Polymérase Chain Reaction), mise au point

Des séries de mises au point par gradient de température (Eppendorf Master cycler) permettent de valider les conditions optimales d'amplification pour chaque couple d'amorces et notamment de définir la température de fusion T_m (melting temperature).

Le mélange PCR « standard » avec l'ADN à amplifier pour 60µl de mélange comprend :

- 12µl de Mix (=1X concentré final, qui comprend le tampon (Sigma®), les dNTPs (Euromedex®), qui sont les quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN, dATP, dCTP, dGTP, dTTP à la concentration de 200µM chacun et du MgCl₂ 1,5mM final (Sigma®))
- 1 unité de Taq Polymérase (Sigma®)
- 10pmol d'amorce sens, 10pmol d'amorce antisens (Sigma®)
- 1µl d'ADN à 50ng/µl
- eau stérile pour un volume total de 60µl.

4. Amplification

Les amplifications sont réalisées dans un appareil pour PCR Mastercycler® egradient S (Eppendorf®). Les étapes suivantes permettent une amplification pour la plupart des fragments :

- Dénaturation à 94°C pendant 3 min
- 35 cycles d'amplification comprenant : une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation des amorces à leur température de fusion T_m pendant 30 s, une élongation à 72°C pendant 30 s
- Extension finale à 72°C pendant 10 min.

Cependant, selon les fragments, des modifications du nombre de cycle, de la durée des étapes, de la température ou une application de gradients spécifiques (« Touch down » gradient) est possible.

5. L'électrophorèse

L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 1.5% préparé à partir d'un mélange de poudre d'Agarose (3,75g) et de tampon TBE (Tris-Borate-EDTA).

5µl de produit de PCR, mélangé à 3µl de colorant de charge sont ensuite déposés dans les puits du gel d'agarose à 1,5%.

Afin d'évaluer la taille des fragments, 5µl de marqueur de taille sont aussi déposés (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, pH=7.6, fragments d'ADN étalonnés 5mg/ml, Bleu de Bromo Phénol BBP 0.9%, xylène-cyanol 0.09%, glycérol 60%, EDTA 60mM, tampon : Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, Fermentas®).

L'électrophorèse est effectuée à 150V pendant 30min. Puis les fragments sont révélés par fluorescence.

6. Purification/suspension

Une fois l'amplification vérifiée, les produits de PCR sont purifiés grâce au système MultiScreen_{HTS} PCR 96-Well Plate (Millipore®), qui permet de séparer le produit PCR des produits utilisés lors de la réaction de PCR aspirés à travers une membrane. Les produits de PCR sont remis en suspension dans 50µl d'eau stérile puis adressés avec un aliquot des amorces sens et antisens (à 10 pmol/µl) à la société GATC Biotech (Allemagne) qui réalise le séquençage.

7. Lecture des séquences

Les séquences reviennent sous format électronique et sont analysées grâce aux logiciels SeqScape version 2.6 (Applied Biosystems®) et BioEdit version 7.0.5 qui permettent de comparer les séquences génomiques des patients aux séquences de référence des bases de données Ensembl et UCSC.

Le logiciel BioEdit v7.0.5 Analyser permet de visualiser indépendamment chaque chromatogramme et d'évaluer la qualité du signal (amplitude et étroitesse des pics correspondant à la base lue par rapport au bruit de fond).

Le logiciel SeqScape v2.6 permet de comparer par alignements multiples les séquences des patients par rapport à la séquence de référence et les séquences des patients atteints et non atteints entre eux. Cette lecture est effectuée par deux opérateurs indépendants, en double aveugle pour éliminer les défauts d'interprétation, et le séquençage est réalisé de manière bidirectionnelle (Amorce R et Amorce F).

C. Validation, ségrégation familiale

Les anomalies de séquences sont d'abord considérées comme des variations du polymorphisme. Ces variations sont vérifiées dans des populations de référence issues du site NCBI et des bases de données (Ensembl, dbSNP, 1000 genomes, EVS). Si le polymorphisme n'est pas retrouvé dans la population de contrôle, il est assimilé à une mutation. Puis la ségrégation familiale va préciser l'existence de cette mutation et sa distribution au sein de la famille.

D. Prédiction

Les séquences sont soumises à prédiction sur des sites comme NNSPLICE v0.9 (Neural Network Splice), pour déterminer l'impact pathogénique des mutations sur l'ARN, la protéine et la fonction (exemple : perte d'un site donneur d'épissage, saut d'exon...).

III. Cartographie par zones homozygotie

Dans la stratégie de recherche de nouveaux gènes, le recrutement de familles consanguines peut être intéressant et permet de mettre en évidence des zones d'homozygotie. Cette «cartographie» consiste à rechercher des régions d'homozygotie communes parmi les individus atteints et non partagées par les sujets sains. La technique repose sur l'utilisation de «puces» (ex : Human Gene Chip, 250K Affymetrix®) qui utilisent les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) comme marqueurs polymorphiques répartis le long du génome. Chaque individu possède des SNP, cependant leur fréquence de répartition est différente dans une population. De ce fait, un SNP rare est spécifique d'un individu.

Dans une famille consanguine, l'analyse des SNP communs aux individus atteints par rapport aux non atteints permet d'établir des zones où des gènes potentiellement mutés se situent. Ces régions sont alors étudiées en détail afin de déterminer des gènes candidats.

A. Les puces

Les puces utilisées dans le cadre de ce travail sont générées à la plateforme biopuces de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch, selon la technique décrite dans le protocole du fabricant (Human Mapping 500K Assay Manual, Affymetrix®). L'importante densité des marqueurs de polymorphisme SNPs permet une cartographie résolutive. La distance physique médiane entre SNPs est de 2,5kb et la distance moyenne entre deux SNPs est de 5,8kb. La puce est un support solide de taille réduite (silicium), sur laquelle une imprimante vient déposer et adapter les oligonucléotides constituant la référence. Cette référence est choisie parmi une banque de sondes (dbSNPs) issues du projet Hap Map. Chaque sonde (25 oligonucléotides) présente un SNP flanqué à chaque extrémité de 12pb. Chaque SNP est interrogé par plusieurs variants (24 à 40) de sondes constituant des quartets de sondes. Les variants constituent des « perfect match » et des « mismatch probes ». Les sondes sont réparties aléatoirement dans des sets de sondes, et la position sur la puce est connue (Probe Set ID). Un marquage par un fluorochrome (vert) est nécessaire pour la lecture [Fig. 30].

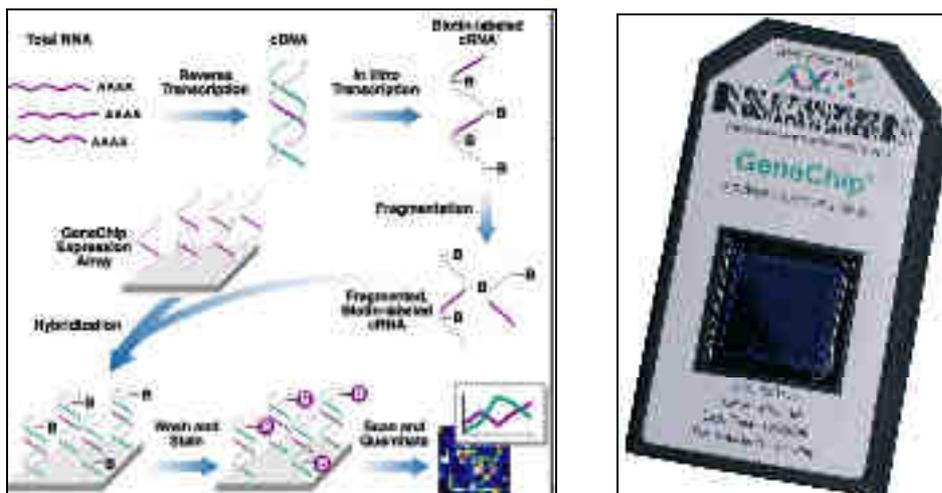


Figure 30 : Principe d'action de la puce : préparation du support, préparation de la cible, hybridation, élution, lecture par scanner, gestion de l'information (<http://www.bioinfo-fr.net>). Puce Affymetrix®.

B. Cartographie résolutive

Les résultats, rendus en version informatique, sont analysés grâce au logiciel d'interprétation Affymetrix® Genotyping Console™ 4.0. Ce logiciel indique les régions d'homozygotie ainsi que le nombre de copies des CNV (Copy Number Variation) chez un individu permettant de repérer les grandes zones d'homozygotie et les grandes régions délétées ou dupliquées [Fig. 31].

Le Call Code est une convention Affymetrix® qui définit un algorithme de codage des haplotypes normalisés en couples d'allèles AA ou AB ou BB. Ainsi lorsqu'une portion de région d'homozygotie d'un patient non atteint est chevauchante avec une portion de région d'homozygotie d'un patient

atteint, la vérification est systématiquement faite au niveau des haplotypes [Fig. 32]. Dans le cas où les haplotypes sont différents, la région n'est plus prioritaire.

En comparant les résultats des deux patients atteints par rapport aux apparentés non atteints, les régions d'homozygotie candidates sont définies.

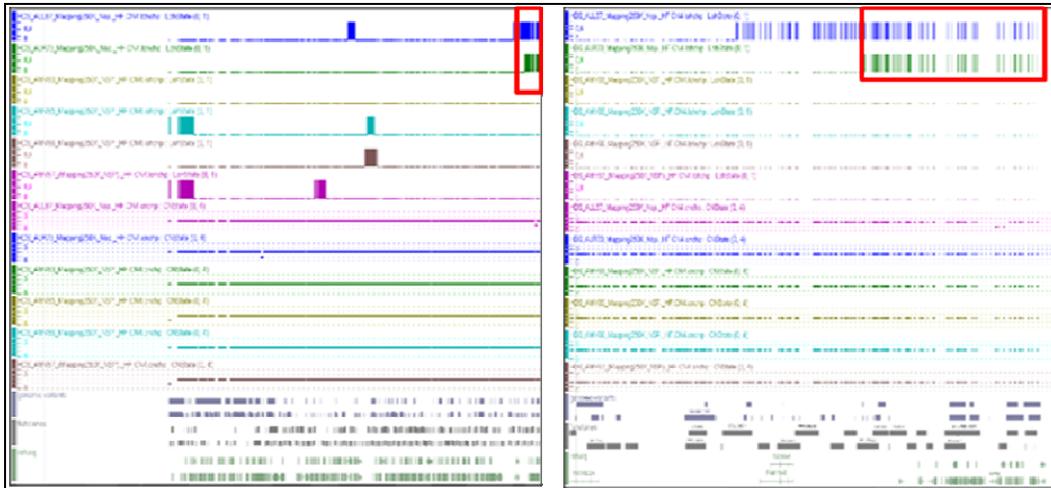


Figure 31 : exemple de résultats d'une analyse par puce d'homozygotie (logiciel GénoTyping Console 4.0TM). Les cadres rouges montrent les zones identiques pour les 2 patients atteints (2 premières lignes), et absente chez les apparentés non atteints (lignes suivantes) au niveau du chromosome 7 (à gauche) et son agrandissement (à droite).

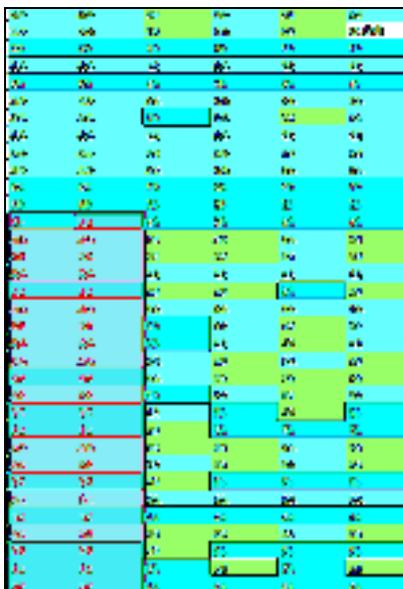


Figure 32 : exemple de résultats d'une analyse par puce d'homozygotie. Le cadre rouge montre les haplotypes identiques chez les 2 patients atteints (2 premières colonnes) et différents chez les apparentés non atteints (colonnes suivantes).

C. Sélection des gènes candidats

Pour chaque zone d'homozygotie repérée, la liste des gènes contenus dans la région est générée à partir des bases de données. Puis, par hiérarchisation, des gènes candidats sont sélectionnés. Cette classification est basée sur de nombreux critères tels que :

- L'implication dans le processus de développement de l'émail
- L'expression du gène précocement dans le développement des tissus concernés par le phénotype
- L'identité, la fonction des gènes
- Les prédictions d'interactions
- L'implication en pathologie humaine...

Ces gènes d'intérêt sont classés en utilisant une approche bibliographique et bioinformatique. Les bases de données (NCBI, UCSC, OMIM, Eurexpress/Genepaint, Ensembl, ZFIN, Unigene, PubMed, String-db) ainsi que les atlas de transcriptomes de souris sont systématiquement consultés, en particulier ceux concernant la dent [135].

D. Séquençage et analyse des séquences des gènes candidats sélectionnés

Le séquençage Sanger et l'analyse des séquences des gènes candidats sélectionnés permettent alors de valider ou d'invalider des mutations et d'avancer dans la découverte de nouveaux gènes.

IV. Séquençage nouvelle génération (NGS)

L'approche par puce d'homozygotie, développée précédemment, est également appelée "technique classique", par opposition à toutes les dernières techniques de "séquençage nouvelle génération" (NGS : "next generation sequencing") aussi nommé "High-throughput sequencing" (HTS), "massively parallel sequencing".

Ces nouvelles techniques permettent de générer des quantités énormes d'informations (téra octets) concernant un ADN donné. La difficulté est de pouvoir exploiter les résultats en analysant et interprétant ces données.

A. Analyse par "whole exome sequencing" (WES)

Le génome représente 3 milliards de bases. L'exome ("exons" du génome) correspond environ à 2% du génome, soit 60 millions de bases.

La technique d'analyse par "whole exome sequencing" repose sur le séquençage complet des exons du génome du patient et peut mettre en évidence une mutation dans un nouveau gène. Les enjeux sont un accès direct à tous les gènes simultanément avec une pénétrance complète (probabilité de trouver le phénotype en lien avec le génotype) et une détection complète (probabilité de trouver le génotype à l'origine du phénotype).

Cette analyse fait appel à la bioinformatique afin de :

1. séquencer : générer des “reads” des échantillons et évaluer la qualité des données brutes
2. aligner : reconstruire le génome de l'échantillon à partir du génome de référence. A cette étape, la profondeur de lecture est évaluée.
3. identifier de variations par rapport au génome de référence : “calling”
4. annoter : qualifier des variations par l'ajout de connaissance (mutations fonctionnelles : coding, frame-shift, splice-site, stop-loss/gain)
5. priorisation en utilisant des filtres : type transmission, pathogénie, type mutation, localisation. Cette analyse permet de réduire le nombre de gènes candidats qui seront alors analysés en technique classique.

B. Séquençage à haut débit ciblé

Un outil diagnostique de séquençage haut débit à visée diagnostique pour les principales affections bucco-dentaires a été réalisé et validé grâce à une collaboration entre le laboratoire de génétique médicale UMR_S 1112 et l'IGBMC par le Dr. M Prasad [136].

Il s'agit d'un outil qui permet de mettre en évidence des variations de séquence (mutation ou polymorphisme) de l'ADN du patient pour les gènes répertoriés sur ce panel NGS.

La liste des gènes concerne les maladies rares à expression bucco-dentaire comme les amélogénèses imparfaites, la dentinogénèse imparfaite, la dysplasie dentinaire, la dysplasie ectodermique, l'hypodontie, l'oligodontie, l'anodontie, les phénomènes de résorption, les fentes palatines, les syndromes rares à manifestations bucco-dentaires. Par ailleurs des gènes candidats ont été ajoutés. Il s'agit de gènes à expression forte dans les tissus dentaires en cours de développement chez la souris et de gènes dont des mutations ont été répertoriés chez des modèles animaux (souris, poisson-zèbre) avec des phénotypes bucco-dentaires.

Dans le cadre du projet Interreg A27 plusieurs séries d'ADN de patients ont été analysés. Parmi les 101 individus séquencés, cette technique a permis d'identifier les mutations causales pour 39 patients [136].

Pour les patients dont le diagnostic n'a pu être établi par cette méthode, des techniques de recherche de nouveaux gènes peuvent alors être mis en place.

V. Validation fonctionnelle

Lorsqu'une mutation dans un nouveau gène est découverte, sa validation passe par un argumentaire autour de l'effet de la mutation.

La validation fonctionnelle en biologie moléculaire commence par la vérification de la mutation chez le patient en technique Sanger. Puis une ségrégation familiale en technique Sanger est réalisée.

Selon le type de mutation détectée, la validation peut reposer, par exemple, sur :

- l'augmentation de la cohorte par analyse d'autres familles à phénotype similaire

- étude de l'ARN du patient (le plus souvent extrait de fibroblastes de biopsie cutanée, mais également des fibroblastes gingivaux) et PCR quantitative
- étude des effets d'une mutation sur la protéine par Western Blotting
- étude de modèles animaux (murins, zebrafish...)
- microscopie électronique de dents avulsées...

Ces différentes stratégies de recherche, permettent, lorsque toutes les conditions sont réunies, d'obtenir des résultats en termes de diagnostic, d'identification de mutations, de nouveaux gènes et d'améliorer les connaissances du développement bucco-dentaire et crânio-facial. Dans le cadre de ce projet, les différents résultats sont présentés dans la partie suivante au travers des publications d'articles scientifiques.

RESULTATS-PUBLICATIONS

Grâce à ce protocole de recherche, différentes nouvelles mutations et gènes ont pu être identifiés. Les résultats sont présentés sous la forme d'articles publiés dans les revues scientifiques.

Les deux premiers articles illustrent la technique d'approche par séquençage Sanger dans le cadre de gènes connus et considérés comme candidats par rapport à l'observation du phénotype clinique des patients et le mode de transmission. Une nouvelle mutation du gène *ROGDI* dans le cadre du syndrome de Kohlschütter-Tönz est ainsi mise en évidence dans le premier article [119] et de nouvelles mutations dans le gène *MMP20* sont rapportées dans le deuxième [89]. Le travail sur *MMP20* est complété par une analyse de la structure amélaire par microscopie électronique.

Le troisième article consiste en un travail collaboratif autour du gène *FAM20A*, pour lequel 20 mutations différentes ont été identifiées au travers d'analyses par « genome-wide linkage », « exome capture », « next-generation sequencing », et validés par Sanger, chez des patients présentant une néphrocalcinose inexplicée et des anomalies bucco-dentaires spécifiques [110]. Cette étude a permis de découvrir et valider l'implication de *FAM20A* dans le syndrome ERS. Le quatrième article concerne également le gène *FAM20A* et décrit ces caractéristiques bucco-dentaires particulières des patients porteurs de mutations dans ce gène et atteints de néphrocalcinose [111].

Enfin, le dernier article porte sur la découverte d'un nouveau gène : *LTBP3* impliqué dans l'AI associée à une brachyolmie grâce à une approche combinée par puce d'homozygotie et exome auprès de plusieurs familles [123]. Cette publication met également en avant les techniques de validation par les modèles animaux.

I. A Novel Mutation in the *ROGDI* Gene in a Patient with Kohlschütter-Tönz Syndrome [119]

Résumé

Une patiente de 13 ans d'origine malienne présentant un phénotype d'AI hypominéralisé/hypomature, un retard psycho-moteur, des troubles du comportement et des crises d'épilepsie pharmaco-résistante a été recrutée dans le cadre du projet hospitalier de recherche clinique national (2008) « étude clinique et moléculaire des Amélogenèses Imparfaites ».

La découverte récente [116] de mutations du gène *ROGDI* impliquées dans le syndrome de Kohlschütter-Tönz, associant une amélogenèse imparfaite, une épilepsie et une encéphalopathie progressive, nous a orientés vers un séquençage de ce gène.

L'ADN a été extrait à l'aide du kit Oragene-DNA à partir de prélèvements salivaires. Les différents exons ont été séquencés par technique Sanger. L'analyse bidirectionnelle des séquences obtenues a montré la présence d'une mutation dans le gène *ROGDI* c.117+1G>T à l'état homozygote chez la patiente atteinte. Le père et la mère étant hétérozygotes (G/T), la ségrégation familiale a été validée.

L'ARN de la patiente a été extrait à partir d'une biopsie gingivale. La RT-PCR a mis en évidence la perte du site donneur d'épissage de l'intron 2, la délétion de l'exon 2 et l'assemblage en phase de l'exon 3. L'exon 2 code pour une région riche en Leucines, très importante pour la fonction de la protéine *ROGDI* et particulièrement conservée dans l'évolution des espèces. Rappelons qu'un domaine Leucine Zipper ou "glissière à leucine" est une structure tridimensionnelle constituée de deux hélices alpha enroulées en hélice l'une à l'autre grâce à des résidus leucine. Cet agencement sert de domaine de liaison à l'ADN et intervient surtout au niveau des facteurs de transcription.

La découverte de cette nouvelle mutation a permis de confirmer le diagnostic de syndrome de Kohlschütter-Tönz pour cette patiente et donne des perspectives de recherche dans le domaine de l'odontogenèse et du développement du cerveau [23, 24, 28, 116-118, 120, 135, 137-147].

A Novel Mutation in the *ROGD1* Gene in a Patient with Kohlschütter-Tönz Syndrome

Mathilde Huckert^{a,c} Helen Mecill^d Virginie Laugel-Haushalter^h
Corinne Stoetzel^c Jean Muller^{a,f,h} Elisabeth Flori^d Vincent Laugel^d
Marie-Cécile Manière^{a,b} Héléne Dollfus^c Agnès Bloch-Zupan^{a,b,h}

^aFaculty of Dentistry, University of Strasbourg (UdS), ^bReference Center for Orofacial Manifestations of Rare Diseases, Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-dentaires, Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), ^cLaboratoire de Génétique Médicale, INSERM UMR_51112, Strasbourg Medical School, UdS, ^dCentre de Référence des Maladies Neuromusculaires d'Origine Génétique de l'Enfant et l'Adulte, Hôpital de Hautepière, HUS, ^eLaboratoire de Diagnostic Génétique, HUS, ^fCube-UMR 7317, UdS, CNRS, LBG, and ^gLaboratoire de Cytogénétique, Cytologie et Histologie Quantitative, Hôpital de Hautepière, HUS, Strasbourg, and ^hInstitut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), UMR 7104 and INSERM U964, UdS, Illkirch, France

Key Words

Amelogenesis imperfecta · Epilepsy · Kohlschütter-Tönz syndrome · Leucine zipper domain · Mutations · *ROGD1*

Abstract

Kohlschütter-Tönz Syndrome (KTZS) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the *ROGD1* gene. This syndrome is characterized by epilepsy, psychomotor regression and amelogenesis imperfecta. In this paper, we report a case of a 13-year-old Malian girl presenting with this rare disease. By genetic analysis, we identified a novel *ROGD1* homozygous mutation NM_024589.1: c.117+1G>T [Chr16 (GRCh37): g.4852382C>A] which confirmed the diagnosis of Kohlschütter-Tönz syndrome. The mutation abolishes the usual splice donor site of intron 2 which leads to the deletion of exon 2 and in-frame assembly of exon 3. Exon 2 encodes a highly conserved leucine-rich region that is essential for *ROGD1* protein function. Hence, this deletion may affect the function of the *ROGD1* protein. © 2014 S. Karger AG, Basel

Kohlschütter-Tönz syndrome (KTZS, OMIM 226750) is a rare autosomal recessive syndrome characterized by epilepsy, psychomotor regression and amelogenesis imperfecta (AI) due to mutations in the *ROGD1* gene in 16p13.3 [Mory et al., 2012; Schossig et al., 2012a].

AI is a heterogeneous group of developmental diseases that affect the formation, structure and clinical appearance of enamel. AI can be classified into different subtypes (hypoplastic, hypomineralized, and hypomature) based on the nature of the enamel defect. The prevalence of AI varies from 1/700 to 1/11,000, and it can be inherited in an autosomal dominant, autosomal recessive or X-linked manner [Aldred et al., 2003; Crawford et al., 2007; Bloch-Zupan et al., 2012; Gadhia et al., 2012]. AI can present as an isolated disease or coexist with other abnormalities and symptoms as part of syndromic disorders such as KTZS.

Since the first case of KTZS reported in 1974 [Kohlschütter et al., 1974], around 20 cases have been published so far delineating a similar phenotype. Several

KARGER

© 2014 S. Karger AG, Basel
1661-4076/14/050293-06\$39.00/0

E-Mail: karger@karger.com
www.karger.com/tszr

Mathilde Huckert
Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM UMR 51112
Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, 11 rue Humann
F67078 Strasbourg Cedex (France)
E-Mail: mhuckert@unistra.fr

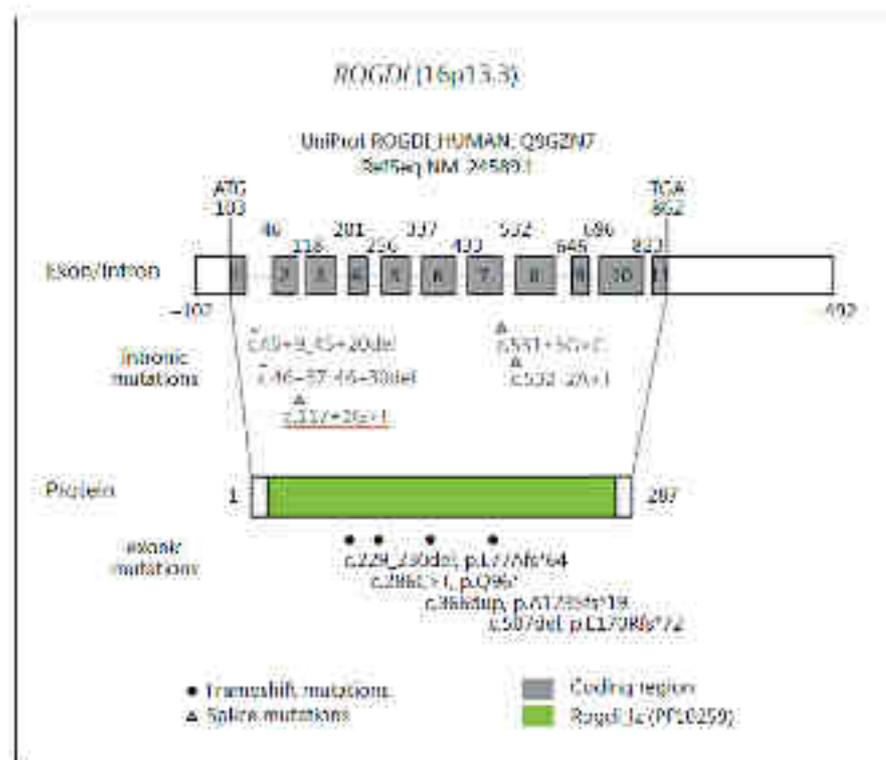


Fig. 1. *ROGDI* exonic map. Locations of the different mutations described in the literature are shown. The new mutation c.117+1G>T is underlined in red.

mutations in the *ROGDI* gene were described since 2012 in European KTZS patients (fig. 1) [Mory et al., 2012, 2014; Schossig et al., 2012a, b; Tucci et al., 2013].

We report the case of a 13-year-old girl, the third child of consanguineous parents from Mali, who presented with hypomineralized/hypomature AI, psychomotor delay and pharmaco-resistant epilepsy. Due to the similarity of this phenotype with KTZS, we investigated the *ROGDI* gene for potential mutations by Sanger sequencing.

Case Report

The girl and her parents were recruited and examined clinically by dentists at the Reference Center for Orofacial Manifestations of Rare Diseases at the Strasbourg University Hospital. The family consented to participate in the French Ministry National Program for Clinical Research, PHRC 2008 ILLIS No. 4266 "Amelogenesis imperfecta: clinical and molecular study" (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01746121) and in the Interreg/Offensive Sciences A27 projects. Personal and clinical data were entered into D[4]/Phenodent, a dental defects diagnostic database (www.phenodent.org).

The patient was born at term by emergency caesarian section due to pregnancy-induced hypertension. Weight at birth was 3.1 kg at 39 weeks and 3 days of amenorrhea (25th percentile of birth). She required resuscitation at birth due to meconium aspiration

(Apgars 3, 8 and 10), and was transferred to the special care unit where she received oxygen and antibiotics for 24 h before being moved to the transitional care ward.

She presented with seizures starting in her 3rd week of life and manifested by hypotonia, peribuccal cyanosis, and eye rolling. At 1 month she underwent surgery for a strangulated inguinal hernia. Shortly after discharge, she presented to the emergency room with an episode of loss of consciousness, which was attributed to gastro-esophageal reflux. Two further events followed at 4 and 5 months; her parents described several additional episodes in which she became hypotonic and unresponsive with signs of central cyanosis. All episodes lasted less than 10 min.

At 1 year of age, after presenting with a clear right-sided partial seizure, she was started on carbamazepine and clonazepam, and the working diagnosis of seizures secondary to suspected hypoxic ischemic encephalopathy was made. The seizures continued despite the use of multiple anti-convulsive agents (topiramate, phenobarbital and vigabatrin) as well as a trial of a ketogenic diet. Physical examination was essentially normal and she continued to grow well along her centile lines. Developmental milestones were delayed: she learned to walk unaided at 19 months and spoke her first words at 3 years.

By 6 years of age, the seizures were occurring on a daily basis, often worse at night and predominantly involving right-sided clonic movements. There was severe developmental delay, with a global functional level of an 18-month-old. There were marked right-sided neglect, staccato gait and dysmorphic features with frontal bossing, thickened protruding lower lip and genital hypoplasia

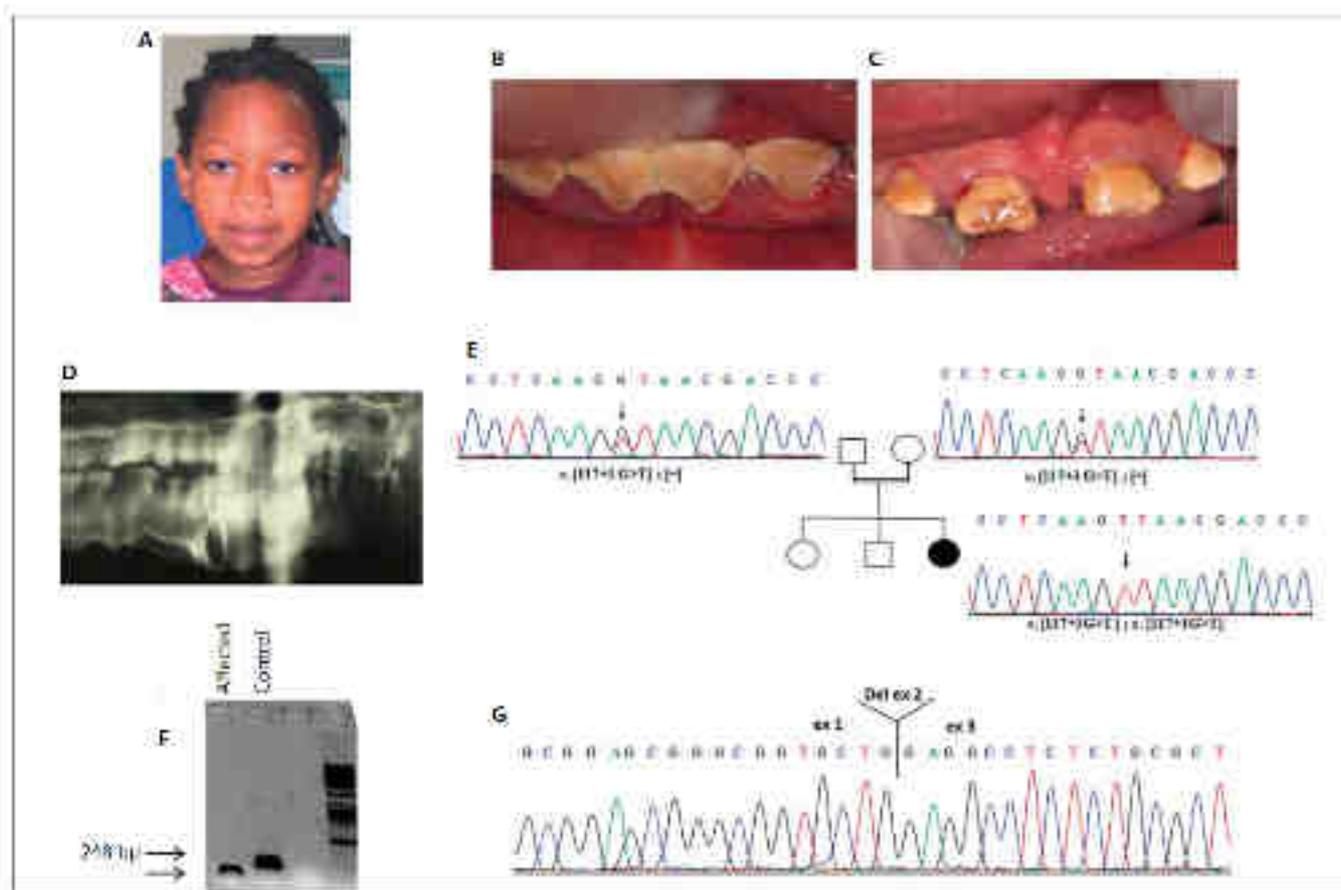


Fig. 2. Phenotype of the affected patient, familial segregation of the mutation and RT-PCR. **A** Facial photograph of the patient. **B** Intraoral view of mandibular incisors. **C** Intraoral view of maxillary incisors. **D** Panoramic radiograph showing hypomineralized/hypoplastic AI. The enamel is rough, colored, prone to disintegration, and retains oral biofilm. There is no contrast between dentin and enamel on the radiograph. The poor quality of the panoramic radiograph is due to the behavioral difficulties of the patient, which prevent her from remaining still during the radiographic acquisition procedure. **E** Identification of a new homozygous mutation c.117+1G>T in the *ROGD1* gene. The affected proband is homozygous with a 100% peak. The parents are heterozygous with two 50% peaks. [-] = normal allele. **F** RT-PCR validation of the biological effect of the mutation. The mutation causes the deletion of exon 2. The amplicon is smaller in the affected patient compared to the control (248 bp). **G** Sequence of cDNA from the patient confirms the absence of exon 2.

(Fig. 2A). Head circumference was normal between the 50th and the 75th percentile. Language was limited to less than 5 words and she exhibited aggressive and impulsive behavior.

The orodental phenotype assessed through oral clinical and radiographic (panoramic radiograph) examinations revealed no abnormalities of tooth number or size, but abnormalities of enamel affecting the primary and permanent dentition were noted (Fig. 2B–D). The primary teeth presented severe enamel dysplasia with eruption delay. At 5 years of age, a diagnosis of hypomineralized/hypoplastic AI was proposed. The enamel of the permanent tooth was rough, colored and retained oral biofilm. Because of her medical and behavioral handicap, dental treatments had to be performed under general anesthesia in 2006, 2007, 2009, and 2012.

tion procedure. **E** Identification of a new homozygous mutation c.117+1G>T in the *ROGD1* gene. The affected proband is homozygous with a 100% peak. The parents are heterozygous with two 50% peaks. [-] = normal allele. **F** RT-PCR validation of the biological effect of the mutation. The mutation causes the deletion of exon 2. The amplicon is smaller in the affected patient compared to the control (248 bp). **G** Sequence of cDNA from the patient confirms the absence of exon 2.

Materials and Methods

DNA Sequencing and Mutation Screening

Saliva samples were collected using the OG-250 Oragene® DNA kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, Ont., Canada). Genomic DNA was extracted from saliva according to standard protocols using the prepIT-L2P Oragene® DNA kit (DNA Genotek Inc.). Coding exons and flanking intronic regions of *ROGD1* were PCR amplified from 50 ng of genomic DNA (online suppl. table 1, see www.karger.com/doi/10.1159/000366252). Bidirectional sequencing of the purified PCR products was performed by GATC Biotech (Applied Biosystems ABI 3730xl⁹⁹, Konstanz, Germany). Sequences were aligned and compared with reference sequences using the (SeqScape) software v.2.6.

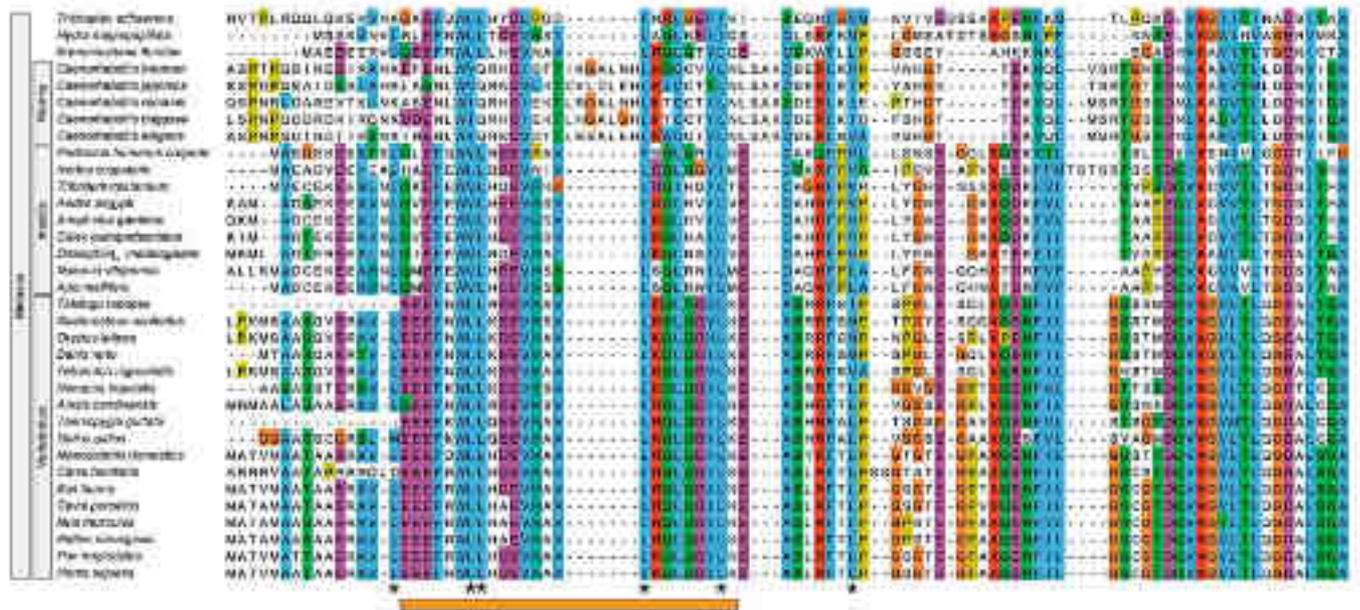


Fig. 3. Multiple sequence alignment. The multiple sequence alignment of the ROGDI protein family amongst metazoans (see Materials and Methods) is shown here. The alignment is displayed using Jalview and colored according to the 'ClustalX' coloring scheme. The proteins are sorted from human to early metazoans

from bottom to top, starting from position 1 to position 85 in the human sequence. The 24-aa deletion from position Glu16 to Arg39 is represented by the orange bar. Possible leucines compatible with the Rogdi_L2 domain are marked by asterisks.

Sequencing and Mutation Analysis

The Alamut software v.2.2 (Interactive BioSoftware, Rancn, France) was used to collect the analysis of 3 programs used to assess the effect of potential splice variants (Human Splicing Finder, MaxEntScan, NNSplice) [Reese et al., 1997; Yeo and Burge, 2004; Desmet et al., 2009], dbSNP (build 137, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) [NCBI Resource Coordinators, 2013] and the Exome Variant Server (NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, Wash., USA; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, March 2013) databases were used to test whether the identified variant was a known variant or polymorphism. The PFAM [Punta et al., 2012] database was used to search for protein domain organization and the eggNOG [Powell et al., 2012] database was used to retrieve the sequences of ROGDI orthologs in eukaryotic species (KOG3992). The multiple sequence alignment was extracted from the pre-computed alignments available in eggNOG and further manually refined.

Reverse Transcriptase-PCR and Sequencing Analysis of ROGDI Transcripts

RNA was extracted from fibroblasts of the affected patient (cutaneous biopsy) and 3 unrelated controls by using a RiboPure™ Kit, followed by DNase treatment with the TURBO DNA-free™ Kit (Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA). RNA integrity was assessed by gel electrophoresis and RNA concentration by Eppendorf Biophotometer Plus™ with the Hellma® Tray,cell™ (Eppendorf, Hamburg, Germany). Reverse transcription of 1 µg total RNA to cDNA was performed using the iScript™ cDNA Synthesis

Kit (BioRad, Hercules, Calif., USA). RT-PCR was performed to determine the exon content of the cDNA from the patient. PCR primers specific for exons 1–3 were designed to amplify the anticipated altered splice site junction (online suppl. table 1). ROGDI cDNA was also partially sequenced to determine the consequence of the genomic mutation on RNA splicing.

Results

Bidirectional sequencing analysis of ROGDI identified a homozygous mutation c.117+1G>T in the second intron in the proband. This mutation causes a transversion in the canonical splice donor site of intron 2. Segregation analysis validated that each unaffected parent was heterozygous for this mutation (fig. 2E). The mutation was absent from dbSNP and the Exome Variant Server.

The effect of the mutation on the splice site was assessed using 3 different splice site mutation prediction programs (see Materials and Methods). As expected, all programs predicted the destruction of the donor site. The expected consequences were the skipping of exon 2 and an in-frame assembly of exon 3. The resulting protein is expected to be shorter by 24 amino acids (aa) from posi-

tion Glu16 to Arg39. Thanks to the PfAM database, the protein could be annotated as containing a leucine zipper domain spanning from position 18 to 277 (domain Rogdi_1; PF10259). Analysis of the multiple sequence alignment of the protein members of the ROGDI family extracted from eggNOG revealed that the 24-aa deletion was localized in one of the regions containing a pattern of leucines organized like in leucine zipper domains, which could then affect the function of the protein (fig. 3).

To validate the biological effect of this mutation, we performed RT-PCR analysis and sequencing of the *ROGDI* cDNA from the proband and unrelated controls. RT-PCR analysis confirmed the absence of exon 2 in the affected patient with a shorter fragment, whereas the control samples yielded a PCR fragment of the expected size (248 bp) (fig. 2F). Sequencing of the RT-PCR products further confirmed the absence of exon 2 in the proband's cDNA and the in-frame assembly of exon 3 (fig. 3G).

Discussion

The *ROGDI* gene located on chromosome 16 is composed of 11 coding exons. The encoded protein is 287 aa long and is annotated as a leucine zipper domain containing protein (UniProt AC: Q9GZM7). We report a novel mutation c.117+1G>T that abrogates the donor splice site in intron 2 and causes the deletion of exon 2 (72 bp) resulting in a shorter protein (24 aa less). This is the first report of a mutation in *ROGDI* in a sub-Saharan African patient. Our discovery adds to the list of mutations previously identified in this gene in patients with KTZS. Other mutations described in the literature (fig. 1) include deletions, duplications, splicing, and frameshift mutations and are scattered in exons 4–7 and introns 1 and 7 [Schossig et al., 2012a; Mory et al., 2012; Tucci et al., 2013].

The function of *ROGDI* is yet unknown; however, the protein is present in metazoan species ranging from worms to humans and is highly conserved, suggesting an important functional role (fig. 3).

The loss of 24 aa in the mutant protein likely affects protein function. Indeed, exon 2 contains several highly conserved leucine residues which may contribute to dimerization and DNA binding.

Rare diseases that manifest with neurological symptoms and various dental anomalies have been previously recognized [Bloch-Zupan, 2007]. For example, tuberous sclerosis (OMIM 191100) and Sjögren-Larsson syndrome (OMIM 270200) combine epilepsy and enamel defects

among many other features. The function of the *ROGDI* protein and the link between the dental and brain phenotypes observed in the presence of *ROGDI* mutations is yet to be understood. Also known as *Izf*, *C76152*, *AL020118* and *0610011C19Rik*, *ROGDI* is transcribed during mouse and human brain development [Jensen et al., 2004]. *Rogdi* is also expressed in the cap stage of odontogenesis in E14.5 mouse embryos [Langel-Haushalter et al., 2013]. This suggests that *ROGDI* is present during and may play a role in brain formation and homeostasis as well as in odontogenesis.

Careful examination of the oral cavity may provide invaluable information for the diagnosis of rare diseases. It facilitated the diagnosis of KTZS in this patient and family, who waited 13 years for a confirmed clinical and molecular diagnosis. Collaborative efforts between reference centers for rare diseases and multidisciplinary health care centers are indispensable for providing an integrative approach to the diagnosis and treatment of patient pathologies. Further research on the role of *ROGDI* during brain and tooth development as well as its epilepsy and AI is necessary and may allow the discovery of new treatments for KTZS.

Acknowledgement

We thank the involved family for their participation and contribution. The authors thank Megana Prasad for her careful review of the manuscript. This work was supported by a grant from the University of Strasbourg, the French Ministry of Health (National Program for Clinical Research, PHRC 2008 No. 4266, 'Amelogenesis imperfecta'), the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (APL 2009–2012, 'Development of the oral cavity: from gene to clinical phenotype in human'), IFR3 (Institut Français pour la Recherche Odontologique) and EU-funded (ERDF) INTERREG IV/Offensive Sciences Project A27 'Oral dental manifestations of rare diseases'.

References

- ▶ Akhred M, Sazvarayan R, Crawford PJ: Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Dis* 9:19–23 (2003).
- ▶ Bloch-Zupan A: When neuropediatrics meets odontology. *Neuropediatrics* 39:27–28 (2007).
- ▶ Bloch-Zupan A, Sedano H, Scully C: *Dento/Oral/Craniofacial Anomalies and Genetics*, ed 1 (Elsevier, London 2012).
- ▶ Crawford PJ, Akhred M, Bloch-Zupan A: Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2:17 (2007).
- ▶ Demet FO, Hamzoum D, Lalande M, Collot-Beroud G, Claustres M, Beroud C: Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37:e67 (2009).

- ▶ Gadina K, McDonald S, Arkutu N, Malik K: *Amniogenesis imperfecta: an introduction*. *Br Dent J* 212:377-379 (2012).
- ▶ Jensen P, Magdaleno S, Lahman KM, Rice DS, Lavallee FR, et al: A neurogenetics approach to gene expression analysis in the developing brain. *Brain Res Mol Brain Res* 132:116-127 (2004).
- ▶ Kohlschütter A, Chiappini D, Meier C, Tonn G, Vassella E, Herschowitz N: Familial epilepsy and yellow teeth: a disease of the CNS associated with enamel hypoplasia. *Haiv Paediatr Acta* 39:283-294 (1974).
- ▶ Langel-Hausfalser V, Paschke M, Ullrich-Carpentier C, Dembele D, Dollé P, Bloch Zupan A: Malaria and malaria: show your microarray IDs. *BMC Res Notes* 6:113 (2013).
- ▶ Morry A, Dagan E, Ill B, Duquesnoy P, Mordechai S, et al: A nonsense mutation in the human homolog of *Drosophila resp1* causes Kohlschütter-Tanz syndrome. *Am J Hum Genet* 90:708-714 (2012).
- ▶ Morry A, Dagan E, Shafir I, Mandel B, Ill B, et al: Kohlschütter-Tanz syndrome: clinical and genetic insights gained from 16 cases deriving from a close knit village in northern Israel. *Pediatr Neurol* 50:121-126 (2014).
- ▶ NCBI Resource Coordinators: Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 41(Database issue):D20 (2013).
- ▶ Powell S, Sekharzyk D, Trachana K, Roth A, Kuhn M, et al: eggNOG v5.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranks. *Nucleic Acids Res* 40(Database issue):D284-D289 (2012).
- ▶ Punta M, Cogoli P, Eberhardt RY, Murray J, Lopez I, et al: The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 40(Database Issue):D290-D301 (2012).
- ▶ Raetz MC, Fechtman FH, Kulp D, Hawley D: Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 4:311-323 (1997).
- ▶ Schossig A, Wolf NI, Fischer C, Fischer M, Stocker G, et al: Mutations in *ROGDI* cause Kohlschütter Tanz syndrome. *Am J Hum Genet* 90:701-707 (2012a).
- ▶ Schossig A, Wolf NI, Kapfner I, Kohlschütter A, Zschecke J: Epileptic encephalopathy and amniogenesis imperfecta: Kohlschütter-Tanz syndrome. *Eur J Med Genet* 55:319-322 (2012b).
- ▶ Tuzel A, Kara E, Schossig A, Wolf NI, Bagnol V, et al: Kohlschütter Tanz syndrome: mutations in *ROGDI* and evidence of genetic heterogeneity. *Hum Mutat* 34:296-300 (2013).
- ▶ Yeo G, Burge CB: Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11:377-394 (2004).

Exon 1-2	1F	CGAGCAAGCCTGACTCGT	677 pb
	2R	GCCCGCACACAGGTACTTAT	
Exon 3-4	3F	GGCTTCTGGAAGGAGCACTG	482 pb
	4R	CAGAGTCGCAGGGCTTGAC	
Exon 5	5F	GGGAGACCCTCTGCCCTAT	363 pb
	5R	CCCAGCTTTGCTGTTAGGAA	
Exon 6	6F	GTGGAGAGTGGAATGACGTG	300 pb
	6R	AGGTTGCACAGCTCAACGTG	
Exon 7	7F	GAGTGGGAGCTACCATGTCTG	286 pb
	7R	TCCACCTATAATCTGGGAGTGG	
Exon 8-11	8F	CACCTGGGAAAAGTCTGGAA	996 pb
	11R	GGGGTGGGATAGGGAGATAA	

Amorces F et R utilisée pour le séquençage Sanger du gène *ROGDI* dans cette étude.

II. Homozygous and compound heterozygous *MMP20* mutations in amelogenesis imperfecta [89]

Résumé

Cet article décrit 2 nouvelles mutations (dans 2 familles distinctes) du gène *MMP20* (Matrix metalloproteinase 20) dans le cadre d'AI hypomatures à transmission autosomique récessive.

Une mutation faux-sens p.T130I à l'état homozygote a été mise en évidence, ainsi qu'un hétérozygote composite associant le même faux-sens à une délétion entraînant un codon stop prématuré (p. N120fz*2).

La structure amélaire a été explorée par microscopie électronique et microanalyse (spectroscopie dispersive à rayons X, EDX, energy dispersive X-ray spectrometry). Les résultats confirment le diagnostic d'AI hypomature : le contenu minéralisé est légèrement diminué, et le calcium amélaire est substitué par du magnésium dans la structure du cristal.

Ces anomalies décrites suggèrent un nouveau rôle possible pour *MMP20* dans la formation d'émail [23, 25, 43, 58, 86-88, 90-93, 138, 148-161].

B. Gosse¹, E. Karayigit^{2,8}, E. Marhieu³,
S. Jung⁴, A. Garret⁵, M. Huckert^{6,7},
S. Morkmued^{1,6}, C. Schneider^{2,5},
L. Vidal⁹, J. Hemmerlé⁵, J.-Y. Sire¹,
and A. Bloch-Zupan^{2,4,8*}

¹Research group Evolution & Développement de Squames-776, UMR 7118-SAL, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; ²Reference Center for Orogenic Mineralization of the Biosphere, PSL de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaire, Université de Strasbourg (U2S), Hôtel Dieu, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg Cedex, France; ³INSERM U1221, "Immunité et Hématopoïèse", Université de Strasbourg, France; ⁴University of Limoges, University of Strasbourg, France; ⁵Université de Haute Alsace, Institut de Sciences Médicales de Mulhouse (ISM), 53068 L'IMM 7101, Mulhouse, France; ⁶Faculty of Dentistry, University of Köln, Köln, Institut Laboratory de Génétique Médicale, INSERM U1111, F-50909, Molsheim, Université de Strasbourg, France; and ⁷Unité de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (GEMC), INSERM U1054, CNRS-Université de Strasbourg UMR104, Illkirch, France. *Corresponding author; amz@unistra.fr

J Dent Res 92(7):598-605, 2013

ABSTRACT

In this article, we focus on hypomineralization autosomal-recessive-type amelogenesis imperfecta (type IIA2) and describe 3 new causal Matrix metalloproteinase 20 (*MMP20*) mutations validated in two unrelated families: a missense mutation (p.T130I) at the expected heterozygous state, and a compound heterozygous mutation having the same mutation combined with a nucleotide deletion, leading to a premature stop codon (p.N1206*2). We characterized the enamel structure of the latter case using scanning electron microscopy analysis and microanalysis (Energy-dispersive X-ray Spectroscopy, EDX) and confirmed the hypomineralization-type amelogenesis imperfecta as identified in the clinical diagnosis. The mineralized content was slightly decreased, with collagenase substituting for calcium in the crystal structure. The anomalies affected enamel with minimal outer-tooth enamel present and igneous crystals perpendicular to the enamel prisms, suggesting a possible new role for *MMP20* in enamel formation.

KEY WORDS: rare disease, dental anomalies, enamel, human, gene, scanning electron microscopy

DOI: 10.1177/0022034513508392

Received November 5, 2012; Last revision: April 8, 2013; Accepted April 9, 2013

A supplemental appendix to this article is published electronically only at <http://jdr.sagepub.com/journal>.

© International & American Associations for Dental Research

Homozygous and Compound Heterozygous *MMP20* Mutations in Amelogenesis Imperfecta

INTRODUCTION

Amelogenesis imperfecta (AI) consists of a heterogeneous group of rare genetic diseases that affect the formation/mineralization of tooth enamel and are transmitted according to various modes of inheritance (X-linked, autosomal-dominant, autosomal-recessive) (Crawford *et al.*, 2007). These disorders exist either in isolation, with clinical manifestations limited to the oral cavity, or associated with other symptoms in syndromes. Mutations occur in many genes coding for either enamel matrix proteins (EMPs), enamel-matrix-degrading proteins, or proteins involved in hydroxyapatite formation and growth and mineralization and have been identified as being responsible for the clinical phenotypes (hypoplastic, hypomineralization, or hypominuration) of AI (Bloch-Zupan *et al.*, 2012).

The matrix metalloproteinase 20 (*MMP20*) gene codes for the developing-tooth-specific proteinase enamelysin (Kawasaki and Suzuki, 2011; Meredith *et al.*, 2011) that degrades the EMPs, amelogenin and ameloblastin, during the secretory stage of enamel formation (Yurtakouhi *et al.*, 2011). Enamelysin plays an important role in tooth enamel formation (Simmer and Hu, 2002), by promoting and controlling mineralization (Skokovic *et al.*, 2011) through the replacement of the organic matrix with mineral crystals, and generating a hypermineralized enamel layer. *MMP20* regulates crystal elongation, normal architecture of the dentin-enamel junction, and the organization and maintenance of enamel rods (Lu *et al.*, 2008). *MMP20* is expressed during enamel development in both ameloblasts (Cacace *et al.*, 2000) and odontoblasts (Bartlett *et al.*, 1998; Bégue-Kim *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2002). Its expression is initiated prior to the onset of dentin mineralization and continues throughout the secretory stage of amelogenesis (Simmer and Hu, 2002).

Mutations in *MMP20* (11q23.3-q23) cause the autosomal-recessive hypominuration type of AI—type IIA2, A12A2, OMIM 612529 (Kim *et al.*, 2005)—which is characterized by a hypomineralized, mottled grayish-brown discoloration appearance of the enamel, which has a rougher surface and is duller and less reflective than normal but has normal thickness, leading to crowns of normal sizes and shapes. The enamel is slightly soft and detaches

Table. MMP20 Mutations Associated with Amelogenesis Imperfecta

Mutation	Location	Mode of Inheritance	References
p.T136>M; c.1029>G; p.W34X	exon 1	AR	Papapanakis <i>et al.</i> , 2006 Choi <i>et al.</i> , 2011
p.R506delA; c.159delA; p.N120fs*2	exon 2	AR	Present study
p.L344A>V; c.389>T; p.T130I	exon 3	AR	Present study
p.L539I; c.611A>G; p.H204R	exon 4	AR	Wang <i>et al.</i> , 2013
p.T675G>A; c.678T>A; p.H226G	exon 5	AR	Orskov <i>et al.</i> , 2009 Wright <i>et al.</i> , 2011
p.L755G>A; c.910G>A; p.A394T	exon 6	AR	Lee <i>et al.</i> , 2010
p.D374A>T; c.954G>T; p.I319Ffs*19	intron 6	AR	Kim <i>et al.</i> , 2005, 2006 Wright <i>et al.</i> , 2011

The nomenclature follows <http://www.hgvs.org/mutnomen/>, and the RefSeqs of Gene/mRNA/protein = www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/NG_012151.1/NM_004771.3/NC_004762.2. AR: autosomal recessive.

easily from the dentin. Radiographs show a lack of contrast between enamel and dentin (Wirkop, 1988; Crawford *et al.*, 2007; Bloch-Zupan *et al.*, 2012). The prevalence of this specific form of AI is not known.

In this article, we focus on the hypomineralized autosomal-recessive type of AI and describe 2 new causal *MMP20* mutations, which have been validated in 2 unrelated families. Five *MMP20* mutations associated with AI have been reported in the literature (Table), but for the first time a compound heterozygous mutation was identified and the resultant AI enamel ultrastructure described.

MATERIALS & METHODS

Patients

The patients and their families were recruited from the pool of patients participating in the French Ministry of Health National Program for Clinical Research (PIRC 2008 IUS (Strasbourg University Hospital) N°4266: Amelogenesis Imperfecta). For our study, we selected two patients from two unrelated cases with clinical diagnoses matching the possible underlying *MMP20* mutations. Affected and unaffected family members gave informed consent. All clinical and molecular studies were approved by the Local Ethics Committee of the Strasbourg University Hospital. Patients were examined clinically by dentists in the Reference Center for Orofacial Manifestations of Rare Diseases, Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France. The dental phenotypes were documented using the D[4]phenodent registry, a Diagnosing Dental Defects Database (see www.phenodent.org, to access assessment form). This registry allows for the standardization of data collection and assists in orofacial phenotyping. It also facilitates providing clinical care to patients, a basis for genotype/orofacial phenotype correlations, and sharing of data and clinical material between/among clinicians.

Mutation Analysis

Genomic DNA was isolated from the saliva of patients and unaffected family members by means of the Oragene® DNA (OX1-250)

saliva kit (DNA Genotek Inc., Ontario, Canada) following the manufacturer's protocol. *MMP20* genomic and transcript reference sequences NG_012151.1 and NM_004771.3, respectively, were used to design the primers (Appendix Table 1). Mutation analysis was performed for the 10 exons of *MMP20*, including exon-intron boundaries (see Appendix Table 1 for detailed process). PCR products were sent to GATC Biotech for purification and sequencing in both directions, to minimize sequencing artifacts. The sequences were aligned manually with the reference sequence NG_012151.1 using Seq-Align 2.0.0.11 software.

Comparative Material

The *MMP20* sequences of 36 species, representative of mammalian lineages, were extracted from GenBank (Appendix Table 2), translated into protein sequences, and aligned with the human *MMP20* sequence to localize sensitive positions, *i.e.*, residues which have been unchanged during 200 million years of mammalian evolution.

Specimen Preparation

The first primary right upper molar tooth (FDI World Dental Federation notation #54) of patient 2, as well as an identical control primary tooth (#54), were available for the comparative study of enamel-AI/control ultrastructure. The control tooth was obtained from a donor patient of the same age and gender as patient 2, attending the pediatric dentistry department of the Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), for treatment.

After extraction, the teeth were rinsed with tap water and immersed in a sodium hypochlorite solution (1.2 chlorometric degree) for 24 hrs. After being rinsed with distilled water, the tooth was dehydrated in a graded series of ethanol, transferred in a solution of propylene oxide/epoxy resin (xy) for 24 hrs, then embedded in Epon 812 (Epon/Araldite, Strahlwerkzeuge, France). The tooth was sectioned into 2 halves along its vertical axis by means of a water-cooled circular diamond saw (Bronwill Scientific, Rochester, NY, USA), and both surfaces were polished with diamond paste (Buhl, Chassigny, France). The 2 halves were then left to dry at room temperature.



Figure 1. Clinical phenotypes associated with the 2 new MMP20 mutations. (A-C) Patient 1: (A) 5 years old; (B) 8 years old; (C) panoramic radiograph (8 years old). (A) In the primary dentition, the enamel is opaque and chalky white, and some post-eruptive enamel breakdown is visible on the incisal edges of primary upper incisors and on the occlusal surfaces of primary molars. (B) The morphology of the newly erupted permanent upper incisors is normal, but enamel defects are visible. The enamel has an opaque and craggy appearance, and some isolated enamel pits are visible on the vestibular surface of I1. (C) On the panoramic radiograph, tooth germs show a normal morphology; the enamel is indeed present but shows limited contrast when compared with dentin, underlying its undermineralized status. (D-H) Patient 2: (D) 6 years old; (E) 9 years old; (F) 10 years old; (G) 14 years old; (H) 11 years old. (D) The appearance of the enamel on the permanent teeth is similar to that observed in patient 1. (E) The structural defect involves the whole enamel layer and is still visible when the surface of enamel is removed to prepare the tooth for composite veneers. (F, G) Newly erupted teeth have a normal morphology and appear orange. The enamel is rather rough. (H) No contrast is visible between enamel and dentin on the panoramic radiograph. A globular aspect of the crowns and a cervical constriction are present. The first permanent molar appear taurodontic.

Scanning Electron Microscopy

The samples were coated with gold-palladium alloy by means of a JED-2300 sputtering device (Anatoly Technics, Union City, CA, USA). Scanning electron microscopy assessments and microanalysis (Energy-dispersive x-ray) were performed with a Quanta 400 ESEM (FEI company, Eindhoven, The Netherlands) operating with an electron accelerating voltage of 30 kV.

RESULTS

Clinical Phenotype

Patient 1

This female patient is the third child born from consanguineous first-cousin parents. One previous miscarriage was reported. Two male children died early in life, presenting with multiple malformations and brain anomalies. *In utero*, the absence of fetal movements was mentioned in the medical records. The karyotypes of all family 1 members were normal. The female patient 1 presented at birth with a cheek hemangioma and suffered from deafness secondary to multiple serous otitis, somnambulism, learning deficit, and behavioral disorder.

The orofacial clinical phenotype, assessed through oral clinical and radiographic (panoramic radiograph) examination, revealed no abnormalities of tooth number, shape, or size, but abnormalities of tooth structure were obvious, with AI affecting both the primary and permanent dentitions (Figs. 1A-1C). The chalky white color of the enamel and the overall intact morphology of erupted and erupting teeth suggested the clinical diagnosis of hypomaturation type AI. The enamel surface was hard, and the enamel loss was related to secondary enamel breakdown. Some true hypoplastic enamel areas (pits) were also present. On the panoramic radiograph, a differential but limited contrast was visible between enamel and dentin. Early eruption of permanent lower incisors was reported by the parents, but the dental age seemed to match the physical age at subsequent visits. No tooth was available for SEM analysis for patient 1.

Patient 2

This female patient was born prematurely at 30 weeks' gestation from first-cousin parents; there was a history of the *in utero* death of her twin sister at 26 wks of gestation, due to twin-to-twin transfusion syndrome. A previous female fetus had died at 8 weeks *in utero* with no specific diagnosis. Patient 2 had asthma from 3 to 10 yrs old but no other significant health problems.

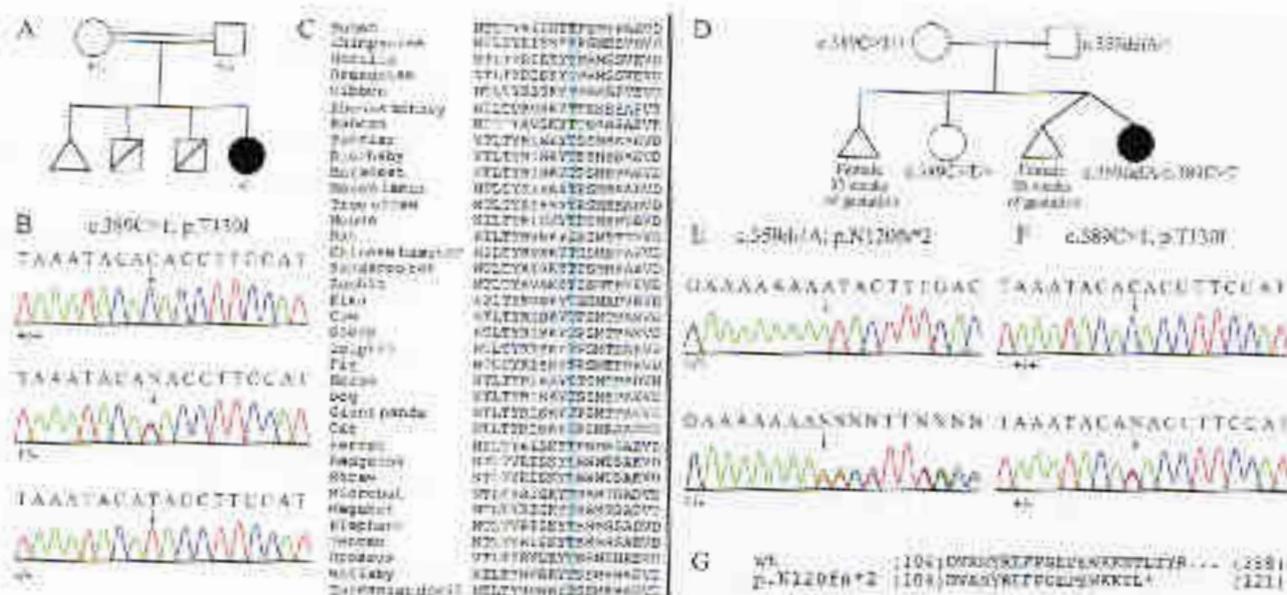


Figure 2. Mutational analysis of the 2 new MMP20 mutations. (A-C) Patient 1. (A) Pedigree of the AI kindred with the homozygous mutation (c.389C>T, p.T130I). (B) DNA sequencing chromatograms of control (+/+), and of heterozygous (+/-) and homozygous (-/-) mutations. The mutation site is indicated with arrows. (C) Sequence alignment of 36 mammalian MMP20 in the target region encoded by exon 3. The affected lysine (blue background) is unchanged in all species. (D-G) Patient 2. (D) Pedigree of the AI kindred with the compound heterozygous mutation (c.359delA / c.389C>T). (E, F) Mutational analysis. DNA sequencing chromatograms of control (+/+) and of heterozygous (+/-) mutation. Arrows point to the mutation sites. (G) Alignment of the wild-type MMP20 sequence with the truncated protein resulting from the p.N120fs*2 mutation.

Oral physical and radiographic (panoramic radiograph) examination (Figs. 1D-1H) revealed no abnormalities in tooth number in the primary or permanent dentition, but there were abnormalities of tooth shapes/sizes (crowns rather bulbous with a cervical constriction, roots thin and short, and molars possibly taurodontic). The tooth structure demonstrated hypomineralization AI affecting both the primary and permanent dentitions. Early tooth eruption was reported in mandibular permanent second molars and premolars. The eruption of maxillary teeth seemed normal and matched her chronological age. This girl required extensive restorative crown treatment, with only a few teeth being intact. The enamel defects in patient 2 were more pronounced than those in patient 1. The enamel of primary teeth was white, opaque, and chalky, with sites of post-eruptive enamel loss and wear. The color change of permanent teeth was more intense (orange), with a hard but rough enamel surface. The teeth were sensitive, the subgingival enamel having no protective barrier effect. There was almost invisible radiographic contrast between enamel and dentin (in comparison with that seen in patient 1). The first primary right upper molar was available for SEM analysis.

Genotype

Patient 1: Homozygous Mutation c.389C>T

We identified a missense mutation in exon 3 of *MMP20* of patient 1. The mutation is referred to as g.13,444C>T; c.389C>T, p.T130I. The female proband was homozygous for the mutation, while both unaffected parents were heterozygous (Figs. 2A, 2B). The mutation occurred at a threonine residue that is unchanged in the 36 MMP20 mammalian sequences studied (Fig. 2C). This finding indicates a putative important function for this amino acid

and validates the homozygous mutation as being responsible for the AI phenotype. The presence of several unchanged residues (e.g., lysine 128, tyrosine 129, serine 132, methionine 133) in this region suggests a putative functional structural domain.

Patient 2: Compound Heterozygous Mutation c.389C>T and c.359delA

We identified the same missense mutation c.389C>T, p.T130I in patient 2. The female proband was heterozygous for the mutation, as were her unaffected mother and her sibling (Figs. 2D, 2E). We also identified a nucleoside deletion in *MMP20* exon 2 that causes a frame shift and leads to a premature stop codon. The mutation is referred to as g.8,706delA; c.359delA, p.N120fs*2 (Figs. 2D, 2E). The female proband was heterozygous for the mutation, as was her unaffected father. Neither her mother nor her sibling was a carrier of this deletion. This case of compound heterozygosity is responsible for the AI phenotype because both alleles possess a valid mutation.

Electron Microscopy Data

Clinical hypomineralization as well as localized hypoplasia were noticed for the AI tooth (first primary right upper molar of patient 2). The thickness of the enamel layer seemed not to be affected (Figs. 3A, 3B). In the area of hypoplastic enamel, it was possible to observe a non-peteciated enamel layer. This confirms that the hypoplastic defect is neither artifactual nor due to secondary enamel breakdown, but is *per se* a primary anomaly (Fig. 3B). The anomalies mostly affected secondary enamel structures: In pre-natal enamel (Fig. 3C), crystals were less well defined than in post-natal enamel (Fig. 3D); and apatite crystals were amazingly

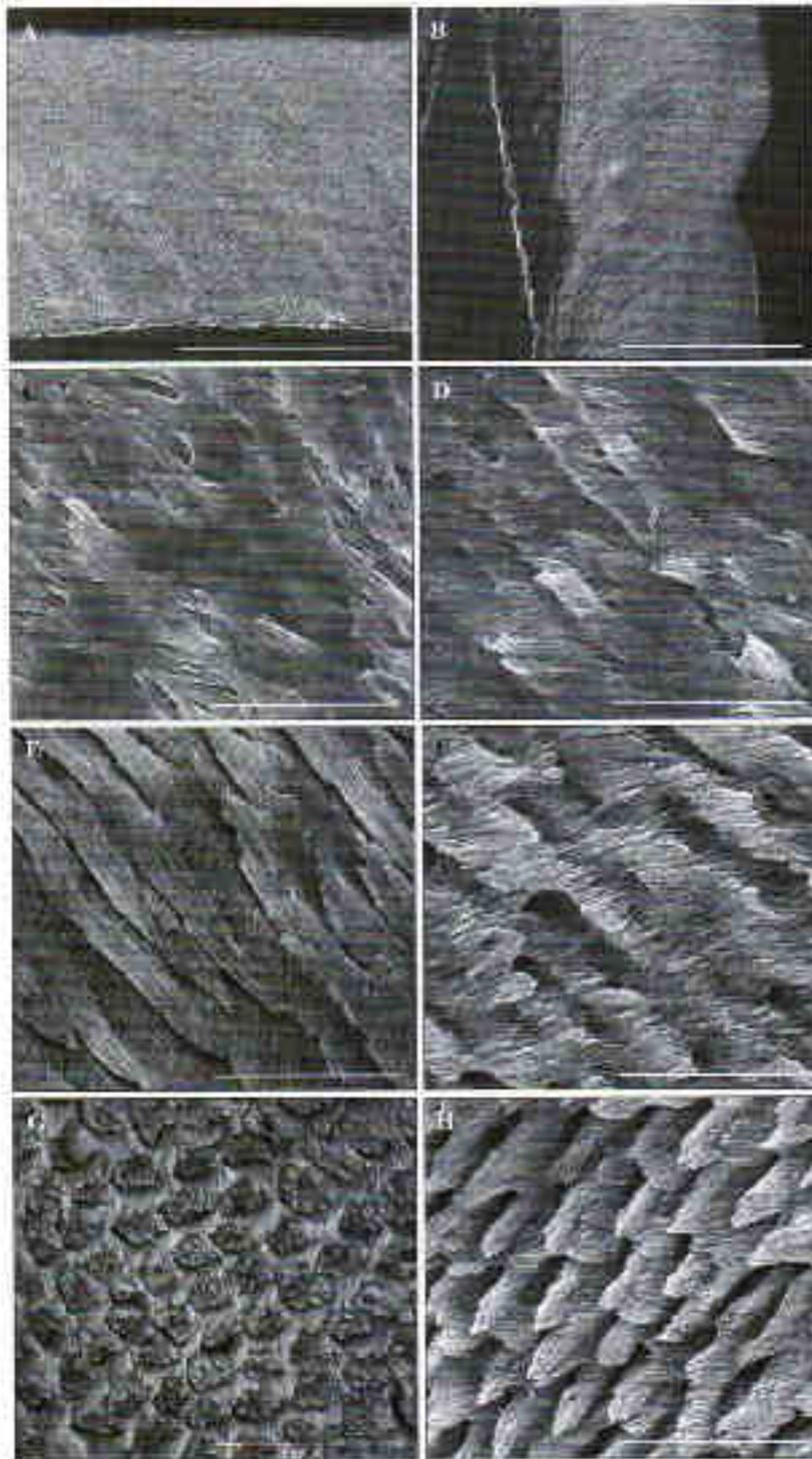


Figure 3. Ultrastructural features of amelogenesis imperfecta (AI) enamel in patient 2. **(A)** Normal enamel (in a control tooth) showing characteristic Hunter-Schreger bands. **(B)** AI enamel of the first upper incisor from the hypoplastic area. The surface of the tooth is not flat as compared that of the control (in A), and there is a localized depression of enamel. Note that the prismless subsurface enamel layer is present and continuous. We called this lack of enamel a hypoplastic defect. The darker layer corresponds to prenatal enamel, and the difference in enamel crystals between pre- and postnatal enamel is unique for the AI tooth. **(C)** Enlargement of the postnatal enamel from the darker area in B. **(D-H)** Postnatal enamel. **(D)** Enlargement of the postnatal enamel from the darker area in B. **(E)** Enamel crystal alignment within the enamel rods of the control tooth. **(F)** Enamel crystal direction within the rods in the AI tooth. **(G)** Presence of interprismatic enamel in the normal tooth. **(H)** Absence or loss of interprismatic enamel in the AI tooth. Scale bars: A, B, 500 μm ; C-H, 20 μm .

perpendicular to enamel prisms (Fig. 3F). These structural features differ from the normal crystal formation parallel to prism direction (Fig. 3C) and have not, to our knowledge, been previously described in the literature. Abnormal (almost absent) inter-rod enamel was noticed (Fig. 3H). Incremental lines did not show the typical features of urine of Retzius as in control enamel. They were irregularly spaced.

Microanalysis (EDX) disclosed $\text{Ca/P} = 1.671 \pm 0.009$ (atomic %) for normal enamel and $\text{Ca/P} = 1.647 \pm 0.003$ (atomic %) for AI enamel. Moreover, we recorded a magnesium content of 0.39% (weight) in the AI enamel. Crystallographically, the AI enamel appeared slightly calcium-deficient compared with normal enamel. This calcium deficiency was related to magnesium substitutions in the enamel crystal structure.

DISCUSSION

The new mutations identified in the 2 unrelated European families increase to 7 the *MMP20* mutations known to date as being responsible for hypomaturation AI (Table). Previously described mutations are homozygous mutations, like the T130I mutation found in patient 1. This mutation was validated because it affects a residue conserved in all mammalian species through natural selection. Such substitutions of an AI-associated residue were validated in previous studies for 2 EMFs, amelogenin (Delgado et al., 2007) and enamelin (Al-Hashimi et al., 2009). The mutation in patient 2 is the first report of a compound heterozygous mutation of a gene involved in autosomal-recessive AI, meaning that 2 different allelic mutations occurred at the same locus. Such a compound mutation favors the appearance of this rare disease in a heterogeneous, non-consanguineous population. This occurrence would mean that *MMP20* mutations could be more frequently present in the general population than expected. Therefore, it will be of great importance to scrutinize patient cohorts for future molecular diagnosis of this specific AI.

In the 2 mutations described, we speculate that the protein is translated and secreted, even if non-functional, because the mutation is located far from the ATG. This explains the observed enamel defects. The enamel phenotype was basically the same in the two patients, although enamel defects were more pronounced in patient 2: hypomaturation, opaque enamel from whitish to brown-orange, with local areas of hypoplasia and post-eruptive enamel loss or pitting, possibly indicative of a faulty dentino-enamel junctions. This phenotype is similar to previous descriptions of *MMP20*-associated

type IIA2 A1 (Lee *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013) and is reminiscent of the observation in *Mmp20*^{-/-} mice with enamel hypoplasia coupled with hypomineralization (Caterino *et al.*, 2002). In particular, the ultrastructural features of A1 enamel observed in the primary tooth from patient 2 are similar to those described in mouse *Mmp20*^{-/-} control, the only descriptions of ultrastructural alterations of enamel available so far (Bartlett *et al.*, 2006, 2011). It is worth noting that because the KO mouse is a loss-of-function model, the phenotype should be different from that reported here, as resulting from point mutations, which, however, significantly reduce enamelysin function. In patient 1, T153I substitution occurred in a region that was not yet identified as being functionally important, although the resulting enamel defects indicate an important role. However, this residue is not predicted as being phosphorylated but is conserved in several MMPs (JVS, personal observations), which suggests a more general function. In patient 2, the allele with the one base-pair deletion encodes a largely truncated protein that misses the catalytic domain (zinc-binding site) of MMP20. This mutation (i) confirms the crucial role of the catalytic domain for the correct function of MMP20 since the phenotype mimics that of the loss of function in the KO mouse, and (ii) indicates that the more severe phenotype observed in patient 2 when compared with patient 1 results from the compound heterozygous mutation, including the truncated protein encoded by one mutant allele.

These findings shed some light on MMP20 function, although further in-depth exploration is needed. The other anomalies of tooth form (cervical constriction, thin roots, torus-like molars), which were also found in patient 2, are unlikely to be due to *MMP20* mutation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the two families for their participation and contributions and are grateful to Prof. R.K. Hall (University of Melbourne, Australia) for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the University of Strasbourg, the French Ministry of Health (National Program for Clinical Research, PHRC 2005-N-4266 Amelogenesis imperfecta), the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (APL 2009-2012, "Development of the oral cavity: from gene to clinical phenotype in Human"), Institut Français pour la Recherche Odontologique (IFRO), and the EU-funded project (ERDF) A21 "Oro-dental manifestations of rare diseases", and by the RMT-TMO Offensive Sciences initiative, INTERREG-IV Upper Rhone program. S.M. was the recipient of a Master fellowship from the University of Khon Kaen, Faculty of Dentistry, Thailand. The authors declare no potential conflict of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

REFERENCES

Al-Hadrami S, Sen JV, Delgado S (2009). Evolutionary analysis of amelogenin isoforms, the largest enamel protein, suggests a crucial role for the 32-kDa isoform and reveals selective adaptation in rodents and primates. *J Mol Evol* 69:625-636.

Bartlett JD, Ryu OH, Nye J, Sumner JP, Margolis HC (1998). Pramelin mRNA displays a developmentally defined pattern of expression and encodes a protein which degrades amelogenin. *Growth Differ Res* 9:101-109.

Bartlett JD, Skjold A, Lee DH, Wright JT, Li Y, Kulkarni AB, *et al.* (2000). A developmental upregulation of matrix metalloproteinase-20 and its cognate metalloproteinase inhibitor-1 in mouse enamel. *Dev J Oral Sci* 114(Suppl 1):18-21.

Bartlett JD, Skjold Z, Nymo A, Smith CE (2011). Matrix metalloproteinase 20 promotes a smooth enamel surface, a strong collagen enamel junction, and a decussating enamel rod pattern. *Dev J Oral Sci* 119(Suppl 1):149-203.

Bégin-Siro C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT (1999). Damin metalloproteinase 20 (phosphoglycin, enamelysin and ameloblastin) isoform-specific molecules that are distinctively expressed during mouse dental differentiation. *Dev J Oral Sci* 100:965-970.

Bloch-Zugan A, Sedano H, Scully C (2012). Dentinogenesis imperfecta: etiology and genetics. Oxford, London, UK: Elsevier Inc.

Caterino L, Shi L, Sun X, Qiao Q, Yamoto S, Lee Y, *et al.* (2006). Cloning, characterization, and expression analysis of mouse amelogenin. *J Dent Res* 85:1973-1977.

Chang H, Skjold Z, Shi J, Ding Y, Sumner JP, Söderström-Hansson H, *et al.* (2002). Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem* 277:49388-49394.

Chen JC, Luo H, Shi M, Mikayien RN, Kim JW, Sumner JP, Hu JC (2011). Target gene analysis of 30 amelogenesis imperfecta families. *Dev J Oral Sci* 119(Suppl 1):211-23.

Crowford P, Alford M, Bloch-Zugan A (2007). Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2:17.

Delgado S, Ishiyama M, Sen JV (2007). Validation of mouse genetic imperfecta induced from amelogenin evolution. *J Dent Res* 86:326-330.

Hu JC, Sun X, Zhang C, Luo H, Bartlett JD, Sumner JP (2002). Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars. *Dev J Oral Sci* 110:207-215.

Kawasaki K, Nozaki T (2011). Molecular evolution of matrix metalloproteinase 20. *Dev J Oral Sci* 119(Suppl 1):247-253.

Kim JW, Sumner JP, Han YC, Heo JS, Ramaswami MG, Bartlett JD, *et al.* (2004). MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomatric amelogenesis imperfecta. *J Mol Genet* 40:271-275.

Kim JW, Sumner JP, Liu BP, Seyama F, Bartlett JD, Hu JC (2006). Mutational analysis of candidate genes in 29 amelogenesis imperfecta families. *Dev J Oral Sci* 114(Suppl 1):3-12.

Lee SK, Seyama F, Kang SY, Lee SK, Gentry K, Yum B, *et al.* (2010). MMP20 homozygous frameshift mutation in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 89:46-50.

Lu Y, Papageorgis P, Yonokuni Y, Hu JC, Bartlett JD, Sumner JP (2005). Function of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Mol Cell* 19:699-709.

Meredith RW, Giese J, Cheng J, Springer MS (2011). Pseudogenization of the matrix gene enamelysin (MMP20) in the common ancestor of eumammalian whales. *Proc Biol Sci* 278:993-1002.

Oakley J, Hart PS, Ryu OH, Choi SJ, Oslawski Karim M, Fossil E, *et al.* (2007). MMP20 active-site mutation in hypomatric amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 84:1071-1075.

Papageorgis P, Liu BP, Lee XY, Hu Y, Sumner JP, Bartlett JD, *et al.* (2006). Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 87:56-59.

Sumner JP, Hu JC (2005). Expression, structure, and function of enamel proteases. *Curr Opin Dent* 43:441-449.

Ueda-Kori Y, Khan F, Li H, Wilkowska H, Zhu L, Li W, *et al.* (2011). Hydrolysis of amelogenin by matrix metalloproteinase-20 isoforms in vitro. *Arch Oral Biol* 56:1516-1520.

Wang SK, Hu Y, Sumner JP, Seyama F, Gentry NM, Pal S, *et al.* (2011). Novel KLK4 and MMP20 mutations discovered by whole exome sequencing. *J Clin Invest* 121:206-211.

Wiley CS Jr (1998). Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and similar dysplastic enamel problems in classification. *J Oral Pathol* 17:341-353.

Wright JT, Tomoi M, Long K, Sobie K, Crowford P, Alford ML, *et al.* (2011). Amelogenesis imperfecta genotype-phenotype analysis in 71 families. *Clin Invest* 121:206-211.

Yamamoto Y, Richards AS, Nye J, Sumner JP, Mikayien RN, Hu JC, *et al.* (2011). Enamel protein and expression in *Mmp20* and *Sclra4* null and double-null mice. *Dev J Oral Sci* 119(Suppl 1):206-215.

III. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive *FAM20A* mutations [110]

Résumé

L'homéostasie du calcium nécessite la régulation cellulaire des systèmes interstitiels pour moduler les mouvements ioniques. La perturbation de ces systèmes dans le rein aboutit à une néphrocalcinose et des calculs rénaux. La pathogénie de ces anomalies médicales est encore incomprise

Dans cette étude, 25 patients issus de 16 familles ont été recrutés. Il s'agissait de patients présentant une néphrocalcinose inexplicée et des anomalies bucco-dentaires spécifiques (AI, hyperplasie gingivale, rétention dentaire). Une série d'analyse par "genome-wide linkage", "exome capture", "next-generation sequencing" et séquençage Sanger a été menée.

Tous les patients étaient porteurs d'une mutation bi-allélique de *FAM20A* et 20 mutations ont été identifiées.

Les mutations de *FAM20A* entraînent une AI à transmission autosomique récessive et semblent être associées à une néphrocalcinose (dans le syndrome ERS)[162-185].

Nephrocalcinosis (Enamel Renal Syndrome) Caused by Autosomal Recessive *FAM20A* Mutations

Graciana Jaureguiberry¹, Muriel De la Dure-Molla², David Parry³, Mickael Quentric⁴, Nina Himmerkus⁵, Toshiyasu Koike⁶, James Poulter¹, Enriko Klootwijk¹, Steven L. Robinette⁷, Alexander J. Howie¹, Vaksha Patel¹, Marie-Lucile Figueres⁸, Horia C. Stanescu¹, Naomi Issler¹, Jeremy K. Nicholson⁷, Dettlef Bockenbauer¹, Christopher Laing¹, Stephen B. Walsh¹, David A. McCredie⁹, Sue Povey¹⁰, Audrey Aysel¹¹, Arnaud Picard¹¹, Aurore Coulomb¹², Alan J. Medlar¹, Isabelle Bailleul-Forestier¹³, Alain Verloes¹¹, Cedric Le Caignec¹⁵, Gwenaëlle Roussey¹⁵, Julien Guioi¹⁷, Bertrand Isidor¹², Clare Logan¹, Roger Shore¹⁸, Colin Johnson¹, Christopher Inglehearn¹, Suhails Al Bahlani¹⁹, Matthieu Schmittbuhl²⁰, François Clauss²⁰, Mathilde Huckers²⁰, Virginie Laugel²², Emmanuelle Ginglinger²², Sandra Pajarola²³, Giuseppina Sparta²³, Deborah Bartholdi²³, Anita Rauch²³, Marie-Claude Addor²⁵, Paulo M. Yamaguti²⁵, Heloisa P. Safatle²⁴, Ana Carolina Acevedo²⁶, Hercilio Martelli-Junior²⁸, Pedro L. dos Santos Neto²⁸, Ricardo D. Coletta²⁹, Sandra Gruessel³, Carolin Sandmann³, Denise Ruehmann³, Craig B. Langman³⁰, Steven J. Scheinman³¹, Didem Ozdemir-Ozenen³², Thomas C. Hart³¹, P. Suzanne Hart³⁶, Ute Neugebauer³⁶, Eberhard Schlatter³³, Pascal Houllier³, William A. Gahl³⁴, Mikka Vakkula⁴, Agnes Bloch-Zupan²⁰, Markus Bleich³, Hiroshi Kitagawa⁶, Robert J. Unwin¹, Alan Mighell¹⁰, Ariane Bental¹¹, Robert Kleita¹

¹Centre for Nephrology, University College London, London, UK; ²Rothschild Dental Hospital Service, Paris, France; ³Molecular Medicine, University of Leeds, Leeds, UK; ⁴de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium; ⁵Physiology, University of Kiel, Kiel, Germany; ⁶Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University, Kobe, Japan; ⁷Biomolecular Medicine, Imperial College London, London, UK; ⁸Concelliers Research Center, Paris-Descartes University, Paris, France; ⁹Royal Children's Hospital, Melbourne, Vic, Australia; ¹⁰Department of Genetics, Evolution and Environment, UCL, London, UK; ¹¹INSERM, UM85 872, University Paris-Diderot, and ¹²Pathology service, Armand Trousseau Hospital, Paris; ¹³Toulouse Hospital, Sabatier University, Toulouse; ¹⁴Department of Genetics, APHP – Robert Debré University Hospital, Paris, and Services de ¹⁵Génétique, ¹⁶Pédiatrie and ¹⁷Stomatologie, CHU de Nantes, Nantes, France; ¹⁸Leeds Dental Institute, University of Leeds, Leeds, UK; ¹⁹Al Nahda Hospital, Muscat, Sultanate of Oman; ²⁰University of Strasbourg, Strasbourg; ²¹IGBMC, INSERM, U1064, Illkirch, and ²²Service de Génétique, Hôpital Emile Muller, Mulhouse, France; ²³Medical Genetics, University of Zurich, and ²⁴Nephrology Unit, University Children's Hospital, Zurich, and ²⁵Service de Génétique Médicale, Lausanne, Switzerland; ²⁶Health Sciences School and ²⁷Department of Medical Genetics, University of Brasília, Brasília; ²⁸State University of Montes Claros, Minas Gerais, and ²⁹Dental School, State University of Campinas, São Paulo, Brazil; ³⁰Pediatric Nephrology, Northwestern University, Chicago, Ill., and ³¹The Commonwealth Medical College, Scranton, Pa., USA; ³²Pedodontics, Yeditepe University, Istanbul, Turkey; ³³Periodontics, University of Illinois at Chicago, Chicago, Ill., and ³⁴NIH, Bethesda, Md., USA; ³⁵Internal Medicine D, University of Muenster, Muenster, Germany

G. Jaureguiberry, M. De la Dure-Molla, D. Parry, M. Quentric, N. Himmerkus, T. Koike, M. Bleich, H. Kitagawa, R.J. Unwin, A. Mighell, A. Bental, and R. Kleita contributed equally to this work.

KARGER

E-Mail: karger@karger.com
www.karger.com/kup

© 2012 S. Karger AG, Basel
1660-2107/12/1221-0001\$39.00

Karger
Open access

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), applicable to the online version of the article only. Distribution for non-commercial purposes only.

Robert Unwin, MD, PhD, FRCN, FRCR, FRCPD
Centre for Nephrology, University College London
Royal Free Hospital, Rowland Hill Street
London NW3 2PF, UK
E-Mail: r.unwin@ucl.ac.uk

Key Words

Nephrolithiasis · Urolithiasis · Amelogenesis imperfecta · FAM20B · FAM20C

Abstract

Background/Aims: Calcium homeostasis requires regulated cellular and interstitial systems interacting to modulate the activity and movement of this ion. Disruption of these systems in the kidney results in nephrocalcinosis and nephrolithiasis, important medical problems whose pathogenesis is incompletely understood. **Methods:** We investigated 25 patients from 16 families with unexplained nephrocalcinosis and characteristic dental defects (amelogenesis imperfecta, gingival hyperplasia, impaired tooth eruption). To identify the causative gene, we performed genome-wide linkage analysis, exome capture, next-generation sequencing, and Sanger sequencing. **Results:** All patients had biallelic FAM20A mutations segregating with the disease; 20 different mutations were identified. **Conclusions:** This autosomal recessive disorder, also known as enamel renal syndrome, of FAM20A causes nephrocalcinosis and amelogenesis imperfecta. We speculate that all individuals with biallelic FAM20A mutations will eventually show nephrocalcinosis.

Copyright © 2013 S. Kawan, AG, Basel

Introduction

Nephrocalcinosis (NC), diagnosed by radiographs, CT, or increased echogenicity on ultrasound, represents an important renal complication because it can accompany progressive deterioration of glomerular function or nephrolithiasis [1]. In some cases, NC provides a clue to an underlying genetic disorder such as hyperoxaluria or distal renal tubular acidosis with or without deafness [2, 3]. In other cases, NC is a side effect of chronic treatment with various drugs, including loop diuretics and vitamin D. In general, the pathogenesis of NC has not been adequately elucidated, although hypercalcaemia appears to be a common finding.

Often, rare genetic diseases reveal previously unrecognized mechanisms of action regarding physiology, cell biology, and metabolism. Here, we present genetic studies into a rare human disease of NC combined with amelogenesis imperfecta (AI), a disorder of abnormal enamel formation and impaired tooth eruption.

Methods

Patients and families were identified in our rare disease renal tubular or distal/craniofacial reference centers and gave informed consent. This study was approved by the institutional review boards and ethics committees of the various centers. All patients had NC confirmed by either ultrasound, X-ray or CT, and all showed characteristic teeth findings with AI and delayed or missing tooth eruption.

In short, multipoint parametric linkage analysis utilizing 2,000 highly polymorphic markers (DeCode, Iceland) across the whole genome in 4 informative families as well as homozygosity mapping for another consanguineous family was used to determine the locus linked to this trait, as published before [4, 5]. Next-generation sequencing using exome capture (Perkin Elmer, USA; Leeds Translational Genomics Unit, UK) was performed on 5 patients from 5 unrelated families, 4 were part of the linkage analysis. Subsequent data analysis was restricted to novel sequence variants within the linked region. The frequency of each variant was examined in >100 ethnically matched alleles available in public databases (1000 Genomes, release 12 – May 2012). Sanger sequencing was performed as described, and mutations were sequenced in family members for segregation analysis.

In detail, genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes for all subjects using standard protocols. Genotypes from polymorphic markers for 4 families were generated by DeCode, Iceland. Analyses were carried out as published before with modifications [4]. In short, genotypes were examined using a multipoint parametric linkage analysis and haplotype reconstruction was performed via Allegro and GeneHunter for an autosomal recessive model with complete penetrance, disease allele frequency of 0.001 (DeCode map with appropriate allele frequencies). The data were formatted using Mega2 (version 1.0) through Alohomoer (version 0.30, Win32); non-informative markers were filtered out. Mendelian inconsistencies were checked using PedCheck (version 1.1); unlikely genotypes were identified and filtered using Merlin (version 1.1 alpha 3). The Allegro haplotype output files were visualized with HaploPaint. In addition and in parallel, whole-genome SNP microarray analysis was performed on genomic DNA for another consanguineous family by ARON Applied Technology; resulting data were analyzed using IBD finder software [5]. Whole-exome sequencing was performed using 3 µg of genomic DNA, which was sheared and ligated to Illumina adapters, according to Agilent's SureSelect Library Prep protocol. The sample was then size selected (200–300 bp) by agarose gel electrophoresis and enriched for 12 cycles, using PCR prior to hybridization to the SureSelect reagent for 24 h at 65°C. The library was denatured using NaOH and diluted to a concentration of 12 pM, of which 120 µl was hybridized onto a v5 single read flow cell (Illumina, San Diego, Calif., USA). Samples were prepared for sequencing according to Illumina's standard amplification, linearization, blocking and primer hybridization protocols. The flow cell was then loaded onto an Illumina GAIIx and sequencing performed for 80 cycles after which the raw data were processed using the Illumina pipeline. The data (seq) files generated were aligned to the human reference sequence (hg19/GRCh37) using Novoalign short-read alignment software (Novocraft Technologies, Selangor, Malaysia). Duplicate reads and reads mapping to multiple locations were excluded from any analysis. SAMtools and the Genome

Table 1. FAM20A mutations in patients with NC and AI

Family	Age, years	Gender	FAM20A mutations
1	21	male	c.915-918delTTT; p.F305fsX380
2	27	female	IVS2+1G>A/c.913-914delTT; p.F305fsX378
	31	male	IVS2+1G>A/c.913-914delTT; p.F305fsX378
3	23	male	IVS4+1G>C/c.1348-1349delTTC; p.S450fsX469
	25	female	IVS4+1G>C/c.1348-1349delTTC; p.S450fsX469
4	59	male	c.1475-1482dupAACCCAC; p.L495fsX509
	64	female	c.1475-1482dupAACCCAC; p.L495fsX509
5	12	female	c.406C>T; p.R136X
6	20	male	c.34-35delCT; p.L12fsX78
7	16	female	c.1513delA; p.I505fsX506
	22	male	c.1513delA; p.I505fsX506
8	20	male	c.1432C>T; p.R478X
9	13	male	c.518T>G; p.L173R
10	29	female	c.727C>T/c.1228-1229delGA; p.R243X/p.D410fsX414
11	19	female	c.217C>T/c.727C>T; p.R73X/p.R143X
	20	male	c.217C>T/c.727C>T; p.R73X/p.R143X
12	18	female	c.1369A>T; p.K457X
13	14	female	c.755-757delTCT/c.641-719del79bp; p.F252del/p.L214fsX259
	16	male	c.755-757delTCT/c.641-719del79bp; p.F252del/p.L214fsX259
14	31	female	IVS5+2T>G
15	24	male	c.907-908delACG; p.S303fsX378
	31	male	c.907-908delACG; p.S303fsX378
	37	female	c.907-908delACG; p.S303fsX378
16	17	female	c.34-35delCT/c.612delC; p.L12fsX78/p.A204fsX215
	18	female	c.34-35delCT/c.612delC; p.L12fsX78/p.A204fsX215

Mutations are described on the cDNA and predicted protein levels. Listing of one allele indicates homozygosity; two alleles indicate compound heterozygosity. Every patient had biallelic mutations involving insertions, deletions, essential splice sites, missense changes or nonsense changes.

Analysis Toolkit were used to further process the alignment files for variant calling [6, 7].

For confirmation of variants detected by exome capture/next-generation sequencing and for mutation detection in additional cases, we amplified all coding exons and exon-intron boundaries of FAM20A using standard PCR methodology with intronic (genomic) primers. PCR products were separated on 1% agarose gels with ethidium bromide using electrophoresis and visualized under UV light. Specific bands were cut and DNA was isolated and purified using standard procedures. Bi-directional sequencing of all exons and exon-intron boundaries were performed using a Beckman Coulter CEQ8000 or an Applied Biosystems 3130xl capillary sequencer per the manufacturer's protocol. Sequencing data was analyzed and compared with the published reference sequence for FAM20A (NC_029809, April 2012, NCBI build 37.3).

Results

We ascertained 25 patients (12 males, 13 females, age 12-64) in 16 families with NC and characteristic dental findings, i.e., the triad of AI, gingival thickening and impairment of tooth eruption (table 1). The diagnosis of NC was made predominantly by nephrologists based upon characteristic imaging findings. Generalized hypoplastic AI was evident from eruption of the deciduous teeth early in childhood with subsequent impaired eruption of the permanent teeth and development of gingival enlargement. Clinical details of some patients have been published [8-11]. None of the parents or offspring of our patients had AI.

From the 16 families with this disorder, we selected four informative families (fig. 1A) for whole-genome

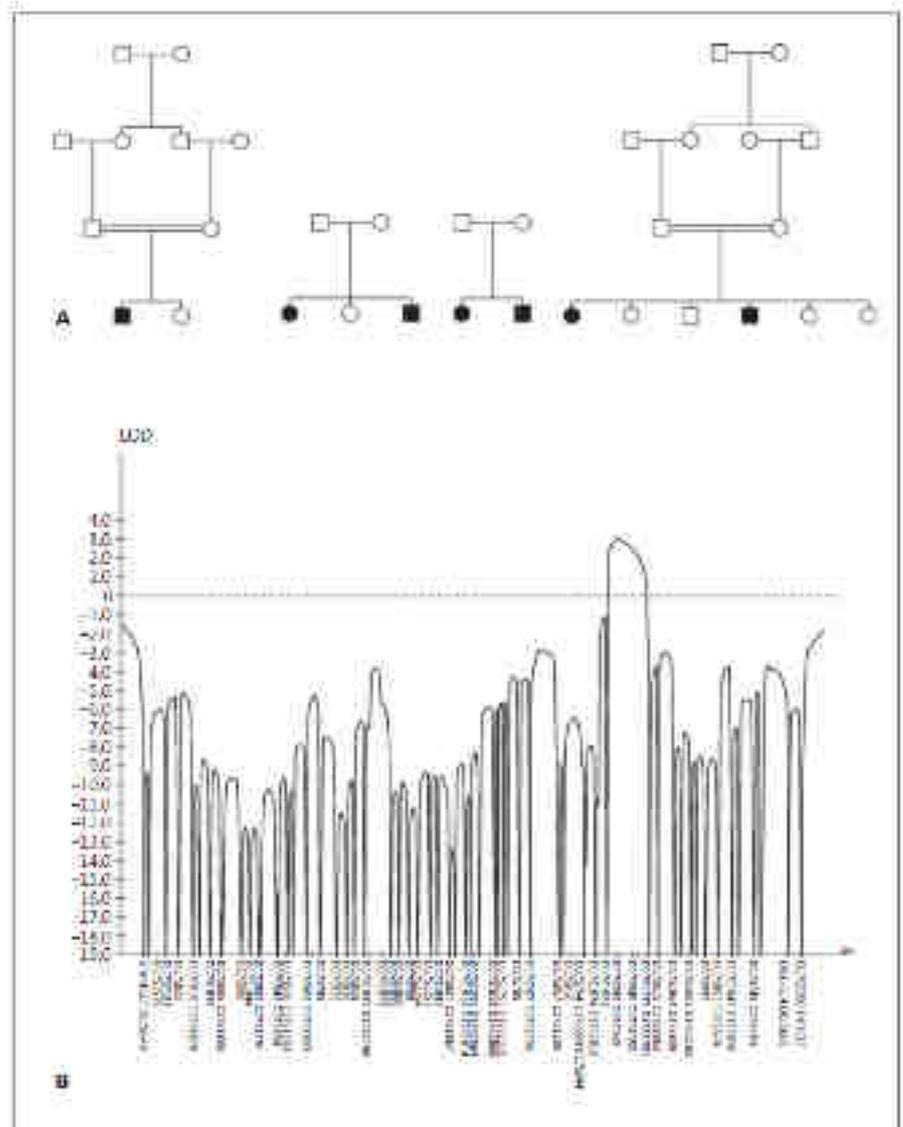


Fig. 1. **A** Pedigrees used for multipoint parametric linkage analysis. Black symbols indicate affected, white unaffected; squares males and circles females. **B** LOD score analysis for chromosome 17. Note the single significant peak at 17q24.

parametric multipoint linkage studies. Using dense (2 cM) polymorphic markers, we identified a single linked locus on chromosome 17q24 with a LOD score of 3.1 (fig. 1B). Haplotype reconstruction placed the locus between flanking markers D17S1821 (97.3 cM) and D17S1797 (106.2 cM), a region of 5.3 million bases containing 41 annotated genes (NCBI build 37.3, October 2011). Independently, homozygosity mapping identified the same locus in another consanguineous family (data not shown).

To identify the disease-causing gene, we performed massive parallel sequencing using exome capture on 5 unrelated patients. Using an autosomal recessive model,

limiting our analysis to the linked region, and filtering variants to eliminate common polymorphisms, we found homozygous or compound heterozygous mutations in all 5 patients in only one gene, *FAM20A*. A total of 20 different mutations (deletions, insertions, and splice site, missense and nonsense mutations) were identified in the homozygous or compound heterozygous state, confirmed by Sanger sequencing, and demonstrated to segregate with the disorder in our 16 families (table 1). *FAM20A* (cDNA 1,626 bp, protein 541 amino acids, 11 coding exons) is a member of a family of kinase-encoding genes that includes *FAM20B* and *FAM20C*.

Discussion

Calcium plays many critical roles in human physiology, serving as an intracellular messenger, an extracellular neuromuscular excitatory ion, and a structural component of bone and teeth. For example, tooth enamel (calcium hydroxyapatite) is the hardest human tissue and can function into old age, despite being the only mineralized tissue with no capacity for cellular repair. Hence, the tempo-spatial concentration of calcium must be exquisitely regulated in different compartments, bound to albumin within the circulation, sequestered by calbindin within cells, including teeth [12], and excreted under tight control by the kidney [13]. Within the vasculature, calcium availability is closely modulated by an intricate interplay between bones and regulatory hormones that involves positive and negative feedback mechanisms (e.g., vitamin D, PTH, calcitonin) [14, 15]. Consequences of dysregulated calcium homeostasis include nephrolithiasis and NC, i.e., precipitation of calcium in the urinary collecting system and renal interstitium, respectively.

The processes that normally maintain calcium balance in renal tissues can be delineated by studying genetic disorders involving NC. A prime example lies in an autosomal recessive disorder of NC combined with AI. Linkage analysis and focused exome sequencing performed on affected families identified the causative gene as *FAM20A*, previously associated only with a disorder of AI [16, 17].

Previous causes of NC have involved epithelial and paracellular disturbances in calcium transport, predominantly caused by mutations in calcium-specific channels and proteins [18–20]. These systems either reabsorb filtered calcium from the filtrate (urine) across the renal tubular cell or release calcium from the tubular cell into the interstitial compartment. When they malfunction, increased urinary calcium precipitates within the renal tubule (leading to nephrolithiasis and urolithiasis) or within the interstitium (leading to NC); this is invariably accompanied by hypercalcemia.

Our 25 patients exhibited NC and AI, but ascertainment of other patients with biallelic *FAM20A* mutations

will expand the phenotype and define the entire spectrum of this rare disease. Also, two different *Fam20a* knock-out mouse models exhibited different findings: in one, no kidney findings were reported, whereas the other showed arterial calcification without NC [21, 22]. The patients previously reported with *FAM20A* mutations and AI may also prove to have NC.

Conclusions

Our findings have implications for diagnosis and treatment. *FAM20A* is a locally secreted protein with low abundance in saliva [23] and blood [24], suggesting that replacement therapy could provide an option for a treatment or prophylaxis.

Acknowledgements

The authors thank all participating patients and families. We dedicate this work to the late Professor Oliver Wong, who remained actively involved in these studies from their inception in the 1990s until his passing in February 2012, and whom we miss dearly. Funding for this study was kindly provided by the David and Elaine Potier Charitable Foundation (to R.K.), St Peter's Trust for Kidney, Bladder and Prostate Research (to D. Bockenhauer, R.L.U., R.K.), Kids Kidney Research (to D. Bockenhauer, R.K.), the Oxalosis & Hyperoxaluria Foundation (to R.K.), the European Union, FP7 EURenOMICS grant agreement No. 302608 (to D. Bockenhauer, R.L.U., R.K.), the Intramural Research Program of the National Human Genome Research Institute (to W.A.G.), the MEXT Supported Program for the Strategic Research Organization at Private Universities, 2012–2016 (to H.K.), the Wellcome Trust (to A.M., C.J.), the Sir Jules Thoun Charitable Trust (to C.J., C.J.), the University of Strasbourg (to A.B., Z.), the French Ministry of Health National Program for Clinical Research (to A.B., Z.), the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (to A.B., Z.), the Institut Français pour la Recherche Otolomologique (IFRO) (to A.B., Z.), INSERM (to M.Q., A.B.), the Paris-Descartes University (to M.Q.), the French Ministry of Health and APHP Rothschild Hospital (to M.D.M.), the Paris-Diderot University (to M.D.M., A.A., A.B.), the F.R.S.-FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique) (to M.V.), the Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG) (to H.M.-J.), CAPES Brazil (to A.C.A.), and Deutsche Forschungsgemeinschaft (CI 1074/2) (to E.S.).

References

1. Evan AP, Unwin RJ, Williams JC Jr. Renal stone disease: a commentary on the nature and significance of Randall's plaque. *Nephron Physiol* 2011;119:p49–p53.
2. Kleitl R, Bockenhauer D. Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies. *Nephron Physiol* 2009;104:p73–p80.
3. Vivante A, Lotan D, Podes Shakked N, Landau D, Suez P, Nampoothiri S, Verma I, Abu-Eldeh A, Bockenhauer D, Dekel B, Amisier Y. Familial autosomal recessive renal tubular acidosis: importance of early diagnosis. *Nephron Physiol* 2011;119:p81–p89.

4. Rockerhauer J, Feather S, Stanescu BC, Bănduik S, Zidek AA, Reichold M, Tobin I, Lieberer E, Sterner C, Landouere G, Arora R, Steinmann T, Thompson D, Gross IH, van't Hoff W, Al Maari G, Tullay K, Young S, Aurbaster Y, Kloutoukja E, Hubsch M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arns-Burrows M, Knepper MA, Doobie A, Gold WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R: Epilepsy, alopecia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations. *N Engl J Med* 2009;360:1960-1970.
5. Carr IM, Sheridan E, Hayward BE, Markham AP, Southon D, Hoffmeyer M, and SN/Scree: tools for pedigree-independent identification of autosomal recessive regions in individuals with recessive inherited disease. *Hum Mutat* 2009;30:960-967.
6. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Lomer N, Martin G, McManis G, Libunco J, Muth R, et al: 1000 Genome Project Data Processing Subgroup: The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;25:2178-2179.
7. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA: The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297-1303.
8. Dellow EL, Hatley KL, Uwin RJ, Wong O, Winter GB, Parkins JE: Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypocalcemia syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:3193-3198.
9. Paula LM, Melo NS, Silva Guerra ES, Mastriho DH, Acevedo AC: Case report of a rare syndrome associating amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous family. *Arch Oral Biol* 2005;50:237-242.
10. Martelli-Junior H, dos Santos Neto PE, de Aquino SN, de Oliveira Santos CC, Borges SP, Oliveira EA, Lopes MA, Coletta RD: Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: a case report and review of the literature. *Nephron Physiol* 2011;118:p81-p85.
11. Hall RK, Phakey P, Palatka J, Metzschke DA: Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. Case studies of clinical features and ultrastructure of tooth enamel in two siblings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1990;70:980-992.
12. Roudot A, Hutcheon D, Pugh W, Mathieu H, Guillet JM: Cell- and stage-specific expression of vitamin D receptor and calbindin genes in rat incisor: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Dev Biol* 1993;155:172-179.
13. Bleich M, Shan Q, Himmerkus N: Calcium regulation of tight junction permeability. *Ann NY Acad Sci* 2012;1258:93-99.
14. Gokhale DF, Cunningham J: Mineral metabolism and vitamin D in chronic kidney disease - more questions than answers. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:341-346.
15. Loupy A, Ramakrishnan SK, Woola B, Chhabray R, de la Halle B, Roumpais S, Brunnezzi P, Mandet C, Christensen EL, Faure JL, Cheral I, Lajthami S, Colet C, Hadari D, Gode RH, Ruet M, Houllier P: PTH-independent regulation of blood calcium concentration by the calcium-sensing receptor. *J Clin Invest* 2013;123:3355-3367.
16. O'Sullivan I, Rina CE, Daly SR, Urquhart DE, Barton MI, Binakar SS, Martelli Junior H, dos Santos Neto PE, Mansilla MA, Murray K, Coletta RD, Black GC, Dixon MJ: Whole-genome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am J Hum Genet* 2011;89:619-620.
17. Cho SH, Seymen F, Lee KH, Lee SK, Kwon YS, Kim KL, Jung SE, Song SJ, Yildirim M, Beyram M, Yuna EB, Genay S, Kim IW: Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2012;33:91-93.
18. Shan Q, Himmerkus N, Hinz J, Goodenough DA, Bleich M: Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin 10 knockout mouse. *Ann NY Acad Sci* 2009;1165:145-151.
19. Dimke IL, Hoenderup JG, Bindels RJ: Molecular basis of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport: insights from the TRP channel family. *J Physiol* 2011;589:1535-1542.
20. Bredierhoff T, Himmerkus N, Stürver M, Mu Q, Will C, Meij R, Bachmann S, Bleich M, Willnow TE, Müller D: Deletion of claudin 10 (Clnd10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypomagnesemia and nephrocalcinosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:11211-11216.
21. An C, Ito Y, Nagata-Fuji M, Kikawa S, Shoji I, Hotta EA: A transgenic mouse line with a 58-kb fragment deletion in chromosome 11E1 that encompasses part of the Fam20a gene and its upstream region shows growth disorder. *Kobe J Med Sci* 2010;65:F82-F82.
22. Vogel P, Hirschen GM, Bond JW, Vance JB, Thiel M, Liu J, Wronski TL, Smith DD, Jeter-Jones S, Rosenblatt J: Amelogenesis imperfecta and other bio-mineralization defects in Fam20a and Fam20c null mice. *Vet Pathol* 2012;49:998-1017.
23. Gonzalez-Begus M, Liu B, Hazi A, Hagen FK, Haud AR, Melvin TE, Yates JR: Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* 2009;8:1394-1394.
24. Qian WJ, Kalra DC, Petritis BO, Jiang H, Liu Y, Zhang X, Mootta HM, Vezzoni SM, Camp DG, 2nd, Huang L, Pang X, Zhang WW, Smith DD: enhanced detection of low abundance human plasma proteins using a tandem IgY12-SuperMia immunoadfinity separation strategy. *Mol Cell Proteomics* 2008;7:1965-1973.

IV. Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive *FAM20A* mutations [111]

Résumé

Dans le cadre des AI syndromique, le phénotype associant AI et néphrocalcinose est appelée syndrome ERS (émail-rein); et la pathologie regroupant une hyperplasie gingivale, une AI et un syndrome de fibromatose gingivale est nommé AIGFS.

Le phénotype des patients ERS/AIGFS est très caractéristique et consiste en une AI hypoplasique généralisée affectant la denture temporaire et permanente, un retard d'éruption, des calcifications intra-pulpaire, des follicules dentaires hyperplasiques, des rétentions dentaires, une hyperplasie gingivale. L'examen rénal révèle une néphrocalcinose qui est asymptomatique chez les enfants atteints par l'ERS. Des mutations récessives de *FAM20A* sont à l'origine des deux syndromes. L'AIGFS et le ERS pourraient être en réalité la description du même syndrome, car l'examen rénal n'est pas systématique chez tous les cas d' AIGFS rapportés.

Le but de cet article est de décrire les caractéristiques bucco-dentaires spécifiques des patients porteurs de mutations *FAM20A* récessives. Le terme ERS devrait être privilégié pour tous les phénotypes résultants de ces mutations. Lorsque l'ERS est suspecté, un examen multidisciplinaire par un chirurgien-dentiste, un néphrologue et généticien clinique est recommandé [16, 23, 25, 26, 108-110, 135, 138, 169-172, 177, 178, 183, 186-227].

REVIEW

Open Access

Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive *FAM20A* mutations

Muriel de la Dure-Molla^{1,2*}, Mickaël Quenlin^{1,3}, Paulo Marco Yamaguti⁴, Ana Carolina Accredo^{1,5}, Alan J Miglicki⁶, Mikka Vakkala⁷, Mathilde Hurker^{2,8,9,10}, Ariane Berdal^{1,21} and Agnès Blanche-Zupan^{2,10,11}

Abstract

Amelogenesis imperfecta (AI) is a genetically and clinically heterogeneous group of inherited dental enamel defects. Commonly described as an isolated trait, it may be observed concomitantly with other orodental and/or systemic features such as nephrocalcinosis in Enamel Renal Syndrome (ERS; MIM#204690) or gingival hyperplasia in Amelogenesis Imperfecta and Gingival Fibromatosis Syndrome (AIGFS; MIM#614233). Patients affected by ERS/AIGFS present a distinctive orodental phenotype consisting of generalized hypoplastic AI affecting both the primary and permanent dentition, delayed tooth eruption, pulp stones, hyperplastic dental follicles, and gingival hyperplasia with variable severity and calcified nodules. Renal exam reveals a nephrocalcinosis which is asymptomatic in children affected by ERS. *FAM20A* recessive mutations are responsible for both syndromes. We suggest that AIGFS and ERS are in fact descriptions of the same syndrome, but that the kidney phenotype has not always been investigated fully in AIGFS. The aim of this review is to highlight the distinctive and specific orodental features of patients with recessive mutations in *FAM20A*. We propose ERS to be the preferred term for all the phenotypes arising from recessive *FAM20A* mutations. A differential diagnosis has to be made with other forms of AI, isolated or syndromic, where only a subset of the clinical signs may be shared. When ERS is suspected, the patient should be assessed by a dentist, nephrologist and clinical geneticist. Confirmed cases require long-term follow-up. Management of the orodental aspects can be extremely challenging and requires the input of multi-disciplinary specialized dental team, especially when there are multiple unerupted teeth.

Keyword: Enamel Renal Syndrome (ERS), Amelogenesis Imperfecta and Gingival Fibromatosis Syndrome (AIGFS), Enamel Dysplasia with Hamartomatous atypical Follicular Hyperplasia Syndrome (EDHFS), Amelogenesis imperfecta, Enamel defect, Delayed tooth eruption, Impacted calcification, Gingival hyperplasia, *FAM20A*

Classification

Amelogenesis imperfecta (AI) is a genetically and clinically heterogeneous group of inherited dental enamel defects. The enamel defects can be quantitative and/or qualitative. Reduced enamel thickness, typically with normal hardness is classified as hypoplastic AI, whereas reduced hardness, discoloration with normal thickness is termed hypomineralised AI, that incorporates hypocalcified and

hypomaturated AI subtypes. Fourteen different AI subtypes have been described, distinguished by clinical description and mode of inheritance, although increasingly the emphasis is on genetic classification as insight into the underlying molecular changes increases. All inheritance patterns have been reported, including dominant, recessive and X-linked inheritance with various degrees of penetrance [1,2]. AI commonly described as an isolated trait, may be observed concomitantly with a number of variable dental and/or systemic disorders [3,4]. Initially described by MacGibbon in 1972 [5], many cases with enamel defects associated with nephrocalcinosis have since been reported, either under the name "Amelogenesis

* Correspondence: muriel@igsm.fr

¹Local contributor

²University of Medicine and Dentistry, NISM, UMCS, UK

³Cooper Biotech, Courcouronnes, France

⁴Center of Rare Malformations of the Face and Oral Cavity (MAMFO), Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 de la Dure-Molla et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

imperfecta and nephrocalcinosis" [5-15], or alternatively, "Enamel Renal Syndrome" (ERS, MIM#204690) [16].

Forty years after MacCibbon's case report, next generation sequencing was used to identify recessive mutations in the *FAM20A* (family with sequence similarities 20 member A) gene in 17 families with ERS [17,18]. *FAM20A* mutations were also identified as the cause of "Amelogenesis Imperfecta and Gingival Fibromatosis Syndrome" (AIGFS, MIM#614273) [19,23]. A detailed review of the clinical aspects of patients affected by these two syndromes reveals that the dental phenotype in both cases is in fact the same and that the kidney phenotype has not been investigated fully in AIGFS patients. Therefore recessive *FAM20A* mutations lead to only one disease with distinctive oral phenotype frequently associated with renal calcification.

Epidemiology

Collectively, the various forms of AI are common, with prevalence rates varying from 1/700 to 1/14,000 in newborns, depending on the population studied [24,25]. A review of the clinical cases in the literature indicates that AI associated with the key features of ERS/AIGFS has been reported but named differently: only AI [26,27], AI with inter-radicular dentine dysplasia [28], AI with gingival fibromatosis [20,22,29,30], AI with odontogenic fibroma-like hamartomas around non-erupted teeth [31-35], AI with crown resorption [36] and AI with unerupted teeth [37]. To date, 34 articles have reported ERS-like cases (Table 1 and Additional file 1). Only 16 included a complete analysis of both dental/oral and renal phenotypes. Since the renal status was not systematically analyzed in these cases, ERS has been underestimated. Nevertheless, all together less than one hundred cases have been reported in the world. The prevalence of ERS is still unknown. In Israel, where the prevalence of AI is 1/8000, a study conducted on 70,359 affected children reported only 1 autosomal recessive hypoplastic AI patient with eruption defects, crown resorption and pulpal calcification reminiscent of ERS [26].

Clinical description

Patients are often referred to the dental practitioner due to enamel defects of the primary and permanent teeth. Pregnancy and delivery are uneventful, and no health problems are observed during the perinatal period and childhood. Patients with ERS/AIGFS present with a distinctive oral and renal phenotype (Figure 1).

Oral phenotype

Dental phenotype

Oral and radiographic examination of patients shows consistent dental findings (Figure 1A-D). Teeth have a yellow-brown discoloration appearance and the surface can be either rough or smooth. Teeth are widely spaced

suggesting microdontia, albeit with normal enamel hardness. Enamel layer thickness is drastically reduced, even sometimes absent in both primary and permanent teeth (Figure 2E). According to Witkop, such enamel dysplasia is classified as hypoplastic enamel type II "rough hypoplastic" or IG "thin/agenesis enamel" [2]. Post-eruption wear of the irregular enamel matter may explain the extremely thin and smooth enamel that is frequently observed [9]. Dental pain or sensitivity on eating or drinking is not a prominent feature by contrast with other forms of AI. Molar crowns show flat occlusal surfaces without any characteristic cusp morphology. Semi-lunar shape of the upper central incisor edge is frequently, although not systematically, observed (Figure 1A-B). Eruption of permanent teeth is often delayed and sometimes completely impaired. Delayed eruption also occurs in primary teeth but less frequently (Figure 3A-E). These features suggest that early morphogenetic events during odontogenesis and eruption are affected in addition to amelogenesis.

Clinical examination must be completed with radiographic analysis (Figure 1E-I). Multiple calcification nodules (pulp "stones") are discernible in pulp chambers in primary and permanent teeth, typically needle-shaped in the incisors and round in the posterior teeth (Figure 2A-B). The differential radiodensity expected between dentine and enamel is reduced or absent, indicating low mineral content in enamel or absence of enamel respectively. Around non-erupted teeth, significant pericoronal radiolucencies, delineated by sclerotic margins, are observed. Despite the absence of eruption, root formation proceeds, leading to radicular dilacerations and shorter, sometimes curved, roots (Figure 3C-D). In addition, an abnormal eruption pathway is noted and is extremely clear for the second permanent molar with an inverted direction toward the mandibular canal or maxillary sinus. In some cases, thickening of the maxillary or nasal sinus is observed [29]. Hyperplasia of dental follicles appears to be associated with the abnormality of the eruption pathway and the absence of eruption (Figure 1I, Figure 3C). On some teeth, there is extensive localized root and/or crown resorption with partial replacement of the resorbed dentin by lamellar haversian bone or, in some places, globular structures comprised of incompletely coalesced concentric calcifications (Figure 1I) [12,18,34]. All teeth may be affected; however, posterior teeth are more frequently involved.

Light and scanning electron microscopy definitively established the severe decrease in thickness or absence of enamel (Figure 2C-H) [13]. Enamel appears as an irregular globular calcified layer with few or absent prismatic structures. Small and sparsely packed crystals are observed parallel to the surface, explaining porosity of the enamel [5,27,30]. An abnormal thick layer of what appears to be cellular cementum, covers the roots, especially in the inter-

Table 1 All reported cases with clinical features potentially describing Enamel Renal Syndrome

	Number of reported		Oral phenotype	Kidney phenotype	Diagnosis reported	FAM20A mutation
	Families	Cases	ERS pathognomic oral findings	Bilateral nephrocalcinosis		
MacGibbon [5]	1	1	-	+	Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction	expected
Chosack et al. [6]	4	4	+ (1/2)	Not investigated	Amelogenesis imperfecta among first 3 teeth and the development of a new type of focal hypoplastic autosomal recessive amelogenesis imperfecta.	expected for family 3 only
Lubinsky et al. [10]	1	3	-	+	Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal concentration, and possible abnormality of calcium metabolism	expected
Naita et al. [8]	1	3	-	Not investigated	Interadicular dentin dysplasia associated with amelogenesis imperfecta.	expected
Ozyel et al. [15]	1	1	+	Not investigated	Autosomal recessive molar hypoplasia amelogenesis imperfecta. A case report with clinical, light microscopic, radiographic, and electron microscopic observations.	expected
Van't Hof-Grootenboer et al. [11]	4	4	-	Not investigated	Amelogenesis imperfecta: multiple impactions associated with odontogenic fibromas (WHO type)	expected
Feres et al. [14]	1	1	-	Not investigated	Molar hypoplasia amelogenesis imperfecta with follicular hypoplasia	expected
Hull et al. [9]	1	2	-	+	Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. Case studies of clinical features and histopathology of tooth enamel in two siblings.	expected
Phaley et al. [14]					Histochemical study of tooth enamel with amelogenesis imperfecta + Anephrocalcinosis syndrome	
Dellavalle et al. [7]	1	2	+	+	Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypocalcemia syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents.	confirmed ¹
Kaubmann and Noffke [8]	1	1	-	Not investigated	Enamel dysplasia, hamartomas.	not expected
Narain et al. / Banthia et al. [17]	1	1	-	+	Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis: a new case of this rare syndrome.	expected
Buda et al. [13]	1	1	+	+	Case report of a rare syndrome associating amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous family	confirmed ²
Cesulo et al. [3]	1	2	+	+	Two cases of familial hypomagnesemia with hypocalcemia and nephrocalcinosis: dental findings.	not expected
Balla et al. [19]	1	1	+	Not investigated	Enamel dysplasia with odontogenic fibroma-like hamartomas: re-view of the literature and report of a case.	expected
Ca et al. [20]	1	1	-	+	Enamel-renal syndrome associated with hypokalemic metabolic alkalosis and impaired renal concentration: a novel syndrome?	not expected

Table 1 All reported cases with clinical features potentially describing Enamel Renal Syndrome (Continued)

Elzein et al. [10]	2	2	1 (1/2)	—	Amelogenesis imperfecta with renal disease—a report of two cases	expected for case 1 only
Triller et al. [11]	1	1	+	Not investigated	Enamel dysplasia hamartomatous atypical follicular hyperplasia, vesicle of the fibrotic and acrotal change	expected
Rygebot et al. [4]	1	1	+	Not investigated	Amelogenesis imperfecta, rough hypoplastic type, dental follicular hamartomas and gingival hyperplasia: report of a case from Central America and review of the literature	expected
Mantel-Hajjari et al. [24]	1	1	+	No history of renal pathology (but not investigated)	Case reports of a new syndrome associating gingival fibromatosis and dental abnormalities in a consanguineous family	expected
Mantel-Hajjari et al. [31]	1	1	+	—	Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: a case report and review of the literature	expected
Assi-Saada et al. [28]	1	2	+	Not investigated	Imaging evaluation of the gingival fibromatosis and dental abnormalities syndrome	confirmed
Chen et al. [11]	4	4	+	Not investigated	First FAM20A mutations in hypoparathyroidism/amelogenesis imperfecta	confirmed
Moghayar et al. [36]	1	2	+	Not investigated	Familial familial brown receptors in urea production	expected
Kedvan et al. [16]	1	1	+	—	Enamel renal syndrome: a rare case report	expected
Hegde et al. [37]	1	2	+	Not investigated	Multiple unerupted Teeth with Amelogenesis Imperfecta in Siblings	expected
O'Sullivan et al. [29]	1	4	+	Not investigated	Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutation as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome	confirmed
Jaurigaberry et al. [17]	10	2	+	—	Nephrocalcinosis, Enamel Renal Syndrome, caused by autosomal recessive FAM20A	confirmed
Ward et al. [18]	0	5	+	(0/5) Family 2	FAM20A Mutations Can Cause Enamel Renal Syndrome (ERS)	confirmed
Cabel et al. [22]	1	12	+	—	Autosomal recessive gingival hyperplasia and dental anomalies caused by a 70-kbp par-duplication in the FAM20A gene	confirmed
Wang et al. [23]	2	3	+	1 (1/2) Neg. US in proband of Family 1	FAM20A Mutations Associated with Enamel Renal Syndrome	confirmed
Okuyama et al. [21]	1	2	+	—	Enamel Renal-Gingival Syndrome and FAM20A Mutation	confirmed

COF: Central Odontogenic Fibroma; Neg. US: Negative ultrasound analysis

1) (+) in cases positive vs. negative for the clinical features indicated; No data: clinical features not mentioned or not investigated; 1 (1/2): positive in one case out of two; COF: Central Odontogenic Fibroma; Family previously described in Mantel-Hajjari et al. [31]; *Two families previously described in Dallow et al. [13]; †Family sequenced in Jaurigaberry et al. [17]; ‡Family sequenced in O'Sullivan et al. [22];

§Significant element were highlight by boldface

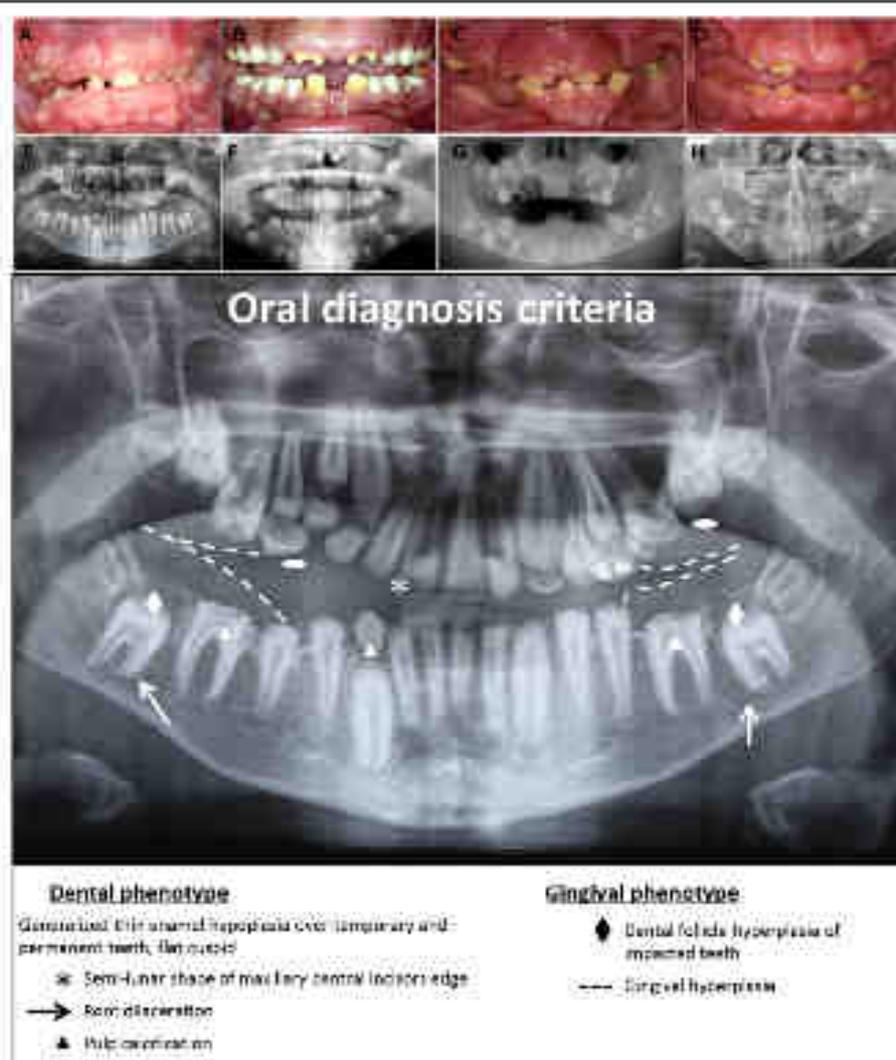


Figure 1 Pathognomonic oral phenotypes in patients with Enamel Reticular Syndrome. (A, B, C, D, E, F, G, H) Oral views and corresponding oblique tomogram of 4 unrelated ERS patients, all with recessive mutations in *WDR26*. Oral view showing hypoplastic (A), delayed tooth eruption, widely spaced teeth, fat cups of abnormal teeth, upper permanent central incisor crown incision and gingival hyperplasia. Oblique tomograms show generalized absence of enamel, altered tooth eruption pathway, fat cups of posterior teeth (white ellipse), pulp calcification (white triangle), hyperplastic dental folds (white diamonds) and gingival hyperplasia (dashed line). Semi-linear shape of the permanent right upper central incisor, crown restriction and root diastemas (white arrow) are also present. Note the consistent oral features in all patients. (I) Summary picture of pathognomonic oral diagnosis criteria. (J-K) Oblique tomogram.

radicular area [18,28]. Dentin is normal, with well-formed dentinal tubules, but the dentino-enamel junction lacks its characteristic scalloped configuration [27,33,34].

Gingival phenotype

Fibrous gingival hyperplasia is pathognomonic, with variable severity. This explains why, when prominent, patients have been diagnosed clinically as having AIGFS. Histological analysis of gingival tissue demonstrated focal ectopic calcification [13,30]. The gingival epithelial layer is well structured with elongated and thin papillae. Gingival connective tissue appears increasingly fibrous with depth,

with the occurrence of focal, round ectopic calcification near the alveolar bone (Figure 4C). Ectopic mineralization is most often observed in close proximity to odontogenic epithelium cells [35] and vascular vessels in rich collagen-containing connective tissue running in all direction [30]. Different sizes of mineralized foci range from discrete spots to confluent nodules of up to 100 μ m (Figure 4C-F). Nodules present with concentric laminations with increased porosity in the center and were suggested to be of cementoid origin [30].

Histopathological analysis of the pericoronal follicles of impacted teeth revealed calcified nodules similar to

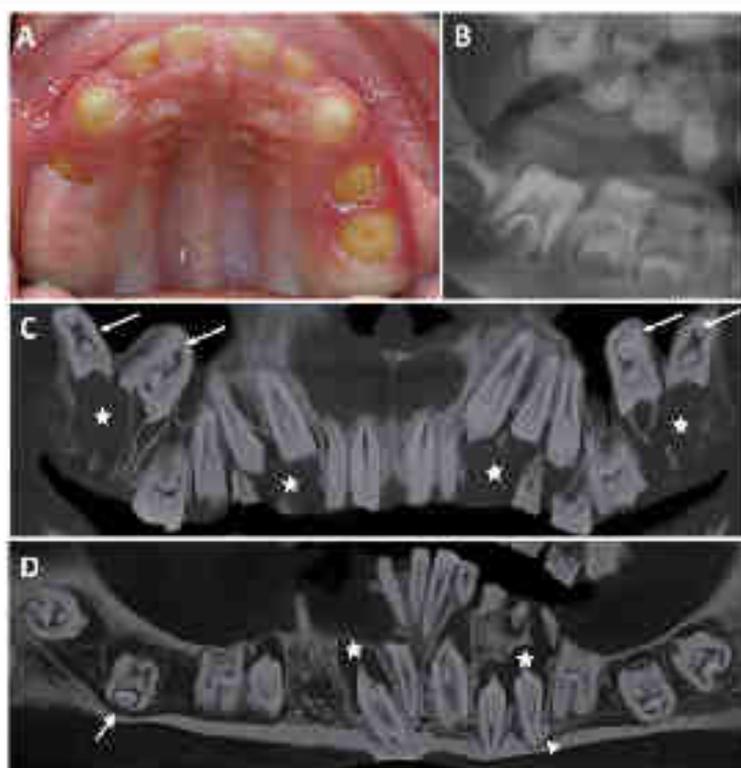


Figure 3 Eruption anomalies of FRS patients. (A, B) Clin and radiographic view of an erupted or partially erupted temporary incisor in a 5-year-old patient. (C, D) Cone beam radiograph of maxillary and mandible arch showing hyperplasia of dental follicle (star), displaced root (triangle), inverted eruptive pathway (asterisk), mandibular premial crossed vertical bone of mandible (arrow).

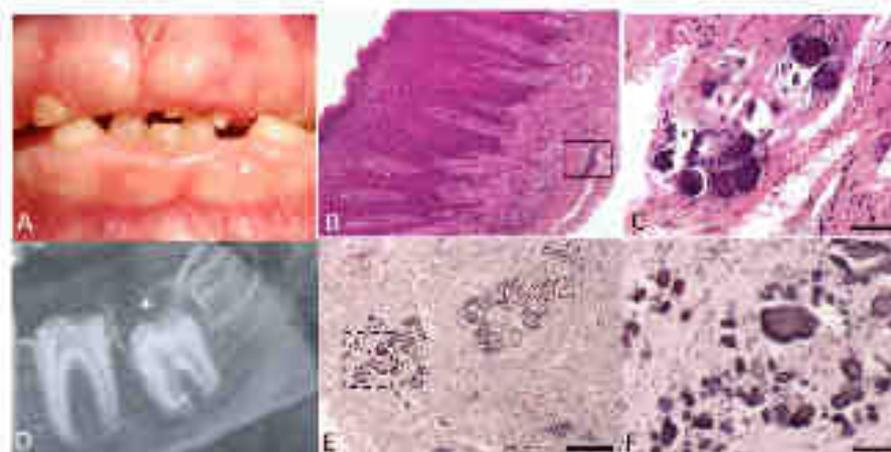


Figure 4 Gingival and dental-follicle ectopic calcifications in patients with FRS. (A) Clinical hyperplasia. (B, C) H&E staining of several gingivae showing ectopic calcification in connective tissue. Note the lamellar concentric layer surrounding the central core of the calcification. (D) Hyperplastic dental follicle well defined by a sclerotic margin. (E) H&E staining of a sectioned follicle showing a cluster of ectopic calcifications. (F) Magnification of boxed area from E. Scale bars: (B) 100 μ m, (C, F) 50 μ m.

skeletal system, eyes, lung, gastro-intestinal tract and liver [42]. Current understanding is that FAM20B is functionally important in cartilage matrix formation and skeletal development by controlling proteoglycan synthesis [43].

Based on the high sequence homology of FAM20 family members, it may be speculated that FAM20A is an additional kinase with specific targets implicated in mineralization and/or calcium transport and proteoglycan synthesis. While the reported clinical features of ERS/AIGFS primarily involve the orodental tissues and kidneys, *FAM20A* expression has been detected in additional tissues by RT-PCR: liver, lung, heart, stomach, placenta, parathyroid, thymus and kidney [44]. *Fam20a,b,c* transcripts have been detected during odontogenesis at mouse E14.5 molar and incisor cap stages [45]. *In situ* hybridization and immunolocalization performed in mouse mandibular incisors revealed *Fam20a* expression in all enamel organ cells (ameloblasts, stratum intermedium and stellate reticulum), odontoblasts, dental pulp cells and stratified gingival epithelium, with lower expression in the ameloblasts [20,23].

Histological analysis of *Fam20a*^{-/-} mouse incisors demonstrated that the ameloblast layer becomes progressively disorganized. All other examined tissues (bone, dentine, cementum) appeared normal. Interestingly, in line with the hamartoma phenotype reported in some human cases [33,35], the enamel organ appeared disorganized, forming odontogenic tumor-like structures [42]. A similar phenotype was described in *Mx2*^{-/-} mice, raising the possibility that MSX2 and FAM20A function within a shared molecular pathway [46]. Ectopic calcification was prominent in the kidneys of *Fam20a*^{-/-} mice, but was also present in muscular arteries, lungs, heart, eyes, pancreas, thalamus, pituitary, choroid plexus, skeletal muscle, and cutaneous tissue. Blood levels of calcium and phosphate were normal [42].

Diagnostic criteria of ERS/AIGFS

Clinical diagnosis focuses on the association of orodental features and renal findings that may lead on to renal impairment. Ectopic lung mineralization has been reported in one patient [21]. However, the oral phenotype is characteristic and, in the absence of other co-segregating health problems, sufficient to clinically diagnose ERS (Figure 1) and direct genetic testing to look for *FAM20A* recessive mutations (Table 1).

Orodental clinical features typical of *FAM20A* recessive mutations include:

- 1) generalized thin hypoplastic or absent enamel;
- 2) primary and permanent teeth affected;
- 3) flat cusps on posterior teeth;
- 4) relative microdontia and spaced teeth;
- 5) intra-pulpal calcifications;
- 6) delayed tooth eruption;

- 7) impacted posterior teeth with hyperplastic follicle (hamartoma-like) and altered eruption pathway;
- 8) root dilacerations of impacted teeth;
- 9) gingival fibromatosis (variable severity);
- 10) gingival and dental follicle ectopic calcification on biopsies;

Additional features that may be observed include:

- 11) semi-lunar shape of central incisor edge;
- 12) crown resorption of non-erupted teeth;
- 13) anterior open-bite;
- 14) root hypercementosis and inter-radicular dentine dysplasia;
- 15) supernumerary teeth.

While individual features are not specific to ERS, they are pathognomonic when they occur together in children in the absence of other developmental abnormalities. Nephrocalcinosis is not always detected, in part reflecting that it is not investigated rather than due to its absence. We cannot exclude the possibility that it is not detectable in children. Using the orodental clinical features listed above, diagnosis can be made as early as 5 years of age, based solely on enamel defects and radiographic features observed on the panoramic radiograph. The dental radiographic images are per se diagnostic (Figure 1). Subsequently, such patients should be referred to a nephrologist for evaluation and follow-up as well as to a clinical geneticist.

Differential diagnosis

AI occurs either in isolation or as part of a syndrome (such as Jaffe syndrome [47], Raine syndrome [48], epidermolysis bullosa [49], tricho-dento-osseous syndrome [50]). A review of literature published since 1972 shows several reports with confusing and incomplete characterization of ERS. Severe hypoplastic enamel constitutes the first element of differential diagnosis. Hypomaturation or hypocalcified AI have never been described in ERS. Multiple diagnostic features, as described above, should be present together. Isolated association, such as AI and gingival fibromatosis, AI and hamartoma, and AI and tooth delayed eruption, may reflect other rare AI diseases. Nibali et al., for example, described patients with gingival hyperplasia and AI [51]. Enamel appeared as in hypomaturation type AI with diffuse opacities covering the entire crown. No root or crown dysmorphology was described and pulp stones were absent. Eruption pathways and timing were normal, arguing for a diagnosis distinct from ERS. AI and hamartoma has been reported isolated or in several syndromes such as Cowden syndrome [52], Von Recklinghausen disease [53], and familial tuberous sclerosis [54]. Only a few cases of them appear to correspond to a complete description of ERS (Table 1 and Additional file 1) [31,32,35].

Table 2 List of all *FAM20A* mutations reported in the literature

Location	cDNA	Protein	Mutation status	Reference	Patient	Number of patients	Sex
Exon 1	c.14_cdelCT	p.Leu124del76	Hom	Cho et al. [14]	Family 1	3	1 Female
Exon 1	c.34_35delCT	p.Leu174del67	Hom	Augugliaro et al. [17]	Family 6	1	1 Atax
Exon 1	c.34_35delCT	p.Leu174del67	Het	Augugliaro et al. [17]	Family 16	7	2 Females
Exon 1	c.17-17dupA	p.Val67dup5	Hom	Galal et al. [22]	Family 1	12	10 Males, 2 Females
Exon 1	c.73C>T	p.Arg75*	Het	Augugliaro et al. [17]	Family 11	2	1 Atax, 1 Female
Exon 1	c.114_130del19	p.Leu114Gly122	Del	Kerteszova et al. [21]	Family 1	1	1 Male
Exon 1	c.185-187>C		Del	Wang et al. [24]	Family 1	3	1 Female
Exon 2	c.189C>T	p.Arg189*	Hom	O'Sullivan et al. [20]	Family 1	4	1 Female
Exon 2	c.192C>T	p.Val192*	Del	Wang et al. [24]	Family 2	2	2 Males
Exon 2	c.459C>T	p.Arg159*	Hom	Augugliaro et al. [17]	Family 5	1	1 Female
Exon 2	c.518T>G	p.Leu175Arg	Hom	Augugliaro et al. [17]	Family 9	1	1 Atax
Exon 2	c.594-1G>A		Del	Jouequand et al. [15]	Family 2	2	1 Male, 1 Female
Exon 2	c.595-78>E	p.Asp157_4914del64	Del	Cho et al. [19]	Family 4	1	1 Female
Exon 3	c.612delC	p.Leu185Cys111	Del	Augugliaro et al. [17]	Family 16	2	1 Female
Exon 3	c.671_114del	p.Arg114del576	Del	Jouequand et al. [15]	Family 11	2	1 Male, 1 Female
Exon 4	c.719-1G>C		Del	Augugliaro et al. [17]	Family 5	2	1 Male, 1 Female
Exon 4	c.723delG	p.Gln119/627del	Hom	Wang et al. [24]	Family 2	1	1 Male
Exon 5	c.742C>T	p.Val147*	Del	Jouequand et al. [15]	Family 10	1	2 Female
Exon 5	c.770C>T	p.Arg149*	Het	Augugliaro et al. [17]	Family 11	2	1 Male, 1 Female
Exon 5	c.776_777delCT	p.Phe148del	Del	Jouequand et al. [15]	Family 12	2	1 Male, 1 Female
Exon 5	c.812-177>G		Hom	Augugliaro et al. [17]	Family 14	1	1 Female
Exon 5	c.815-78>E	p.Arg171Ser170	Hom	Cho et al. [19]	Family 2	4	3 Males, 1 Female
Exon 6	c.826C>T	p.Arg169*	Del	Cho et al. [19]	Family 4	1	1 Female
Exon 6	c.907_908delAG	p.Ser183Gly176	Hom	Augugliaro et al. [17]	Family 15	3	2 Males, 1 Female
Exon 6	c.914_916delT	p.Phe186Lys174	Del	Jouequand et al. [15]	Family 2	2	1 Male, 1 Female
Exon 6	c.916_916delCTT	p.Phe186Lys176	Hom	Jouequand et al. [15]	Family 1	1	1 Male
Exon 6	c.915_916delCTT	p.Phe186Lys176	Het	Kerteszova et al. [21]	Family 1	1	1 Male
Exon 7	c.954G>A	p.Gly197Arg	Hom	Wang et al. [24]	Family 1	2	1 Male, 2 Females
Exon 8	c.1175_1176delGCTC	p.Arg201Ile172	Hom	Cho et al. [19]	Family 5	2	2 Atax
Exon 8	c.1207T>A	p.Arg203Gln	Het	Wang et al. [24]	Family 1	1	1 Female
Exon 9	c.1248_1249delGA	p.Asp119Pro175	Del	Jouequand et al. [15]	Family 16	1	1 Female
Exon 9	c.1309GA>G		Del	Kerteszova et al. [21]	Family 2	1	1 Female
Exon 10	c.1348_1349delTC	p.Ser456Pro170	Del	Augugliaro et al. [17]	Family 5	2	1 Male, 1 Female

Table 2 List of all *FAM20A* mutations reported in the literature (Continued)

Intron 10	c.1061-4del		Hom	Wang et al. [24]	Family 2	2	1 Male; 1 Female
Exon 11	c.1569A>T	p.Y457*	Hom	Wang et al. [17]	Family 12	1	1 Female
Exon 11	c.1122C>T	p.Arg138*	Hom	Jakobcubery et al. [17]	Family 8	1	1 Male
Exon 11	c.1122C>T	p.Arg138*	Het	Wang et al. [14]	Family 2	2	1 Male; 1 Female
Exon 11	c.1460G>T	p.H484Y*11	Het	Kanayama et al. [21]	Family 7	1	1 Female
Exon 11	c.1191_1192dupAACCCAC	p.Gln364ins15	Hom	Jakobcubery et al. [17]	Family 4	2	1 Male; 1 Female
Exon 11	c.1555G>A	p.L505V*22	Hom	Wang et al. [17]	Family 7	3	1 Male; 1 Female
Total reported	40 (55 unique mutations)		15 Hom; 22 Ht		20 Families	60 Index cases	17 Males; 28 Females

Hom: homozygous; Ht: heterozygous; *denotes stop codon

Finally, renal disease and enamel defects can also be present in pathologies other than ERS. Enamel defects are a frequent finding (58.3%) in patients affected by renal disorders [5]. Indeed, the kidney is central to regulation of calcium and phosphate homeostasis. Different renal proteins previously known to play a role in the systemic pH homeostasis in mammals, have also been described to be expressed during ontogenesis: the carbonic anhydrase II [56], the acid-base exchangers AE2, NBCe1 and NHE1 [57,58]. Suda *et al.* described a patient with severe AI and poly cystic kidney disease leading to nephrocalcinosis [15], caused by a mutation in *MSX2*. Panoramic radiography revealed no pulpal stones and no eruption anomalies. Fu *et al.* described a patient with ERS associated with hypokalemic metabolic alkalosis and impaired renal concentration [39]. Besides nephrocalcinosis, the dental and renal phenotypes did not correspond with those seen in ERS, suggesting this patient was wrongly diagnosed with ERS. This reinforces the importance of a detailed oral clinical examination, rather than exclusively focusing on AI.

Genetics and genetic counseling

Combining homozygosity mapping and whole exome sequencing, O'Sullivan *et al.* identified the first homozygous mutation in *FAM20A* in a consanguineous family with AIGFS [20]. To date, 40 (33 unique) recessive *FAM20A* mutations have been identified in 29 ERS families (MIM#204650) (Table 2). ERS/AIGFS is a recessive inherited disease with either homozygous or combined heterozygous *FAM20A* mutations and is likely one unique syndrome. Heterozygous carriers appear to be phenotypically healthy. *FAM20A* is located on chromosome 17q24.2, is 65,839 base pairs long and consists of 11 exons. All but 2 of the 33 identified mutations lead to premature stop codons (Table 2). The remaining two are non-synonymous mutations in well-conserved regions of the protein [18].

Natural history and prognosis

Pediatric dentists are usually the first health practitioners to see affected patients due to AI and delayed eruption of permanent teeth. Due to the association of this specific oral phenotype with nephrocalcinosis, patients should be referred to a nephrologist for assessment. The natural evolution of nephrocalcinosis associated with *FAM20A* mutations is not well established. Two patients were reported to have died prematurely before the age of thirty: one had coronary occlusion and the other developed chronic pyelonephritis [5]. One author reported that the medullary calcification became coarser and denser as his patients aged from 8 years to 14 years old [10]. Three patients experienced acute or chronic pyelonephritis, 1 had urinary calculus [7,9,14] and 1 developed chronic renal failure [8]. For the remaining patients with nephrocalcinosis, no

anomalies or major complications were reported [11-13,17], in line with the clinical history of *Fam20a* γ mutant mice, which depicted a partial resolution of ectopic mineralization in muscular arteries and lungs as the mice matured [42]. A regular follow-up of the nephrocalcinosis and evaluation of kidney function throughout childhood and adulthood may enable the initiation of preventive treatment before the occurrence of renal failure.

Except for gingival hyperplasia, for which gingivectomy is successful with no recurrence reported, the occlusal phenotype is often complex to manage [30,33]. AI results in considerable morbidity; affected individuals have teeth with poor function and aesthetics, have lower self-esteem and report an inferior quality of life [59]. Dental wear and aesthetics are the main motives for the initial consultation, but absence of eruption is the most challenging problem to solve. Only erupted teeth can be restored with conventional treatments such as ceramic crowns for example [8]. More severe cases are however characterized by a large number of non-erupted teeth, forcing complete rehabilitation with overdentures. Long-term follow-up reveals that teeth with follicle hyperplasia do not erupt and the extraction of primary teeth does not facilitate the eruption of permanent teeth. Orthodontic traction has been tested to bring them in occlusion, but results have been slow and inconsistent. The absence of a global therapeutic consensus concerning non-erupted teeth complicates dental surgery.

Conclusion

A careful review of the published literature and case reports highlights a significant overlap in the oral phenotype between cases of AI with hamartomas, unerupted teeth, AIGFS and ERS. Recently, recessive mutations in *FAM20A* were shown to be responsible for both AIGFS and ERS. Supported by the phenotype observed in *Fam20a* null mice, human phenotypic and genetic data suggest that, rather than being allelic, ERS and AIGFS are in fact the same syndrome. The phenotype is characterized by severe enamel hypoplasia, delayed or absent tooth eruption, ectopic eruption pathway, and pulp and gingival calcification in temporary and permanent dentition. Gingival hyperplasia typically accompanies these features but is more variable, ranging from discrete to severe. We propose that all affected patients be categorized under the term ERS, and that the 2 OMIM entries (ERS; MIM#204650, AIGFS; MIM#614253) be fused. Since the oral phenotype in the absence of other developmental health problems is pathognomonic, dentists have a key role in the diagnosis and referral of patients to both nephrologists for renal assessment and to geneticists to identify the causative *FAM20A* mutations.

Additional file

Additional file 1: Detailed description of oral phenotype of reported cases with clinical features potentially describing Bramel Renal Syndrome.

Abbreviations

AI: Amelogenesis Imperfecta; ACP: Amelogenesis Imperfecta and gingival fibromatosis syndrome; BR: bramel renal syndrome; FAM20A: family with sequence similarity 20 member A; FGF23: fibroblast growth factor 23

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MCM, MC, ACG, and the remainder AM, MG, AS, ABZ, VM, contributed to work the version of the manuscript. Alanchers-Sun and updated the final manuscript. VM and MC provided the genotype of N. patients.

Acknowledgements

We would like to thank all participating patients and families who were involved in this study. The Reference Center for Rare Oral Disease of Paris and Strasbourg and the national rare disease project (WeCo) database consent was obtained from all patients (or guardians) participating in the study. The authors would like to acknowledge the technical help of Audrey Verdier, F. Anne-Claire Lef, Fr. Mathieu Schmidt and M. Margaux Frenel for the proofreading of the manuscript.

Grant from other authors

This work (MG, MCM, ABZ) was supported by a grant from the French University Paris Diderot (UMR) and by INSERM (UMR 702). This work (VM) was supported by CNRS (Paris-Saclay A Team).

This study was supported by Copernic (Paris, France) (MCM, VM, MG, MCM, VM).

This work (ASZ) was initiated by grants from the University of Strasbourg, the French Ministry of Health National Program for Clinical Research (ANR-2005-14-01 Amelogenesis Imperfecta) and the French League Against the Highways (Association de Strasbourg (AP), 2004-2007). The development of the oral cavity from dental development in humans' nature (single gene or 2e gene) is determined by FGF3 and the FGF3-like gene (F302) A27. The genetic manifestations of this disease, an AI-FAM20A-Oral cavity Syndrome (AI-FCO), were reported in a paper (this project).

This work was supported by the Belgian Science Policy Office (inter-university Attraction Poles (IAP) and the program through the project (PFR) (MCM, VM) and the FRS-FNRS grant (4472) (Frenel-Claire Lefebvre-Schmidt) (both to VM). We also acknowledge the support of the Communauté française de Woluwe-Bruxelles and of the Université de la Région wallonne (Belgium).

This work (VM) was supported by a grant from the Wellcome Trust (097010).

Author details

¹Laboratoire de Molecular Oral Pathology, INSERM UMRI 1131, Cochin, Research Center, Paris, France. ²Centre of Oral Malocclusion of the Face and Oral Cavity (MA-ALL) - Centre Pathologic Oral - Paris. ³Laboratoire of Human Medical Genetics de l'INSERM Institut, univ. de Strasbourg de Strasbourg, France. ⁴Equipe "Mise en Contexte des Maladies Rares", University Hospital of Strasbourg, University of Strasbourg, Strasbourg, France. ⁵Department of Dentistry, Health Sciences, and University of Bristol, Bristol, United Kingdom. ⁶School of Dentistry, the University of Leeds, Leeds, UK. ⁷Faculty of Dentistry, University of Liverpool, L69 3GB, Liverpool, France. ⁸The Centre for Craniofacial Malocclusions of Rare Diseases, Public Medicine at UN Angers, Hôpital Pasteur, Hôpital Universitaire de Strasbourg (HUS), Strasbourg, France. ⁹Faculté de Médecine, Université de Strasbourg (UMS) Université de Strasbourg, Strasbourg, France. ¹⁰INSERM U104 - Inserm U104, Paris, France. ¹¹Department of Genetic Medicine, UMR 1132 Institut de Médecine des Strasbourg, France.

Received: 18 April 2014 Accepted: 20 May 2014
Published: 14 June 2014

References

1. Nishii M, Hoshi U, Imai H, Saitoh A, Wada T. Phenotypic diversity and revision of the nomenclature for autosomal recessive amelodonts imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2012, **7**:162. doi:10.1186/1745-2751-7-162
2. Williams TJ. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Maxillofac Surg* 1988, **46**:47-55.
3. Bramel P, Sun A, Szeltoni H, S. de la Cruz M (Orphanet) Amelodonts and dentinogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2012, **7**:162.
4. Lefebvre-Claire F, Anne-Claire Lefebvre-Claire F. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2007, **2**:7.
5. Macdonald G. Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Aust Dent J* 1972, **17**:61-62.
6. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Two cases of familial hypomagnesaemia with hypoparathyroidism and nephrocalcinosis. *Orphanet J Rare Dis* 2006, **1**:16.
7. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypoparathyroidism syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents. *Orphanet J Rare Dis* 2005, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
8. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta with renal disease: a report of two cases. *J Oral Pathol Med* 2007, **106**:54-57.
9. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. Case studies of clinical features and ultrastructure of teeth enamel in two siblings. *J Oral Pathol Med* 1983, **7**:204-212.
10. Marzulli M, Anjo L, Marchi F, Vitropo L. J. Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal compensation, and possible abnormality of calcium metabolism. *Am J Med Genet* 1985, **20**:311-312.
11. Marzulli M, Anjo L, Marchi F, Vitropo L, J. Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal compensation, and possible abnormality of calcium metabolism. *Am J Med Genet* 1985, **20**:311-312.
12. Marzulli M, Anjo L, Marchi F, Vitropo L, J. Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal compensation, and possible abnormality of calcium metabolism. *Am J Med Genet* 1985, **20**:311-312.
13. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis: a new case of this rare syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **27**:177-178.
14. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis: a new case report of a rare syndrome associated with amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous family. *Arch Oral Biol* 2003, **48**:227-232.
15. Prasad S, Prasad S, Prasad S, Prasad S, Prasad S, Prasad S. Ultrastructural study of teeth enamel with amelogenesis imperfecta in a consanguineous syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2005, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
16. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and polydactyly disease. *Orphanet J Rare Dis* 2003, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
17. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and polydactyly disease. *Orphanet J Rare Dis* 2003, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
18. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and polydactyly disease. *Orphanet J Rare Dis* 2003, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
19. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and polydactyly disease. *Orphanet J Rare Dis* 2003, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
20. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and polydactyly disease. *Orphanet J Rare Dis* 2003, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
21. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and polydactyly disease. *Orphanet J Rare Dis* 2003, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17
22. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M, Szeltoni H, S. de la Cruz M. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and polydactyly disease. *Orphanet J Rare Dis* 2003, **1**:17. doi:10.1186/1745-2751-1-17

V. Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta [123]

Résumé

Cet article décrit 4 familles (3 consanguines) dont les membres atteints présentent un retard de croissance staturale, une brachyolmie et une Amélogénèse Imparfaites hypoplasique. Ce phénotype avait déjà été décrit en 1996 par Verloes. Ici, le séquençage à haut-débit par exome a permis de mettre en évidence des mutations récessives dans le gène *LTBP3*, qui intervient dans la voie de signalisation TGF-beta. L'expression, de ce gène durant le développement de la souris et l'odontogénèse a également été étudié. Les résultats montrent un émail très fin, voire absent sur les incisives et les molaires du modèle de souris KO, correspondant bien au phénotype d'AI chez l'homme [23, 122, 125, 126, 135, 138, 228-264].

ORIGINAL ARTICLE

Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta

Mathilde Huckert^{1,2,7,†}, Corinne Stoetzel^{1,†}, Supawich Morkmued^{2,3,11}, Virginie Laugel-Haushalter³, Véronique Geoffroy¹, Jean Muller^{3,4,8}, François Clauss^{7,5,7}, Megana K. Prasad¹, Frédéric Obry^{7,7}, Jean Louis Raymond⁷, Marzena Switala^{2,7}, Yves Alernbik⁹, Sylvie Soskin¹⁰, Eric Mathieu⁶, Joseph Hemmerlé⁶, Jean-Luc Weickert³, Branka Brukner Dabovic¹², Daniel B. Rifkin¹², Annelies Dheedenc¹³, Eveline Boudin¹⁴, Oana Caluseriu¹⁵, Marie-Claude Cholette¹⁵, Ross Mcleod¹⁵, Reynaldo Antequera¹⁶, Marie-Paule Gellé^{17,18}, Jean-Louis Coeuriot¹⁷, Louis-Frédéric Jacquelin¹⁷, Isabelle Bailleul-Forestier¹⁹, Marie-Cécile Manière^{2,7}, Wim Van Hul¹⁴, Debora Bertola²⁰, Pascal Dollé^{3,†}, Alain Verloes^{21,†}, Geert Mortier^{13,14,†}, Hélène Dollfus^{1,3,4} and Agnès Bloch-Zupan^{2,3,7,*}

¹Université de Strasbourg, Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM UMR 1112, Faculté de Médecine, FMTS, 11 rue Humann 67000 Strasbourg, France, ²Université de Strasbourg, Faculté de Chirurgie Dentaire, 8 rue St Elisabeth, 67000 Strasbourg, France, ³Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), CERBM, INSERM U 964, CNRS UMR 7104, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, Illkirch 67404, France, ⁴Université de Strasbourg, Laboratoire iCube UMR 7357, CNRS, LBG1, Strasbourg, France, ⁵Université de Strasbourg, Osteoarticular and Dental Regenerative Nanomedicine, Inserm UMR 1109, 11 rue Humann 67000 Strasbourg, France, ⁶Université de Strasbourg, Biomaterials and Bioengineering, Inserm UMR 1121, 11 rue Humann, 67000 Strasbourg, France, ⁷Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Reference Centre for Orofacial Manifestations of Rare Diseases, CRMR, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, ⁸Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Laboratoire de Diagnostic Génétique, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, ⁹Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Génétique Médicale, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, ¹⁰Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Service de Pédiatrie 1, Endocrinologie Pédiatrique, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France, ¹¹Faculty of Dentistry, Khon Kaen

* These authors contributed equally to the work.

† Senior authors.

Received: November 15, 2014; Revised and Accepted: February 6, 2015

© The Author 2015. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com.

University, Khon Kaen, Thailand. ¹²Department of Cell Biology, NYU Langone Medical Centre, New York, USA, ¹³Center for Medical Genetics, Ghent University, Ghent University Hospital, De Pintelaan 185, Ghent 9000, Belgium, ¹⁴Department of Medical Genetics, University of Antwerp and Antwerp University Hospital, Prins Boudewijnlaan 43, Edegem 2650, Belgium, ¹⁵Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Calgary, Alberta Children's Hospital, Calgary, AB, Canada, ¹⁶Dentistry Division, HC/FMUSP, São Paulo, Brazil, ¹⁷Faculté d'Odontologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2 rue du Général Koenig, Reims 51100, France, ¹⁸Laboratoire EA 4691 'BIOG', 1, rue du Maréchal Juin, Reims 51100, France, ¹⁹Faculty of Dentistry, Paul Sabatier University, LU51, Pôle Odontologie, Hôpitaux de Toulouse, 3 Chemin des Maraichers, Toulouse, France, ²⁰Unidade de Genética do Instituto da Criança, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil and ²¹Département de Génétique – Hôpital Robert Debré, CRMR 'Anomalies du Développement & Syndromes Malformatifs', CRMR 'Déficiences Intellectuelles de Causes Rares', 48 bd Sérurier, Paris 75019, France

To whom correspondence should be addressed at: Faculty of Dentistry, University of Strasbourg, 8 rue St-Étienne, 67000 Strasbourg, France. Tel: +33 36853919; Fax: +33 36853930; Email:agnes.klein-supern@unistra.fr

Abstract

Inherited dental malformations constitute a clinically and genetically heterogeneous group of disorders. Here, we report on four families, three of them consanguineous, with an identical phenotype, characterized by significant short stature with brachyolmia and hypoplastic amelogenesis imperfecta (AI) with almost absent enamel. This phenotype was first described in 1996 by Verloes et al. as an autosomal recessive form of brachyolmia associated with AI. Whole-exome sequencing resulted in the identification of recessive hypomorphic mutations including deletion, nonsense and splice mutations, in the *LTPB3* gene, which is involved in the TGF-beta signaling pathway. We further investigated gene expression during mouse development and tooth formation. Differentiated ameloblasts synthesizing enamel matrix proteins and odontoblasts expressed the gene. Study of an available knockout mouse model showed that the mutant mice displayed very thin to absent enamel in both incisors and molars, hereby recapitulating the AI phenotype in the human disorder.

Introduction

Brachyolmia (from the Greek *brachy* 'short') refers to a heterogeneous group of skeletal dysplasias with as major clinical feature a disproportionate short stature with short trunk. Radiographic abnormalities are predominantly present in the axial skeleton and include generalized platyspondyly (i.e. flattened vertebral bodies). Amelogenesis imperfecta (AI) is a defect in enamel formation and mineralization (1). AI can be an isolated finding or occur in association with other anomalies (syndromic AI) (2). In 1996, Verloes et al. (3) described an autosomal recessive form of platyspondyly with AI (MIM 611016). Absence of enamel and oligodontia were the major dental findings. Serrin et al. (4) subsequently published two other families, one of them with abnormal yellow coloration of primary and permanent teeth, as well as retarded dental eruption compatible with a diagnosis of AI. Here we report on four families, three of them being consanguineous, with an identical phenotype, characterized by platyspondyly (brachyolmia) and AI. Affected individuals have very thin or almost absent enamel. By using a combined strategy of homozygosity mapping and whole-exome sequencing, recessive mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (*LTPB3*) gene were identified. Analysis of *Ltpb3* expression during mouse development and the study of dental anomalies observed in the *Ltpb3*^{-/-} knockout mouse model underscored the key role of the latent TGF-beta binding protein 3 in amelogenesis and skeletal development.

Results

Patients' phenotype

The index family 1 presented with AI and short stature. The almost complete absence of enamel in both primary and permanent

dentitions (Fig. 1A and B) led to the diagnosis of hypoplastic AI, thereby explaining the yellow, small and spaced appearance of the teeth. The panoramic radiographs confirmed the absence of enamel associated with large pulp chambers and ramodontic molars (Fig. 1C). Class III mandibular prognathism encountered in family 1 was due to maxillary underdevelopment (Fig. 1D). Radiographs of the skeleton revealed brachyolmia (Fig. 1E and F).

Subsequently, three additional families with a similar phenotype were identified. Additional bone anomalies such as osteopenia and scoliosis were present in family 4. Missing teeth (family 4) and retarded teeth eruption (family 3) were also reported.

Enamel shows quantitative and qualitative defects

The enamel structure of a permanent tooth, the left upper second premolar (25) extracted within the course of treatment of patient IV-1 of family 1 was further analyzed by scanning electron microscopy (Fig. 1G and H). With this evaluation the enamel hypoplasia was confirmed and very thin or absent enamel was noted. Dentin was normal. The initial aprismatic enamel layer was absent. A very thin shell of irregular prismatic enamel (PE), with a reduced thickness thinner than 150 µm (instead of 300 µm comparatively at the same site on a control tooth), was deposited covering the dentin scaffold. In this layer, a Hunter-Schreger band pattern, featuring the arrangement of enamel prisms, was present. In these areas, no aprismatic outer layer was deposited. However in some areas, amelogenesis continued and some 'tubling' of non-prismatic enamel (NPE) occurred on top of this basal but enamel layer. Waves of aprismatic and prismatic enamel alternated. The outermost layer was always aprismatic in areas where enamel formation continued.

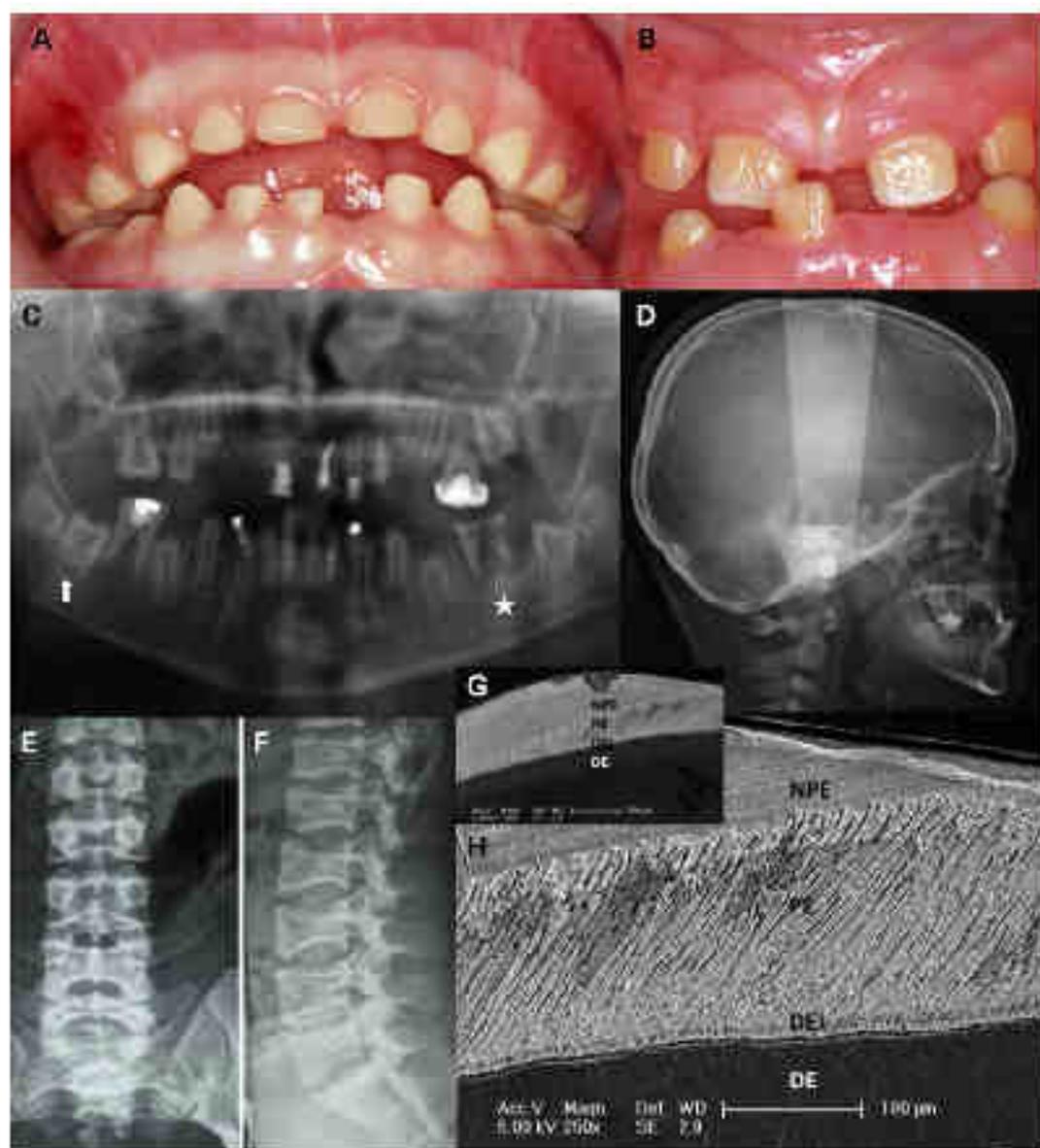


Figure 1. Phenotypic data on family 1. (A) Intraoral view of individual IV-1 (at age 5 years). All primary teeth are smaller and wider with showing thin enamel sheets, enamel. The eruption is good. (B) Intraoral view of individual IV-3 (at age 7 years). The erupting permanent incisors are yellow and small due to a congenital defect. Primary teeth were lost due to recurrent infections. (C) Panoramic radiograph of individual IV-3 (at age 9 years) showing erupted and non-erupted permanent teeth with anomalies. The teeth are missing. The pulp chamber appears large. In addition, a congenitally acquired malocclusion of pulp spaces is visible around the 36 (mandibular) and around the roots of the lower left first permanent molar (distal) in the absence of the pulp chamber. (D–F) Radiographs taken from individual IV-2 (first at age 2 years and again at age 24 years). (D) Radiograph reveals a cleft palate, protrusion of maxilla and mandible proportions secondary to underdevelopment of the maxilla. The spine radiographs show platyspondyly with indentations of both upper and lower vertebral endplates. (E) The cervical radiograph analyzed at the ultrastuctural level through SEM revealed a thin PE layer directly starting at the dentin-enamel junction (DEJ). In some cases enamel formation continued as an additional layer (NPE). Dentin (DE) was absent. (H) Close up of the PE and NPE 3.0 μm layer.

Mutations in *LTPB3* underlie syndromic AI with brachyolmia

Whole-exome sequencing was performed independently in two different labs in families 1 and 2 and in families 3 and 4. Coverage and variant calling data for families 1 and 2 are provided in Supplementary Material, Table S1.

A single gene, *LTPB3*, was found to carry biallelic mutations in all affected individuals from the four families (Fig. 2A and B).

In family 1, we identified a homozygous 14 bp deletion, c.[2071_2084del]ACCGGCTCAAGC (Table 1 and Fig. 2A). This mutation lies within a zone of homozygosity that is shared between the two affected individuals, but that is absent in the unaffected sibling and parents (Supplementary Material, Fig. S1).

In family 2 we identified compound heterozygosity for a nonsense and a splice donor site mutation c.[420G>T];[551+5G>T]. In families 3 and 4 homozygosity for a single nucleotide deletion was found [c.[2215_2217del]G] in family 3 and c.[2356_2357del]G

Table 1. Mutations described in LTBP3 (NM_001130144.2)

Family	Affected	Ethnic origin	Exon	Chromosomal position (hg19)	cDNA change	Protein change
1.	Two siblings	Turkey	Exon 14	g.65318933	c.2071_2094delTACGGGCTCAAGGC [2071_2084delTACYGGCTCAAGGC]	p.(Tyr691Leu) ^{del} 65 [Tyr691Leu] ^{del} 95
2.	Two siblings	Caucasian French	Exon 2 and 8	g.65321782	c.424C>T [c.231-1C>T]	p.(Cln24) ^{del} (1)
3.	One boy	Brazil	Exon 13	g.65314280	c.2216_2217delG; [2216_2217delG]	p.(Gly739Ala) ^{del} (1) [Gly739Ala] ^{del} (7)
4.	Three siblings	Pakistan	Exon 17	g.65311018	c.2256_2257delGG; [2256_2257delGG]	p.(Val786Ile) ^{del} (2)

Mutations affecting splice site in italics.

in family 4). All mutations segregated with the disease phenotype in each family and were confirmed by Sanger sequencing (Fig. 4). In addition, they were absent in the Exome Variant Server (EVS) and the Thousand Genomes Project Catalog. Interestingly a single nucleotide insertion (c.2216_2217insG; p.Gly740Argfs*51) was tabulated in EVS in the homozygous state in 7 out of more than 6000 individuals. However, coverage information was not available for these individuals to verify if this is a false or true positive variant.

The LTBP3 mutations identified in our families are most likely hypomorphic. The 14-bp deletion found in family 1 does not seem to result in nonsense-mediated decay because it was present in RNA extracted from a gingival biopsy of patient IV.1 (Supplementary Material, Fig. S2). The mutation most likely gives rise to a truncated protein that lacks the terminal G12 amino acids, which encode essential functional domains (epidermal growth factor like-domain, TB domain, SCF-like calcium-binding domain and insulin-like growth factor binding protein domain) of the protein (Fig. 2C). The splice-site mutation in family 2 is predicted to cause an in-frame skipping of exon 8. The remaining mutations, one nonsense mutation and two single nucleotide deletions, are expected to result in nonsense-mediated decay through the creation of a premature stop codon.

Expression pattern of Ltbp3 in developing mouse bone and tooth

To gain insight into Ltbp3 expression during bone and tooth development in mice, we performed an *in situ* hybridization analysis using a digoxigenin-labeled antisense riboprobe generated from the same DNA template as previously used by the LdbExpress consortium (www.euroexpress.org). Mouse embryos were analyzed at E14.5, E18.5 and E18.5. Ltbp3 transcripts were detected in several developing tissues and organs. Expression was found in various developing bones undergoing either endochondral or intramembranous ossification (e.g. the vertebrae (Fig. 3A); mandibular bone (Fig. 3B); base of the skull bones (Fig. 3C)). Expression was also detected in the ventricular and subventricular zones of the developing brain vesicles (Fig. 3D), and in cells surrounding the lumen of the neural tube (the spinal cord primordium (Fig. 3E)). Discrete expression was observed in the developing inner ear (cochlea (Fig. 3C)). Ltbp3 transcripts were detected in the small and large intestine, with most conspicuous expression at the base of the intestinal crypts (Fig. 3F). Weaker expression was seen in the differentiating lung (Fig. 3F), whereas discrete expression was observed in the heart outflow tract (not shown) and in the wall of the large blood vessels such as the aorta and pulmonary artery (Fig. 3F).

Ltbp3 expression pattern was also investigated during tooth development. In a large scale gene expression study (www.euroexpress.org), Ltbp3 transcripts were detected at E14.5 cap

stage of tooth development (9). This also has been documented in a mouse tooth cap stage transcriptome analysis (6). Our analysis confirmed these data. In addition we investigated more precisely Ltbp3 expression at various stages of tooth development (Fig. 3G, I and K: lower incisor and I.1) and E molar). Ltbp3 transcripts were observed at E14.5 in cap stage teeth, at E18.5 in the epithelial and mesenchymal compartments of the bell stage teeth, especially in the most differentiated areas such as the molar cusp tips and the roots) part of the incisors. At E18.5 labeling was observed in differentiating ameloblasts and odontoblasts. Transcripts were scattered at the apical secretory pole of ameloblasts.

Ltbp3^{-/-} mouse dental phenotype

We further explored the dental phenotype of Ltbp3^{-/-} mice described in (7–9) by X-ray micro-computed tomography (microCT) and histological analysis to compare morphological phenotype in mouse (10) and human. Ltbp3^{-/-} mutant mice displayed enamel defects with very thin to absent enamel in both incisors and molars (Fig. 4). Hence, the Ltbp3^{-/-} mouse model clearly recapitulates the AI phenotype observed in our patients. Mandibular relative class III prognathism due to maxillary underdevelopment, seen in patients IV.1 and IV.2 of family 1, was also present in the mutant mouse model. Histological analysis of continuously growing incisor enamel organ revealed a cohesive, however at defined localizations, non-palisadic ameloblasts layer facing a thinner disorganized enamel matrix (Fig. 4M) confirming at the cellular level the dysfunction of amelogenesis.

Discussion

Using a combined strategy of homozygosity mapping and whole-exome sequencing in four unrelated families with the association of brachygnathia and AI, we identified the LTBP3 (latent TGF-beta binding protein 3) gene as the underlying causal gene responsible for this rare autosomal recessive disorder (MM 601 216). Mutations in the LTBP3 gene have already been reported in individuals with oligodontia (5), a dental developmental disorder defined by the absence of more than six permanent teeth. The question therefore arises if mutations in LTBP3 can cause different dental phenotypes and how we can explain the presence of our dental manifestations such as brachygnathia in our families.

One gene associated with different phenotypes?

A homozygous nonsense mutation in the LTBP3 gene was first reported in a non-angustocrotic Pakistani family with oligodontia (5).

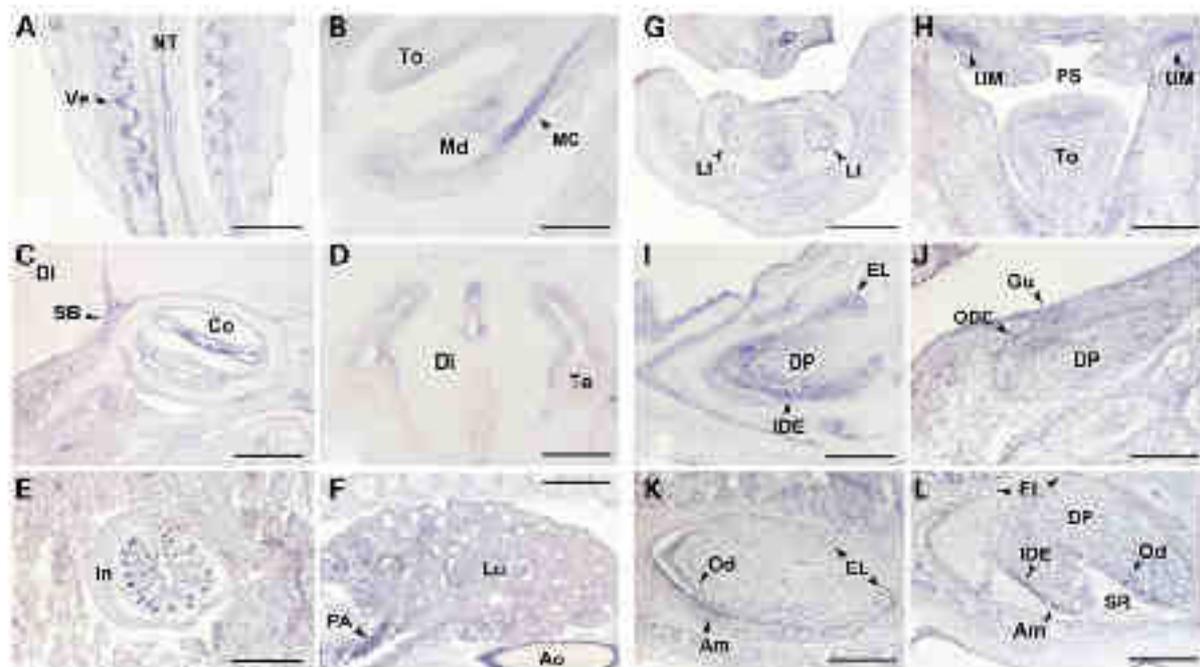


Figure 3. Analysis of mouse *Ltbp3* transcript distribution by in situ hybridization. Selected sections illustrate *Ltbp3* expression features in the developing bone, central nervous system and viscera as shown in the left side panels (A-F), whereas right-side panels focus on intestine (G, I and K) and aorta (H, J) and on tooth development. Developmental stages and section planes are: E18.5 frontal (A, D, E, G and H), E18.5 sagittal (B, C, I and J); E18.5 sagittal (L, K and M) sections. Am, ameloblasts; Ao, aorta; Co, cornea; Di, diaphragm; EL, epithelial layer; Gu, gingiva; LIM, upper lip; Li, liver; Lu, lung; Md, mandible; MC, maxillary cartilage; MT, maxillary tubercle; ODC, oral dental epithelium; PA, pulmonary artery; PS, palatal shelves; SB, scleral bone; SR, stratified epithelium; Ta, tongue; To, tooth; Vt, vertebrae. Scale bars: A, D and H: 40 μ m; B, E and I: 20 μ m; C, K and L: 20 μ m; G and J: 150 μ m.

Based on the available data in the report, we believe that the oligodontia phenotype in this family was either related to early loss of teeth due to enamel defects or caused by defective tooth development leading to absent teeth. Close examination of the skull X-ray of an affected patient in their published Figure 2 (3) clearly shows absent enamel and short roots in the remaining teeth, which suggests the diagnosis of an *AI*. Verices *et al.* also mentioned oligodontia as a feature in his family with brachyolmia and *AI* (3). Missing teeth were also found in our family 4. Oligodontia may therefore be part of the clinical spectrum of this condition. The affected individuals in the consanguineous Pakistani family with oligodontia also presented with short stature. Varying degrees of scoliosis were apparently present but no other skeletal anomalies were observed. The authors do not report flattening of the vertebral bodies in their family and no lateral views of the spine are shown in their article. They only describe a higher bone mineral density in the spine found by dual-energy X-ray absorptiometry. Although we cannot judge on the presence or absence of brachyolmia as cause of the short stature in the affected individuals, we believe that this reported family with oligodontia may be affected by the same disorder given the presence of a recessive mutation in the *LTBP3* gene.

LTBP3 and TGF-beta acting as partners

The *LTBP3* gene (NM_001130144.2; 11q22.1) spans 28 exons, has 20372 base pairs and generates 22 different transcripts (only two major transcripts with CDS number, eight without a protein and two resulting in nonsense-mediated decay).

LTBP3 codes for a protein of the extracellular matrix that is involved in regulation of TGF-beta secretion, trapping and

activation (11–13). *LTBP3* (1139 amino acids, NCBI RefSeq: NP_001157738.1; 1303 amino acids NM_001130144.2) is one of the four members of the *LTBP*/fibrillin family and can form a large complex with latent TGF-beta 1, 2 and 3 (14). The *LTBP* protein domain structure consists of EGF-like calcium binding conserved domains, 4 EGF beta binding protein-like (EB) domains also named eight cysteine repeats as well as insulin-like growth factor binding protein domains (Fig. 2). This domain structure is also found in TGF-binding protein and fibrillin.

LTBP3 and *AI*

TGF-beta 1, 2 and 3 are growth factors involved in various biological functions such as cell growth and differentiation, extracellular matrix secretion and remodeling. TGF-beta signaling is essential for hair and tooth growth especially enamel formation. Enamel is a complex structure secreted by ameloblasts presenting different successive stages during their life cycle. In mammals it is possible to recognize an initial prismatic enamel layer at the dentin-enamel junction deposited by secreting ameloblasts without Tomes' process, then the bulk of enamel with rod and interrod compartments forms with secreting ameloblasts with Tomes' process and finally the last-formed surface prismatic layer of enamel with the retraction of ameloblasts' Tomes' process (15). *Ltbp3* expression pattern in differentiating ameloblasts and odontoblasts is highly similar to that of TGF-beta1 (16–18). Blockade of TGF-beta signaling results in a failure of ameloblasts to produce an enamel layer in incisor teeth (11). Overexpression of TGF-beta1 in teeth results in detachment of ameloblasts and enamel defects (1,19). TGF-beta1 and TGF-beta receptor 1 (*TGFR1*) genes are strongly expressed in secreting

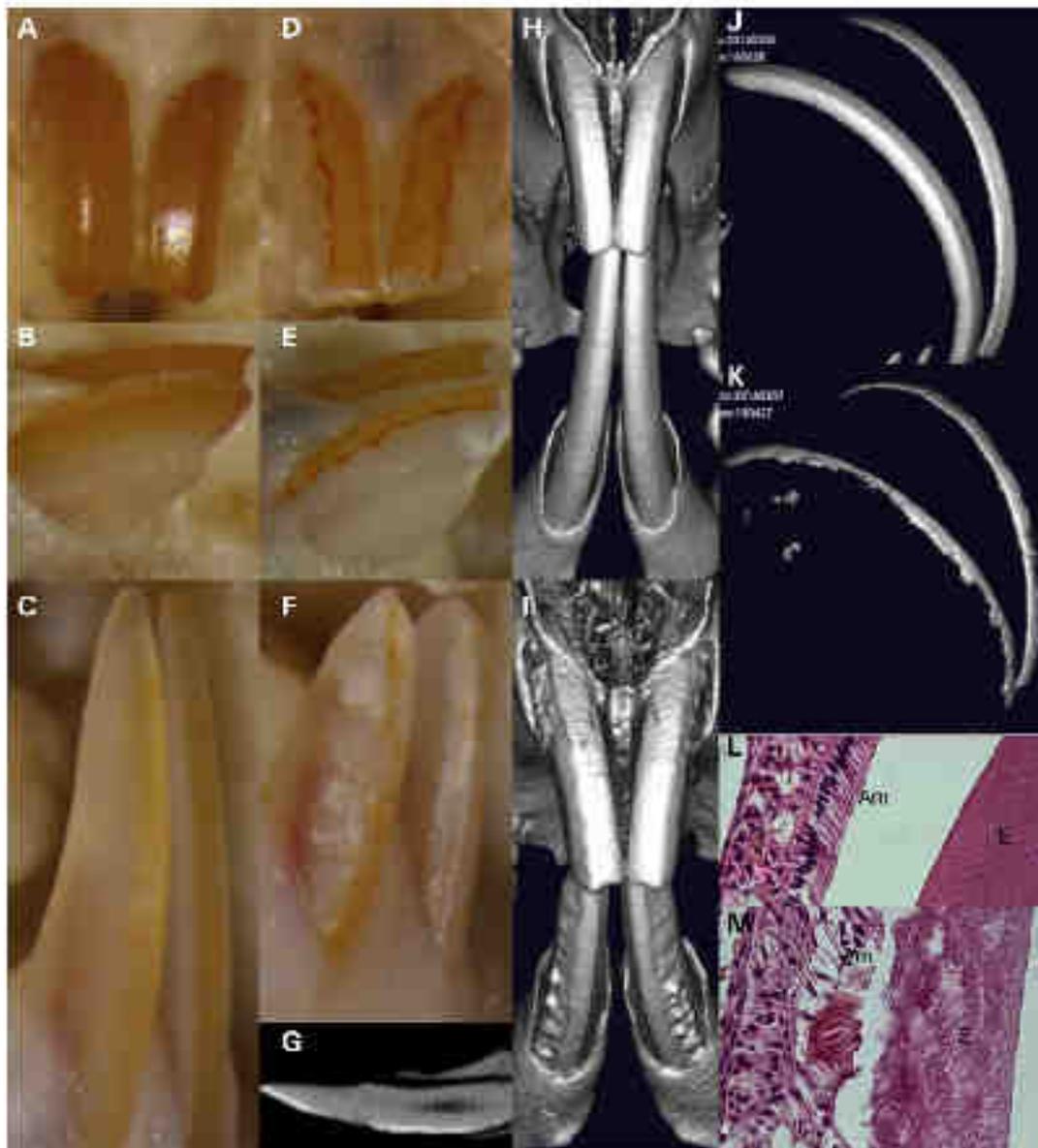


Figure 4. MicroCT and histological analysis of *Ulp3*^{-/-} mice. The Quantum FX[®] microCT (PerkinElmer) in Vivo Imaging System is a low X-ray dose system. Designed for longitudinal microCT in preclinical studies (Cabrera Ibañez, Inc., Popponet, VA, USA). Seven *Ulp3*^{-/-} mouse heads and seven WT littermates were analyzed. (A-C) Normal macroscopic aspect of the mouse upper (A, left; 2 side view) and lower incisors (C, side view). Note that the teeth are naturally colored yellow that enamel is present and present only on the labial side. The lower incisors are twice as long as the upper. (D-F) Normal teeth embedded in *Ulp3*^{-/-} mouse. The mutant with a decreased and an irregular labial enamel surface is present. (G) Appearance of lower incisor from *Ulp3*^{-/-} mouse as observed by X-ray imaging. Note irregular contour of this enamel, a hypoplastic area, with limited or no enamel, is seen on the labial side. (H-I) 3D reconstruction of microCT imaging demonstrating the outer surface appearance and contact between continuously growing incisors in a WT mouse (H) or *Ulp3*^{-/-} mouse (I). The enamel surface is reduced and the tooth surface irregular. (J-K) Normal (J: WT) and reduced (in size and density) enamel layer (K: *Ulp3*^{-/-} mouse), as observed when isolated from teeth through the highest transmission and therefore 3-ray density degree. (L) Normal ameloblasts (Ant) layer facing a highly organized decussated enamel (E) matrix. (M) In the *Ulp3*^{-/-} mouse, in certain areas, the ameloblast layer becomes erratic, the tubules and lead out a differently oriented thinner enamel matrix.

ameloblasts where they promote the expression of MMP20, an enamel matrix protease [20]. TGF-beta1 is also expressed later in the maturation-stage ameloblasts and seems to play an important role in ameloblast apoptosis [21]. In addition, TGF-beta1 is able to induce MMP4 (a protease degrading enamel proteins to increase mineralization) expression [22,23]. TGF-beta1 may also control cell layer integrity for ameloblasts [24].

The enamel defects, observed in our families, at the ultra-structural level (Fig. 1) with both the absence of the initial prismatic enamel layer and the abnormal secretion of non-prismatic bulk enamel, strongly suggest a role of *Ulp3* during the life cycle of ameloblasts especially at the secretory stages with Tomes process formation/modulation. The molecular mechanisms that control the formation, function and retraction of Tomes' process

are not well understood. However clear molecular differences exist between *NPE* and *PE* (25) and this may involve TGF-beta signaling. Transgenic mice presenting with enamel defects such as the amelotin (*AMTN*) overexpression model also exhibit enamel defects in relation with the disappearance of Tomes' process (26). We therefore formalise the hypothesis that TGF-beta signaling is involved in the modulation of Tomes' process and the deposition of a decussating prisma enamel pattern. Interestingly, the *Klf6* ablated mice display rat/introd anomalies besides enamel maturation defects (27).

LTP3 and brachyolmia

LTP3 is also involved in bone formation and remodeling. Inactivation of *LTP3* reduces TGF-beta activation and therefore diminishes associated cell proliferation and osteogenic differentiation (28). TGF-beta is the most abundant growth factor in bone playing a major role in bone development and skeletogenesis, especially during endochondral ossification but also later in adult bone homeostasis and remodeling (29). Dysregulation of the TGF-beta signaling pathway is likely to interfere with axial skeleton patterning (30).

Ltp3 is expressed in cartilage primordia especially in developing vertebrae (7). Recently, genes such as *TRPV4* (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 gene) have been identified in autosomal dominant brachyolmia (31) and *PAPSS2* (3-phosphoadenosine 5-phosphatase synthase 2) in autosomal recessive brachyolmia (32). A direct relationship may exist between the TGF-beta signaling pathway and the *TRPV4* and *PAPSS2* genes. *TRPV4* regulates cardiac fibroblast differentiation to myofibroblasts by integrating signals from TGF-beta1 and mechanical factors (33). Altered responsiveness to TGF-beta results in reduced *Papss2* expression and alterations in the biomechanical properties of mouse articular cartilage (34).

The role of *LTP3* in bone development is also exemplified by the *Ltp3*^{-/-} knockout mouse phenotype (7,8,35,36). These animals show growth retardation, obliteration of the skull suturedossis within 2 weeks of birth, osteopenias of long bones and vertebrae and osteorhithis. Thoracic kyphosis (curvature of the cervical and thoracic vertebrae) and disorted ribcage were also observed in the mutant mice. The high bone mass was related to a defect in bone resorption with compromised osteoclast function and decreased bone turnover (9). Paradoxically however was not observed in the *Ltp3*^{-/-} knockout mice.

A wider phenotype

A previous report has described expression of *LTP3* in various human tissues and cell lines, predominantly in heart, skeletal muscle, prostate and ovaries, as well as testis and small intestine (14). *Ltp3* was also found to be expressed in the rat brain, with a partially overlapping expression with several other TGF-beta family members (37). Basicicloital-basisphenoid synchondrosis of P1 mouse expressed *Ltp3* in prehypertrophic chondrocytes. *Ltp3* transcripts were also present in adult mouse tissues in heart, brain, lung and kidney (7,8). We also report the transcription of *ltp3* in brain vesicles, in cells surrounding the lumen of the neural tube, in the developing inner ear, in the small and large intestine, in the differentiating lung, in hepatic outflow tract and in the wall of the large blood vessels (Fig. 3).

It is surprising that the mutations of *LTP3* in human seem to affect only two organ systems, the skeleton and the teeth. It will be very important to follow over time the cohort of patients to assess the clinical relevance of this *in situ* hybridisation data and to

record any additional occurring illness that may extent the phenotype spectrum.

Ltp3^{-/-} knockout mouse model display an enamel phenotype

Analyzing further the *Ltp3*^{-/-} knockout mouse with respect to the craniofacial and occlusal phenotypes was of importance to convince that *LTP3* is indeed the causative gene behind brachyolmia associated with AI.

As described in refs. (7–9) craniofacial malformations were identified in *Ltp3*^{-/-} mice at postnatal day 12. By 3 months of age mutant mice displayed a pronounced bending of the cranial vault, retention of the mandible beyond the maxilla and hypoplasia. The altered skull shape with occipital beaking was believed to be caused by the premature ossification of the cranial base synchondrosis. Shortened skull base and disproportionately short upper jaw were evident. The external facial appearance was characterized by a rounded head and a shortened snout. Our analysis indicated that almost all craniofacial structures were affected in the *Ltp3* null mice. Alterations were observed in intramembranous and endochondral bones, along with its teeth. Compared with wild type (WT) mice, *Ltp3* null mutants presented with an overall reduction in craniofacial size and modifications of the shape of various parts of the craniofacial skeleton. Modifications of viscerocranium, neurocranium and mandible were prominent changes.

Some of the skeletal and growth anomalies observed in the *Ltp3*^{-/-} mice were also present in our patients (short maxilla, mandibular prognathism) but others (such as the increased bone density) were not present, underscoring the fact that the mouse phenotype is not always recapitulating the human phenotype. We do know secreted ameloblasts express *Ltp3*. The enamel was clearly defective in the mouse mutant. It was thinner, less mineralized and exhibited an unusual wavy pattern with alternating areas of presence/absence. Both incisors and molars were affected. *Ltp3*^{-/-} ameloblasts as seen on histological sections of continuously growing mouse enamel organ were, in spotted area, able to synthesize an erranding NPE matrix conferring at the cellular level the repaired amelogenesis and the wavy pattern appearance.

This knockout-mouse is now to be inscribed in the list of animal models presenting with enamel defects (38) and will likely serve as an important model to study further brachyolmia with AI (39).

In conclusion, the study of four unrelated families with the association of AI and brachyolmia has led to the identification of *LTP3* as causal gene. Our study not only confirms the existence of this rare, autosomal recessive disorder but also highlights the role of *LTP3* and TGF-beta signaling in amelogenesis, both in humans and mice. It also adds another member to the growing list of genes causing isolated and syndromic forms of brachyolmia. Study of additional families is warranted for better understanding of the phenotypic spectrum of this disorder given the wide expression of the *LTP3* gene.

Materials and Methods

Patients

In Family 1, two sisters born from a consanguineous family of Turkish origin were referred to the Reference Center for Rare Occlusal Diseases at the Strasbourg University Hospital because of pain and enamel defects (Fig. 1). Besides short stature (140 cm adult height, -4.2 SD), they also showed facial dysmorphism with large forehead, thick eyebrows, almond shaped eyes,

myopia and mild learning difficulties. Radiographs of the skeleton revealed brachybrachia (Fig. 1E and F) and there were no signs of a generalized skeletal dysplasia. Bone age was considered as normal.

Their ocidental findings were documented using the [14] phenotypic Diagnosing Dental Defects Database registry (www.phenodent.org).

Enamel was almost absent (hypoplastic AI) in both primary and permanent dentitions (Fig. 1A and B). The teeth were yellow, small and spaced. Several teeth were surgically extracted because of recurrent infections. On orthopantomogram, no enamel was observed, pulp chambers were large and molars were taurodontic (Fig. 1C). Lateral cephalogram showed somewhat thickened cortical plates of the frontal bone and an absence of pneumatization of the frontal and sphenoidal sinuses. Posterior clinoid apophyses of the sphenoid were abnormally shaped. Class II mandibular prognathism was due to maxillary underdevelopment (Fig. 1D).

Family 2 consisted of two sibs born to non-consanguineous, unrelated Georgian parents. The female proband (II 5) is the sixth child. Birth weight was 2760 g, birth length 46 cm and head circumference was 53 cm at 39 weeks of gestation. She had normal psychomotor development and no general health problems. Primary teeth were small and yellowish with a poor square morphology and rounded cusps without pronounced fissures. The enamel was smooth and showed external crown resorption before malars erupted. She suffered of repeated dental abscesses, leading to the extraction of several teeth at ages 2½ and 3 years. When seen at age 8, she had clearly hypoplasia AI, microdontia and taurodontism. At age 13, she was 149 cm tall (−1.5 SD), weighed 42 kg and had an occipital-frontal circumference of 51 cm. She had a triangular face with retraction of the midface. She had short hands with stubby interphalangeal joints. Flexion and supination movements were limited. Osteotendinous reflexes in the lower limbs were jerky. Single nucleotide polymorphism (SNP)-array was normal (Illumina, CytoSNP-12 v2) and did not reveal homozygosity stretches. Radiographs showed mild platyspondyly. Her brother (II 7) was the seventh sib of the family. He was prematurely born at 28 weeks of gestation and remained in the intensive neonatal care unit for 3 months, without major cardiopulmonary or neurological complications. Inguinal herniae were surgically corrected. He walked at age 14 months and his first words were delayed to 2½ years. He required speech therapy. When examined at age 14 year old, he was 101 cm tall (−3 SD), weighed 16 kg and had a head circumference of 48.5 cm. His teeth were small and yellow lacking enamel. He had a triangular face, converging squint, a narrow thorax with prominent sternum and hypermobile small joints. The family history was unremarkable. Parents had normal height (175 cm for the father and 170 for the mother) and teeth. The six other sibs were normal.

Family 3 has been described previously by Bertola et al. (6). The proband is a 12-year old boy from consanguineous and healthy parents. The patient sat unsupported at 8 months of age, walked at 12 months, said his first words at 2 years. Although the mother refers some difficulties in learning, he attends a regular school (currently last year of high school). He presented with short stature (height at −3 SD for age) and enamel defects in the primary and permanent dentition. A panoramic radiograph revealed taurodontic pulp chambers of the permanent teeth. Skeletal survey showed mild flattening of the vertebral bodies with minimal posterior scalloping and no evidence of a generalized epiphyseal dysplasia. Mother and father have normal height (145 and 162.5 cm, respectively) and dental status. This was confirmed by clinical and X-ray examinations.

Family 4 includes three affected sibs in a sibship of five children born to first cousin parents of Pakistani origin. The three affected children, two girls and one boy of, respectively, 16, 9 and 12 years of age, presented with short stature (height ranging from −2 to −5 SD). They were disproportionately with short trunk due to a generalized platyspondyly. Radiographs showed osteopenia and mild vertebral flattening with posterior scalloping and superior and inferior indentations in the posterior third of the lumbar vertebrae. The oldest girl underwent surgery for an S-shaped scoliosis. The scoliosis in the two other children was rather mild. Recurrent dental abscesses were noted and the dental practitioner confirmed a diagnosis of AI with missing teeth.

None of the family members had intellectual disability. The father's height was 165.2 cm (3rd–10th centile) and the mother's height was 149.8 cm (>3rd centile). None of the unaffected member of the family have skeletal nor dental anomalies.

Genetic analyses

This study was approved by the ethics committee of the Strasbourg University Hospital (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01746121). Informed consent and DNA samples were obtained from all participating individuals. Genomic DNA was isolated either from blood using the Flexigene DNA kit (Qiagen, Courtabouff, France) or from saliva using the prepGTM-L2P-DG-250 Oragene[®] DNA kit (DNA Genotek Inc., ON, Canada). Whole-genome sequencing was performed by IntegraGen (Ivry, France). The coding parts of the genome were captured using the SureSelect Human All Exon Kits V2+UTR+OMC (Agilent, Massy, France) and the resulting libraries were sequenced as paired-end 75 base pair reads on a HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, USA). Image analysis and base calling were performed using the Real Time Analysis (RTA) Pipeline version 1.8 with default parameters (Illumina). The bioinformatic analysis of sequencing data was based on the CASAVA1.8 pipeline (Illumina). CASAVA performs alignment and detects variants (SNPs and indels) based on the allelic calls and read depth. The variants were annotated and prioritized using an in-house pipeline VarRank (<http://lbg.fr/VarRank/>) (11).

Sanger sequencing (GATC Biotech, Applied Biosystems ABI 3730xl[™], Konstanz, Germany) was used to validate the mutations and verify segregation using the primers shown in Supplementary Material, Table S2.

Homozygosity mapping via GeneChip Human 250 K SNP Affymetrix was performed as previously described (14) in family 1 on affected individuals IV.1, IV.2, on the unaffected individual IV.3 and both parents III.3 and III.4 (Supplementary Material, Fig. S1).

cDNA analysis

RNA was extracted from fibroblasts of patient IV.1 (gingival biopsy) and one unrelated control by using a RiboPure[®] Kit, followed by a DNase treatment with the TURBO DNA free[™] Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). RNA integrity was assessed by gel electrophoresis and RNA concentration was measured with the Eppendorf BioPhotometer Plus[™] with the Helina[®] TrayCell[™] (Eppendorf, Hamburg, Germany). Reverse transcription of 1 µg total RNA to cDNA was performed using the iScript[™] cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA). Reverse transcription polymerase chain reaction was performed to determine the exon content of the cDNA from the patient. Primers used for reverse transcription polymerase chain reaction are shown in Supplementary Material, Table S2.

Scanning electron microscopy

The permanent left upper second premolar (25) of patient (M2; family 1, as well as an identical control tooth, were available for the comparative study of enamel AI/control ultrastructure. After extraction, the tooth was rinsed with tap water and immersed in a sodium hypochlorite solution (1.2 chlorometric degree) for 24 h. After a rinsing with distilled water the tooth was dehydrated in a graded series of ethanol, transferred in a solution of propylene oxide/lepon resin (v/v) for 24 h, then embedded in Epon 812 (F. du Mesnil, Souffelweyersheim, France). The tooth was sectioned into two halves along its vertical axis using a water-cooled diamond circular saw (Bironwill, NY, USA) and both surfaces were polished with diamond paste (F&C, Chassigny, France). One half was then etched with a 20% (v/v) citric acid solution for 5 min, rinsed with distilled water, dehydrated in a graded series of ethanol solutions and finally left to dry at room temperature. The samples were coated with a gold-palladium alloy using a MCMMPR III sputtering device (Technics, CA, USA). Scanning electron microscope assessments and microanalysis (Energy dispersive X-ray) were performed with a XL 3000M X30 TEG SEM (FEI company, Fincovae, The Netherlands) operating with an electron accelerating voltage of 5 kV.

In situ hybridization

Sample preparation

Mouse embryos/fetuses were collected at E12.5, E14.5, E16.5 and E18.5, after natural mating between C57BL/6 mice. All experiments were carried out in accordance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The project was approved by the ICRMC animal experimentation ethics committee (2012/297). For E14.5 and older samples, the whole body was embedded in OCT 4583 medium (Tissue-Tek, Sakura) and frozen on the surface of dry ice. E12.5 embryos were fixed overnight in 4% paraformaldehyde (pH 7.5, w/v) in phosphate buffered saline (PBS), cryoprotected by overnight incubation in 20% sucrose (w/v) in PBS and cryoembedded as described above. Cryosections (Leica UM3050S cryostat) at 10 μ m were collected on Superfrost plus slides and stored at -80°C until hybridization. E12.5 and E14.5 samples were sectioned in a frontal plane, whereas other stages were sectioned sagittally.

Probe synthesis

The *Itbp3* probe was synthesized from PCR-generated DNA templates kindly provided by the EURLExpress consortium (<http://www.eurl-express.org>). The template sequence is given in Supplementary Material, Fig. S3. DIG-labeled antisense riboprobe was transcribed in vitro by incubation for 2 h at 37°C using 1 μ g of the PCR product, 20 U SP6 RNA polymerase, 5 \times transcription buffer (Promega), 10 \times DIG RNA labeling Mix (Roche), 0.5 M LiCl, Dithiothreitol, 20 U RNase inhibitor (Roche) in a 20- μ l volume. The reaction was stopped with 2 μ l EDTA (0.5 M, pH 8), and RNA was precipitated with 1 μ l yeast tRNA (10 mg/ml), 2.5 μ l LiCl (4 M) and 75 μ l absolute ethanol, followed by an incubation for 30 min at -80°C and centrifugation at 12 000 rpm (33 min at 4°C). The pellet was washed with 0.5 ml ethanol (70%), and re-centrifuged. The supernatant was discarded and the pellet was allowed to dry. The probe was then diluted in 20 μ l sterile H₂O. The quality of the probe was verified by electrophoresis in a 1% agarose gel. If no smear was observed and the size was as expected, the probe was considered to be ready for use. The quantity of RNA was evaluated by Nanodrop (ND-1000

Spectrophotometer, Labtech) and adjusted to 150 ng/ μ l in hybridization buffer, then stored at -20°C until use.

In situ hybridization

In situ hybridization was performed as previously described [43].

MicroCT imaging

Fixed in ethanol, heads of 7 (5 \times 3.5 months-old and 2 \times 5.5 months-old) mutant *Itbp3*^{-/-} mice and 7 WT littermates were analyzed through X-ray micro-CT using Quantum TX[®] microCT Pre-clinical In Vivo Imaging System (Caliper Life Sciences, Inc., Hopkinton, MA, USA), which operates at an energy of 80 kV and current intensity of 160 μ A, with high-resolution detection at 10–205 μ m pixel size. 3D data reconstructions were performed using Analyze software (v.11.0; Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN). Animals necropsy material was kindly provided by B. Dalovic and D.B. Rifkin, Department of Cell Biology, NYU Langone Medical Center, New York, NY.

Histological analysis

Fixed in 10% formalin and then transferred in 70% ethanol, heads of 3.5 months-old WT and *Itbp3*^{-/-} mice were washed in water and then demineralized in EDTA 10% in H₂O at 37°C for 10 days (the demineralizing solution was changed every day for the first 3 days and then every other day). After thorough water washes, the heads were dehydrated in graded ethanol, cleared in histoclear and embedded in paraffin at 60°C. 10 μ m transversal sections were stained with hematoxylin/eosin. A detailed histology protocol can be found at <http://www.empress.har.mrc.ac.uk>.

Supplementary Material

Supplementary Material is available at HMG online.

Acknowledgements

We would like to thank the patients and families for their participation. We are grateful to Nadia Mesaddeg from the ICRMC imaging centre for her help and support and to Yann Héralit and Isabelle Gonçalves de Cruz from the Meuse Clinical Institute for facilitating access to the Micro-CT imaging. We thank Vanessa Stehr for her efficient management of the INTERREG project. All contributors have read and approved the submitted manuscript.

Conflict of interest statement: None declared.

Funding

This work was supported by grants from the University of Strasbourg, the French Ministry of Health (National Program for Clinical Research, PNR 2008 No. 4066 Amelogenesis imperfecta), the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (A71, 2009–2012, ‘Development of the oral cavity: from gene to clinical phenotype in Human’), IFRG (Institut Français pour la Recherche Odontologique) and the EU-funded project (ERDF) ‘A22/Oro-dental manifestations of rare diseases’, supported by the EMT-TMD Orphanic Sciences Initiative. INTERREG IV Upper Rhine program www.genosmile.eu. Work performed at ICRMC was supported by the grant ANR-16-LABX-3030-IPRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame programme Investissements d’Avenir labelled ANR-10-IDEX-0001-02. Funding was also received under the European Commission Seventh

Framework Programme (SYBIL project grant number 602300). E.H. holds a post-doctoral fellowship of the FWO (Fund for Scientific Research—Flanders). D.B.R. and D.B.R. are funded by National Institutes of Health NIH R01 CA094282. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by the EU-funded project (ERDF) A27 “Oral-dental manifestations of rare diseases”, supported by the RMU TMD Offensive Sciences Initiative, INTERREG IV Upper Rhine program www.genomade.eu.

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

1000 Genome Browser, <http://browser.1000genomes.org>
 BDGP, <http://www.flybase.org>
 OHJ/phenodent Diagnosing Dental Defects Database, www.phenodent.org
 dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>
 Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org>
 Eukaryote, <http://www.eukaryote.org/ee/>
 Ensembl Variant Server (EVS) <http://evs.egp.washington.edu/EVS/>
 GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>
 GeneLab-GEPIS, <http://www.cgl.ucsf.edu/Research/genelabtech/genelab-gepis/genelabgepis-search.html>
 Gene expression in tooth, <http://bite-it.helsinki.fi>
 GenePaint, <http://www.genepaint.org>
 HG-2.1.1, <http://www.umd.be/hg2f>
 NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
 Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org>
 OGS Genome Browser, <http://genome.ogsf.edu/cgi-bin/fingertview>
 UniGene, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>
 VeiBank, <http://imgl.in/vdbank/>
 TMD-EM browser, <http://www.ebi.ac.uk/ortemp/>
 TMFBSS, <http://www.empress.lsr.stu.ac.uk/>

References

- Crowther, P.J., Aldred, M. and Birch-Zupan, A. (2007) *Annelogenesis imperfecta*. *Orphanet J. Rare Dis.*, **2**, 17.
- Bloch-Zupan, A., Seilano, H. and Scully, C. (2012) *Denta/Oro/Craniofacial Anomalies and Genetics*. Elsevier Inc., London.
- Verheij, A., Jamblich, P., Koulikovskaya, L. and Bourguignon, J.P. (1996) A new form of skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta and polydactyly. *Clin. Genet.*, **49**, 2–5.
- Bertola, D.R., Antequera, R., Rodrigues, M.J., Honjo, R.S., Allgauer, L.M., Fungiani, I.M., Oliveira, L.A. and Kim, C.A. (2009) Brachydactyly with amelogenesis imperfecta: further evidence of a distinct entity. *Am. J. Med. Genet. A*, **149A**, 532–534.
- Neer, A., Windpassinger, G., Vitou, I., Oth, M., Bahig, M.A., Khayat, M., Malik, M.N., Ayub, M., Alnan, R. and Vincent, J.R. (2009) Dilgodantia is caused by mutation in LTRP3, the gene encoding latent TGF-beta binding protein 3. *Am. J. Hum. Genet.*, **84**, 519–523.
- Legeat-Haebler, V., Paschaki, M., Thibeault-Carpentier, C., Dembele, D., Dele, F. and Bloch-Zupan, A. (2013) Molars and incisors show your microarray IDa. *BMC Res. Notes*, **6**, 113.
- Dabovic, B., Chen, Y., Colrossi, C., Zambuto, L., Obata, H. and Rifkin, D.B. (2002) Bone defects in latent TGF-beta binding protein 3 null mice: a role for Ldbp in TGF-beta presentation. *J. Endocrinol.*, **175**, 129–141.
- Dabovic, B., Chen, Y., Colrossi, C., Obata, H., Zambuto, L., Paris, M.A. and Rifkin, D.B. (2002) Bone abnormalities in latent TGF-beta binding protein 3 null mice indicate a role for Ldbp-3 in modulating TGF-beta bioavailability. *J. Cell Biol.*, **156**, 227–237.
- Dabovic, B., Levasseur, R., Zambuto, L., Chen, Y., Karsenty, G. and Rifkin, D.B. (2005) Osteopenia-like phenotype in latent TGF-beta binding protein 3 deficient mice. *Bone*, **37**, 25–31.
- Nietman, B.J., Wong, M.D. and Beckelmann, J.M. (2003) Genes in geometry: imaging for mouse development in 3D. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 638–645.
- Kloppe, S., Mann, J., Meyer, A., Leitz, H.A., Metzger, D., Charnobon, P., Mann, A. and Mesching, M. (2007) TGF-beta superfamily signaling is essential for tooth and hair morphogenesis and differentiation. *Eur. J. Cell Biol.*, **96**, 791–799.
- Annes, J.P., Blunger, L.S. and Rifkin, D.B. (2003) Making sense of latent TGF-beta activation. *J. Cell Sci.*, **116**, 217–224.
- Iyvtainen, M., Penttinen, C. and Keski-Oja, J. (2004) Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **41**, 233–264.
- Penttinen, C., Saharinen, J., Weikkola, K., Iyvtainen, M. and Keski-Oja, J. (2002) Secretion of human latent TGF-beta binding protein-3 (LTBP-3) is dependent on co-expression of TGF-beta. *J. Cell Sci.*, **115**, 5457–5468.
- Inoue, T., Fujita, M., Kobayashi, M., Watabe, K., Saito, N., Shitoyu, H., Shimada, M. and Takagi, K. (1993) Ultrastructural differentiation in the distal ends of ameloblasts from the precerebral zone to the early secretory zone. *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, **32**, 259–269.
- Zhu, Q., Fan, M., Bian, Z., Chen, Z., Zhang, Q. and Peng, J. (2003) In situ hybridization analysis of transforming growth factor-beta 1 RNA expression during mouse tooth development. *Chin. J. Dent. Res.*, **3**, 21–25.
- Fan, M.W., Bian, Z. and Guo, Y.G. (1998) Immunohistochemistry and in situ hybridization investigation of transforming growth factor-beta during odontoblast and ameloblast differentiation. *Chin. J. Dent. Res.*, **1**, 17–21.
- Khoo, Q.P., Selic, A., Khan, C., Rames, S. and Osmundesen, H. (2013) Expression of *Clp* and *Tyfp1* during murine tooth development: effects of in-vivo transection with anti-mil-214. *Eur. J. Oral Sci.*, **121**, 305–312.
- Haruyama, N., Thyagarajan, T., Skobe, Z., Wright, J.T., Sepder, D., Sreenath, V.L., Goldberg, M. and Kulkarni, A.B. (2006) Overexpression of transforming growth factor-beta1 in teeth results in detachment of ameloblasts and enamel defects. *Eur. J. Oral Sci.*, **114**(Suppl 1), 30–34.
- Guo, Y., Li, D., Han, T., Saito, Y. and Zhang, J. (2009) TGF-beta1 and TGF-beta1 are expressed in ameloblasts and promote MMP20 expression. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1092**, 885–890.
- Tsuchiya, M., Sharma, R., Tye, C.F., Sugiyama, T. and Bartlett, J.D. (2009) Transforming growth factor-beta1 expression is up-regulated in maturation-stage enamel organ and may induce ameloblast apoptosis. *Eur. J. Oral Sci.*, **117**, 105–112.
- Suzuki, M., Sato, M., Slemmon, J.P. and Bartlett, J.D. (2014) Fluoride Affects Enamel Protein Content via TGF-beta1-mediated KLF4 Inhibition. *J. Dent. Res.*, **93**, 1022–1027.
- Cho, A., Haruyama, N., Hall, R., Danton, M.L., Zhang, L., Arany, P., Mrosovsky, D.J., Harshbawn, Y., Goldberg, M., Gibson, C.W. et al. (2012) TGF-beta regulates enamel mineralization and maturation through KLF4 expression. *PLoS One*, **8**, e82267.
- Tjaderhane, L., Kivimaki, S., Paakkonen, V., Rousso, J., Soini, Y., Sato, T., Metskku, K. and Tuohikari, J. (2013) Polarity of mature human odontoblasts. *J. Dent. Res.*, **92**, 1011–1016.
- Selic, A., Rames, S., Khan, Q.P., Khoo, C. and Osmundesen, H. (2010) Gene expression and dental enamel structure in developing mouse incisor. *Eur. J. Oral Sci.*, **118**, 118–130.
- Lemus, R.S., Nakayama, Y., Horiuchi, J., Nguyen, V., Somogyi-Gausz, F., Sreed, M.L., White, S.N., Dams, M.J. and Ganss, B.

- (2012) Targeted overexpression of amelotin disrupts the microstructure of dental enamel. *PLoS One*, 7, e35266.
27. Barton, J.D. and Simmer, J.P. (2014) Kallikrein-related peptidase 4 (KLK4): role in enamel formation and revelations from ablated mice. *Front Physiol*, 5, 240.
28. Koll, E., Ryyanen, M.J. and Keski-Oja, J. (2002) Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*, 43, 675-683.
29. Karsan, R.A. and Karsan, L.A. (2005) Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med. Sci. Monit*, 12, RA154-RA159.
30. Alliston, T., Sak, E. and Derynck, R. (2008) TGF- β Family Signaling in Skeletal Development, Maintenance, and Disease. In Derynck, R. and Miyazono, K. (eds), *The TGF- β Family*. Cold Spring Harbor Monograph Archive, North America, 50. Available at: <https://mhmonographs.org/index.php/monographs/article/view/2854> (last accessed: 17 February 2012).
31. Grigelisniene, G., Geiberger, S., Horemanova, E., Mostrom, E., Jantti, N., Neuneyer, L., Astrom, L., Nordenskjold, M., Nordgren, A. and Makitie, O. (2014) Autosomal dominant brachyolmia in a large Swedish family: phenotypic spectrum and natural course. *Am. J. Med. Genet. A*, 164, 1633-1642.
32. Sida, A., Simsek-Kiper, P.O., Mizumoto, S., Hochino, T., Ucinoglu, N., Horemanova, E., Geiberger, S., Yesil, C., Kayserili, H., Utine, G.E. et al. (2013) Clinical and radiographic features of the autosomal recessive form of brachyolmia caused by PAPSS2 mutations. *Hum. Mutat.*, 34, 1387-1396.
33. Adapala, R.K., Thoppil, R.J., Luther, D.J., Paruchuri, S., Meszaros, J.G., Chilian, W.M. and Thoden, C.K. (2013) TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 54, 45-52.
34. Ramsewamy, G., Sohn, T., Eberhardt, A. and Sures, B. (2012) Altered responsiveness to TGF-beta results in reduced *Fap2* expression and alterations in the biomechanical properties of mouse articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.*, 14, R49.
35. Colarossi, C., Chen, Y., Obara, H., Jurakavski, V., Fanfani, L., Dabovic, B. and Rifkin, D.B. (2005) Lung alveolar septation defects in *Ltbp-3* null mice. *Am. J. Pathol.*, 167, 419-428.
36. Chen, Y., Dabovic, B., Colarossi, C., Santiti, E.R., Libe, M., Vukmanovic, S. and Rifkin, D.B. (2005) Growth retardation as well as spleen and thymus involution in latent TGF-beta binding protein (*Ltbp-3*) null mice. *J. Cell. Physiol.*, 196, 519-525.
37. Diboly, A. and Palkovits, M. (2008) Expression of latent transforming growth factor beta binding proteins in the rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 507, 1393-1406.
38. Pugach, M.K. and Gibson, C.W. (2014) Analysis of enamel development using murine model systems: approaches and limitations. *Front Physiol*, 5, 313.
39. Fleischmannova, J., Matulova, L., Döcker, A.S. and Sharpe, P.T. (2008) Mouse models of tooth abnormalities. *Lur. J. Oral Sci.*, 116, 1-10.
40. Geoffroy, V., Fizot, C., Redin, C., Fiten, A., Vasi, N., Stuetzel, C., Elavier, A., Laporte, J. and Müller, J. (2012) VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. *Feby*, in press.
41. Redin, C., Le Gras, S., Mhamdi, O., Geoffroy, V., Stuetzel, C., Vincent, M.C., Chnirazi, P., Lecomte, D., Quartani, I., Petit, F. et al. (2012) Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet Biedl and Alstrom syndromes. *J. Med. Genet.*, 49, 502-512.
42. Bloch-Zupan, A., Jamet, X., Etard, C., Laugel, V., Müller, J., Geoffroy, V., Strauss, J.P., Palletier, V., Marion, V., Puch, O. et al. (2011) Homozygosity mapping and candidate prioritization identify mutations missed by whole-exome sequencing, in *SMOC2*, causing major dental developmental defects. *Am. J. Hum. Genet.*, 89, 773-781.
43. Laugel-Haushalter, V., Lorange, A., Marrie, J., Enalob, V., Schaubert, B., Koch-Phillips, M., Dolle, P. and Bloch-Zupan, A. (2012) From the transcription of genes involved in ectodermal dysplasia to the understanding of associated dental anomalies. *Sci. Signal.*, 3, 158-168.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Schematic representation of the homozygosity mapping data

The representation shows a large chromosome 11 homozygous region that is common in affected individuals (IV.1 and IV.2) and absent in unaffected individual (IV.3) and both parents (III.3 and III.4) extracted from Affymetrix Genotyping Console Software. Gray shading indicates homozygous region and the box indicates the common region shared by the two affected individuals.

Figure S2. Molecular validation of the 14 bp deletion in Family 1

- a) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis on cDNA reverse-transcribed from total RNA obtained from cultured gingival fibroblasts from the patient (IV.1) and from cultured skin fibroblasts from an unrelated control. The primers amplify across exons 14 and 15 of *LTBP3* (NM_001130144.2). The 164 bp band on gel electrophoresis indicates the presence of the normal allele in the unrelated control whereas the band at 150 bp for the affected individual IV.1 reveals the 14 bp deletion.
- b) Sanger sequencing on cDNA reveals the 14 bp homozygous deletion in the affected individual (IV.1) compared to the unrelated control, the deleted nucleotides are indicated by a box in the chromatograph of the control.

Figure S3. *Ltbp3* 650 bp template sequence for *in situ* hybridization probe synthesis

```
CACAGTGTCTGTGACAGCGTATTGGCTACCAATGTCACTCAGCAGGAATGCTGTTGCTCTCTGG
GAGCTGGCTGGGGAGACCACTGCGAAATCTATCCCTGTCCAGTCTACAGCTCAGCCGAATTTCA
CAGCCTGGTGCCTGATGGGAAAAGGCTACACTCAGGACAACAACATTGTGAACATATGCATTCT
GCCACCGTGACATCGACGAATGCATATTGTTTGGGGCAGAGATCTGCAAGGAGGGCAAGTGTG
TGAACACGCAGCCCGGCTACGAGTGCTACTGCAAGCAGGGCTTCTACTACGATGGCAACCTGCT
GGAGTGCGTGGACGTGGATGAGTGCTTGGATGAGTCTAACTGCAGGAACGGAGTGTGTGAGAA
CACACGTGGCGGCTACCGCTGTGCCTGCACTCCGCCGGCAGAGTACAGTCCCGCACAGGCCCA
GTGTCTGATCCCGGAGAGATGGAGCACGCCCCAGAGAGACGTGAAGTGTGCTGGGGCCAGCGA
GGAGAGGACGGCATGTGTATGGGGCCCCTGGGCGGGACCTGCCCTCACTTTTGATGACTGCTG
CTGCCGCCAGCCGCGGCTGGGTACCCAGTGCAGACCGTGCCCGCCACGTGGCACCCGGTCCC
```

AGTGCCCGACTTCACAGAGTGAGAGCAATTCTTTCTGGGACACAAGCCCCCTGCTACTGGGGAA
GTCTCCGCGAGACGAAGACAGCTCAGAGGAGGATTCAGA

Table S1. Summary of the exome sequencing results from families 1 and 2.

Bioinformatics analysis: Annotation, ranking and filtering of genetic variants

The platform generated a coverage of at least ten reads for more than 93% of the targeted exomes and we identified 66,380 to 68,332 genetics variants per proband (Table 1S). The disease causing variants identification has been realized by the VaRank program (<http://www.lbgi.fr/VaRank>) for the annotation, ranking and filtering of genetic variants detected by high-throughput sequencing. VaRank results are provided in tab-separated values files (Supplementary data Table1).

VaRank filtering (Table S1) of the exome sequencing data focused on a candidate gene shared by the 2 families: the *LTBP3* gene, with an heterozygous compound (c.1531+1G>T; p.[Gln141*(;?)]) for the family 2 and 1 homozygous variant (c.2071_2084del; p.Tyr691Leufs*95) for the family 1.

Table S2. Primer sequences of *LTBP3* gene used in this study

Fig. S1

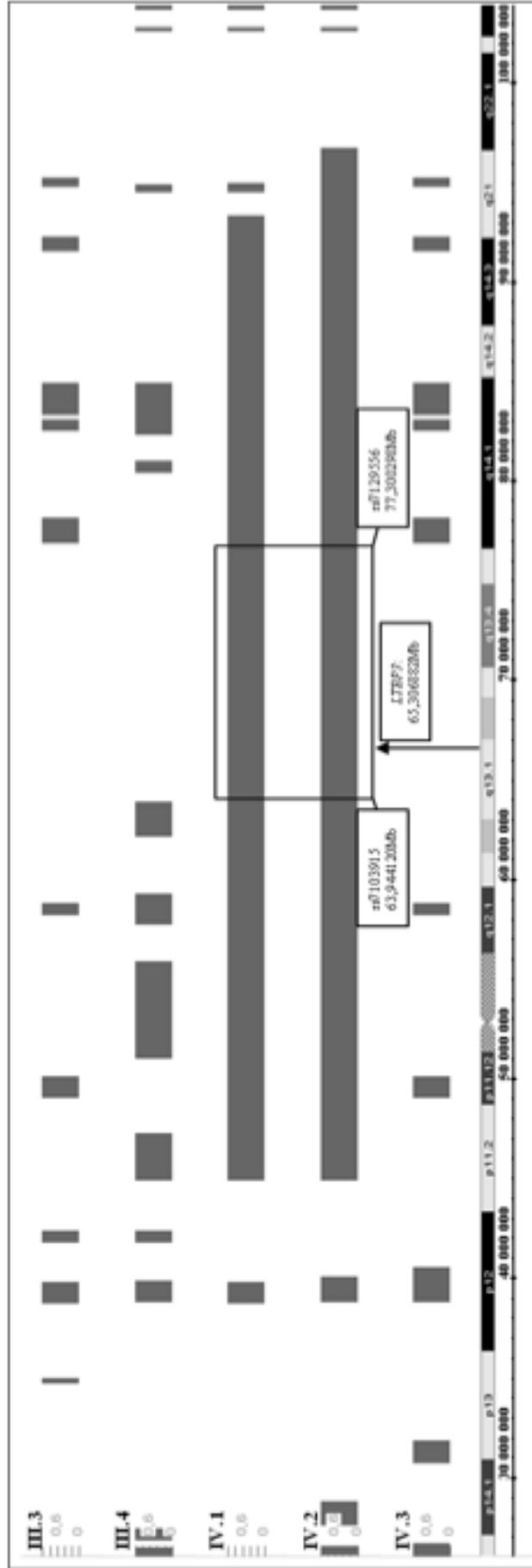


Fig. S2

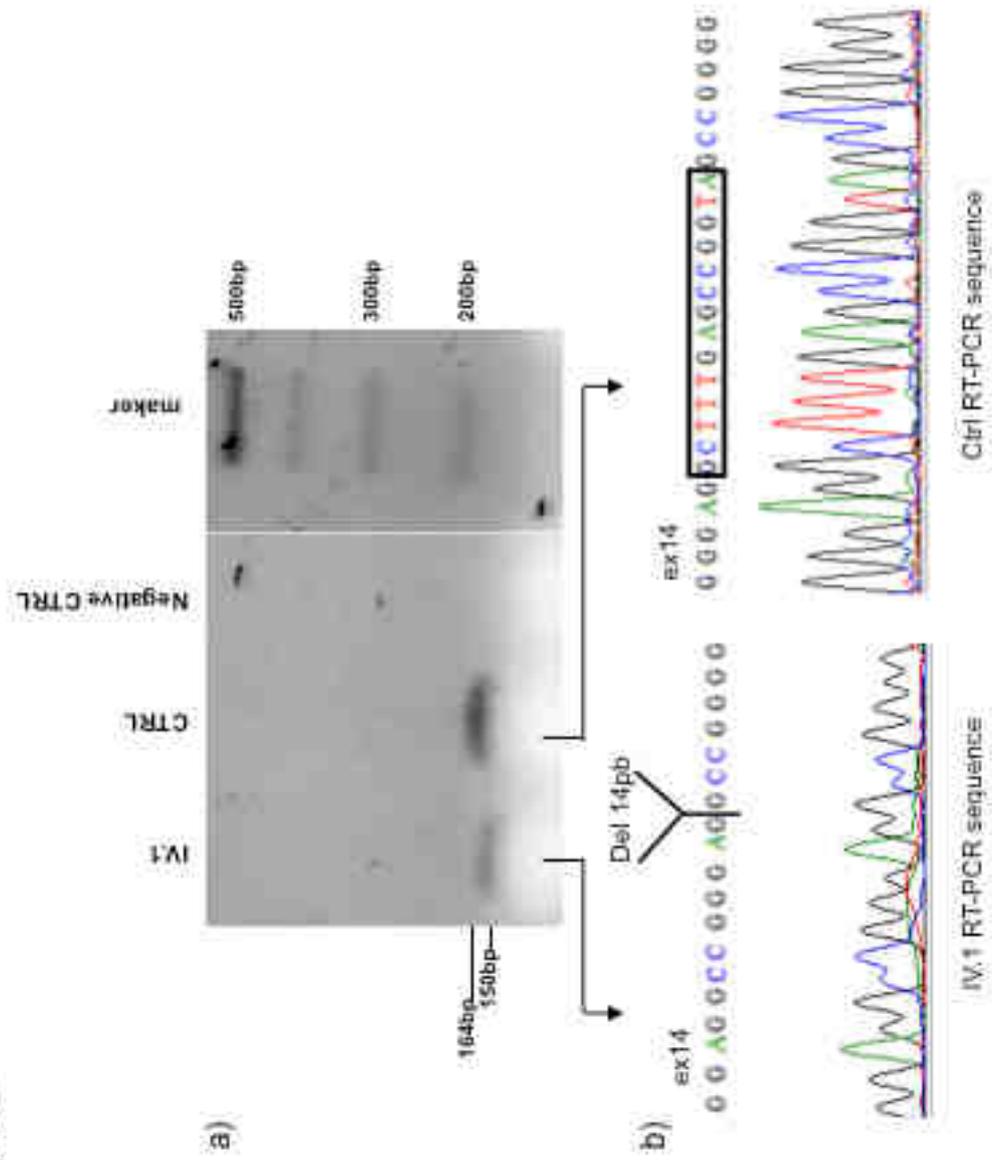


Table S1. Summary of the exome sequencing results from families 1 and 2.

Patient	Fam1.IV.1		Fam1.IV.2		Fam2.I.2		Fam2.I.1	
	SNV	Indel	SNV	Indel	SNV	Indel	SNV	Indel
Mean coverage (X)	69		78		89		84	
% of nucleotides with coverage \geq 10X	93		93		94		94	
Total number of variants	59402	6978	60635	7159	60404	7098	61158	7174
After exclusion of non-pathogenic variants (as determined from the <u>ClinicalSignificance</u> field in <u>dbSNP</u>) validated by at least 2 methods in <u>dbSNP</u> (as determined from the "Validation Status" field)	5776	3177	5825	3292	5334	3189	5533	3216
After exclusion of variants with an allele frequency > 1% (extracted from the <u>dbSNP</u> database and the <u>Exome Variant Server</u>)	5358	2827	5403	2909	4942	2791	5123	2848
After exclusion of variants found in the homozygous state + exclusion of variants found more than once in the heterozygous state in 48 control <u>exomes</u>	1636	368	1595	384	1260	322	1326	321
After exclusion of variants that are not shared by all affected members of the family	799	160	799	160	499	99	499	99
After exclusion of 5'UTR, 3'UTR, downstream, upstream and intron locations without local splice effect prediction (from the " <u>localSpliceEffect</u> " field of <u>Alamut-Batch</u>)	315	27	315	27	178	12	178	12
After exclusion of synonymous variants without local splice effect prediction (from the " <u>localSpliceEffect</u> " field of <u>Alamut-Batch</u>)	236	27	236	27	140	12	140	12
After selection of variants consistent with recessive transmission (compound heterozygous, homozygous variants).	31	4	31	4	4	0	4	0
Common candidate(s) gene(s) shared by families 1 and 2:	<i>LTBP3</i>							

Table S2. Primer sequences of *LTBP3* gene used in this study

Primer sequences of <i>LTBP3</i> gene used in this study		
Primer name	Sequence (5' -> 3')	length
LTBP3-2F	GGCAAGGAAGTAGGGAGGAG	298 bp
LTBP3-2R	CGTAGATGGCGTGCTTGC	
LTBP3-8F	GCTGGGAAGGGATACCACAT	395 bp
LTBP3-8R	GATCAGGTTGAATGGCCTTG	
LTBP3-14F	CCGTGTAATCCCTCCCCTTG	231 bp
LTBP3-14R	GGAGCTCCTTCTTTGGTCTG	
LTBP3-15F	GAGCCTCGTTGATCTGTGTG	400bp
LTBP3-15R	GGGGGTGTGGGTCTCTTC	
LTBP3-17F	GCACCTGACCTGGTCGTC	394bp
LTBP3-17R	CCCCAACTGAGATCTGGATTA	
LTBP3-RT-ex14F	CATCAACTTTCCCGGTCACT	164bp
LTBP3-RT-ex15R	GACAGGCGATGCACTTGAA	

DISCUSSION-PERSPECTIVES

L'identification de nouvelles mutations et de nouveaux gènes dans le cadre des maladies crânio-faciales et bucco-dentaires est un domaine de recherche très dynamique. En 2001, seul le gène *AMEL* était connu, alors qu'à ce jour, une vingtaine de nouveaux gènes ont été mis en évidence, et des nouvelles mutations sont publiées fréquemment. Ces données entraînent des modifications des **classifications** proposées pour les amélogenèses imparfaites selon le mode de transmission, le type clinique, le gène impliqué [24]. Cette classification mériterait d'évoluer, cependant elle ne pourra être révisée que lorsque l'on aura une idée claire des relations phénotype/génotype. Les limites entre AI syndromiques et AI non syndromiques ne sont

COL7A1 est le gène causal de l'épidermolyse bulleuse dystrophique (transmission autosomique retrouver dans une AI syndromique (exemple : *AMELX*, *DLX3*). Par ailleurs, des gènes jusqu'alors référencés dans certaines pathologies comme *LAMB3*, *LAMA3*, *COL7A1*, *COL17A1* dans l'épidermolyse bulleuse dystrophique avec des mutations homozygotes, peuvent également être à l'origine d'une AI hypoplasique [63, 64]. Au niveau de la **corrélation phénotype/génotype**, pour certaines AI, le lien est relativement aisé. C'est le cas des mutations *AMELX* où l'on retrouve des rainures et stries de l'émail caractéristiques chez la fille. Pour d'autres gènes, le phénotype est variable ou non spécifique et le diagnostic clinique lui-même est délicat, puisque les différents types d'AI (hypoplasique, hypomature, hypominéralisé) peuvent coexister chez un même patient, voire sur une même dent. Ainsi *LTBP3* était référencé pour l'oligodontie [125] avant d'être connu comme impliqué dans l'AI [123]. Enfin, pour certaines pathologies, le phénotype médical général est très bien documenté, mais les informations bucco-dentaires sont limitées.

L'observation du phénotype clinique médical et plus particulièrement bucco-dentaire reste tout de même un bon indicateur dans l'**orientation** des recherches en génétique humaine, pour que le **diagnostic moléculaire** valide le **diagnostic clinique**. La publication 1 au sujet de *ROGDI* et du syndrome de Kohlschütter-Tönz est une bonne illustration de l'errance diagnostic avant la validation par la biologie moléculaire. Dans le cadre des AI, la connaissance du gène muté peut moduler l'orientation et la **prise en charge médicale, voire bucco-dentaire** et donne des informations essentielles pour les AI syndromiques et leur suivi médical. Chez les patients porteurs d'une mutation *FAM20A*, par exemple, les dispositifs de traction orthodontico-chirurgicaux ne seront pas proposés, car voués à l'échec [111]. L'observation d'une anomalie bucco-dentaire doit faire rechercher des **pathologies associées** (néphrocalcinose, brachyolmie, épilepsie...) et conduire à des bilans complémentaires (ophtalmologie, dermatologie, neurologie...). Ainsi la **collaboration entre les équipes médicales** (chirurgien-dentiste, orthodontiste, généticien, pédiatre...) est essentielle pour une bonne prise en charge globale du patient.

Dans le domaine des **applications cliniques directes**, les résultats apportés par ce type de **recherche translationnelle** ont un intérêt tout particulier dans l'orientation du **conseil génétique** et le **diagnostic prénatal** pour les AI syndromiques avec une pathologie sévère associée (exemple : le syndrome de Kohlschütter-Tönz). Les découvertes de nouvelles mutations et de nouveaux gènes ont un impact direct sur les familles concernées qui connaîtront le mode de transmission de l'affection et le risque de transmission aux générations futures.

Au niveau de la **recherche en biologie moléculaire**, les difficultés rencontrées concernent notamment les **prélèvements biologiques**. En effet, les critères de **qualité** et de **quantité** ne sont pas toujours optimaux et

l'obtention de certains échantillons peut s'avérer difficile. Lors de cette étude nous avons utilisé le kit Oragene® DNA pour les prélèvements salivaires. Pour les patients trop jeunes pour le protocole standard, le prélèvement est effectué à l'aide d'éponges salivaires. Lors de l'extraction d'ADN de ces prélèvements avec éponges, nous avons pu noter que la concentration d'ADN était toujours moindre. Ce type de kit a tout de même de nombreux avantages, il n'est pas invasif, ses conditions de conservation, de stockage (température) et de transport sont commodes. Ainsi les prélèvements issus d'un village reculé de Madagascar ont pu être acheminés vers le laboratoire de Strasbourg sans difficultés (Annexe 3). Pour certaines familles, l'**obtention** d'échantillons d'apparentés peut représenter un frein à la recherche, en raison de la distance, de la motivation ou du caractère invasif de certains prélèvements (biopsie).

Concernant le **séquençage Sanger**, les difficultés notables sont celles inhérentes à la technique. Ainsi certaines **mises au point** par gradient de température nécessitent d'être reprises de nombreuses fois afin de trouver les conditions idéales d'amplifications. Pour certains exons nous avons été contraints d'établir plusieurs couples d'amorces avant de pouvoir réaliser une PCR-patient. Ces obstacles peuvent limiter certaines recherches, car ils ont un impact sur l'organisation du travail, le temps de recherche et par conséquent sur le coût (analyse par haut débit ciblé à visée diagnostic : 500€ min/patient ; réalisation d'un exome : 1200€ min/patient). L'Annexe 3 illustre parfaitement cette notion de persévérance, au travers d'une famille présentant une dentinogenèse imparfaite et pour laquelle une vingtaine d'année a été nécessaire pour le diagnostic moléculaire d'une mutation dans *DSPP*. Cette identification n'avait pas été possible par la technique de séquençage Sanger, et c'est grâce à la réalisation d'**exomes** que la délétion a été mise en évidence.

Ces techniques de **séquençage nouvelle génération (NGS)** sont des outils révolutionnaires pour la génétique humaine en diagnostic et en recherche. Ils permettent un diagnostic dans quasiment 50% des cas [265] et constituent une source majeure d'information [266], mais possèdent également leurs inconvénients, notamment une analyse des données souvent difficile. En effet, les variants sont très nombreux et de pathogénicité souvent incertaine. Par ailleurs, ces NGS présentent certaines limites comme le manque de couverture ou le mauvais « calling » de variant, qui peuvent conduire à la non-détection d'une mutation. Par exemple, le gène *SMOC2* (impliqué dans des anomalies majeures du développement dentaire) a été découvert grâce à une puce d'homozygotie et l'approche gène candidat, alors que l'exome réalisé ne l'avait pas mis en évidence [263].

A l'heure actuelle, de nombreux **pipeline d'analyse informatique** de ces données sont en cours de développement et permettent de mieux en mieux de préciser ces résultats. Cependant, la multiplicité de ces programmes et des bases de données rend la **synthèse des résultats et leur interprétation** très complexes. Dans tous les cas, la quantité de résultats générés par les NGS est très importante et nécessite un **stockage** particulier. En effet, les données doivent être conservées et cet archivage peut poser la question de l'**éthique** par rapport à l'utilisation future de ces informations.

Si ces stratégies de recherches permettent de sélectionner des gènes candidats, la **validation fonctionnelle** reste l'étape la plus difficile. En effet, grâce à ce projet, nous avons des **pistes** de gènes pour plusieurs familles informatives, cependant la confirmation de ces candidats va reposer sur l'augmentation des **cohortes**, l'obtention de prélèvements spécifiques, les **modèles animaux**... constituant **les perspectives majeures**.

Concernant le gène *FAM20A*, nous avons commencé un séquençage Sanger pour un patient atteint d'AI associé à une néphrocalcinose et dont l'ADN a été envoyé par l'équipe bordelaise du Pr. Lacombe. Pour le moment, nous avons identifié une délétion CTTT dans l'exon 6, mais à l'état hétérozygote. Aucune autre mutation n'ayant été repérée dans ce gène pour ce patient, le diagnostic n'est pas validé. Nous sommes dans l'attente de l'obtention de l'ADN des parents afin d'effectuer la ségrégation familiale et de poursuivre les investigations.

Citons également une famille consanguine originaire de Turquie pour laquelle deux cousins présentent une AI hypoplasique associée à une surdité, des manifestations ophtalmiques, et une agénésie rénale unilatérale ainsi qu'une sténose du pylore pour l'un des deux patient (le syndrome Branchio-oto-rénal BOR, gène *EYA1* a été écarté). Une analyse par cartographie d'homozgotie a mis en évidence 2 zones sur 2 chromosomes, correspondant à 194 g nes. La hiérarchisation de ces gènes et le séquençage des 6 premiers n'a pas révélé de mutation. Une analyse par exome a été réalisée et a mis en évidence un **gène candidat** pour lequel l'**hypothèse** doit être validée.

Pour une autre famille, il s'agit une patiente présentant une AI hypoplasique avec un retard de croissance à 2,3DS, des sclérotiques bleutées, sans anomalies dermatologiques ni asymétrie corporelle. Différentes hypothèses ont été écartées : l'achondroplasie (pas de mutation du gène *FGFR3* retrouvée), le syndrome de Silver Russel (phénotype non caractéristique), le syndrome 3M (analyse des clichés radiographiques). L'analyse à l'aide de l'outil diagnostique de séquençage à haut débit à visée diagnostique pour les affections bucco-dentaires n'a pas donné de résultat probant, aussi une analyse par exome a été effectuée. Après étude des résultats, deux gènes candidats ont été proposés, dont l'un vient d'être éliminé par ségrégation familiale. Le gène candidat restant doit à présent être validé par une analyse fonctionnelle, ou le recrutement d'une autre famille présentant le même phénotype. Etant donné qu'il s'agit de **maladies rares**, cette augmentation de la cohorte est très difficile.

Enfin pour la **recherche fondamentale**, l'identification des nouveaux gènes permet d'accroître les connaissances en matière de développement bucco-dentaire, en expliquant certains mécanismes d'action et interactions des gènes. A long terme, ces éléments pourront déboucher sur des voies thérapeutiques ou de régénération tissulaire, en particulier au niveau du parodonte. En effet, certaines protéines de l'émail participent à la mise en place du parodonte. Les industriels ont déjà mis sur le marché le biomatériau Emdogain® (Straumann®), gel dont le composant principal est l'amélogénine dans une matrice insoluble, qui stimule les processus de cicatrisation des tissus mous et durs, et est indiqué pour la régénération tissulaire dans les cas de maladies parodontales ou les suites de traumatismes [267].

CONCLUSIONS

Les maladies rares par définition touchent moins d'une personne sur 2000. 80% sont d'origine génétique et constituent des axes de recherche majeurs. Parmi ces affections rares, certaines concernent le massif crânio-facial, la cavité buccale et les dents, avec notamment des anomalies dentaires du développement dont les atteintes des tissus durs de la dent comme l'émail, la dentine, le cément ou l'os alvéolaire. L'émail dentaire, structure acellulaire, avasculaire et non innervée, est le seul tissu minéralisé d'origine ectodermique de l'organisme. Composé à 98% d'une phase minérale (réseau cristallin d'hydroxyapatites) et à 2% d'une phase organique transitoire qui guide le réseau cristallin (protéines de structure, lipides, phospholipides, enzymes), ce tissu peut présenter des anomalies lors des différents stades de sa formation (améloblastes présécrétoires, sécrétoires, phase de maturation, améloblastes de protection). Du point de vue clinique, ces anomalies sont appelées Amélogenèses Imparfaites (AI). Elles sont définies comme un groupe hétérogène d'altérations de l'émail dentaire d'origine génétique. La prévalence varie de 1/700 à 1/14000 et tous les modes de transmission sont décrits (autosomique dominant, récessif, lié à l'X) [23]. Selon le type de défaut amélaire, l'AI peut être qualifiée d'hypoplasique, d'hypominéralisée ou d'hypomature, cependant plusieurs formes peuvent coexister chez le même patient. Cliniquement, une dyschromie, une hypersensibilité et des pertes de substance sont observées. Ces anomalies peuvent exister de manière isolée ou sont associés à d'autres symptômes au tableau clinique des syndromes. Cette affection est à l'origine de problèmes sociaux, esthétiques, fonctionnels et d'inconfort. Certains gènes impliqués dans ces AI sont déjà connus comme *AMEL*, *ENAM*, *AMBN*, *LAMB3*, *LAMA3*, *COL7A1*, *COL17A1*, *FAM83H*, *C4orf26*, *SLC24A4*, *ITGB6*, *MMP20*, *KLK4*, *WDR72*, *STIM1*, *TUFT1* (formes isolées) ou *DLX3*, *FAM20A*, *TP63*, *CNNM4*, *ROGDI*, *FAM20C* (formes syndromiques), cependant de nouveaux gènes et de nouvelles mutations restent à découvrir [23, 28].

L'approche expérimentale de ce travail repose sur une recherche translationnelle. A partir de l'observation précise du phénotype clinique des patients atteints, un protocole de recherche est mis en place au laboratoire et permet d'identifier de nouvelles mutations ou de nouveaux gènes. La stratégie de recherche est centrée sur l'étude de familles informatives, le plus souvent avec un mode de transmission récessif. Dans un premier temps, l'examen clinique, radiographique et l'analyse familiale sont répertoriés dans une base de données (D[4]/Phenodent). Puis, face à un phénotype classique et caractéristique, des gènes candidats sont proposés et peuvent être validés par une technique de séquençage Sanger. Par contre, en cas de phénotype exceptionnel, le plus souvent chez des familles présentant des liens de consanguinité, d'autres méthodes peuvent être déployées pour identifier de nouveaux gènes. Il s'agit de la cartographie par zones d'homozygotie, du séquençage haut débit ciblé ou encore de l'analyse par « exome ». Ces techniques font appel à la bioinformatique, à des logiciels spécifiques pour mettre en place des filtres, isolant des variants ou mutations. Les informations doivent ensuite être validées, par ségrégation familiale, analyse d'expression, recrutement de cohorte ou encore étude de modèles animaux. Grâce à tous ces nouveaux moyens, ce domaine de recherche, très dynamique, est en plein essor. Alors que seul *AMEL* était connu en 2001, une vingtaine de nouveaux gènes ont été identifiés depuis.

Grâce à ces stratégies de recherche, nous avons pu mettre en évidence des nouvelles mutations dans des gènes connus et un nouveau gène impliqué dans les AI. Les résultats concernant le gène *ROGDI* illustrent l'approche par séquençage Sanger pour des gènes connus. De même, la recherche effectuée autour du gène *MMP20* repose sur le séquençage Sanger, et met en avant l'apport de la microscopie électronique pour une description plus fine du phénotype amélaire. Puis, durant ce projet, le travail sur *FAM20A* a permis d'utiliser les techniques de séquençage Sanger, mais également les NGS et a abouti sur une métaanalyse avec description détaillée des caractéristiques bucco-dentaires liées à ce gène. Enfin, l'approche combinée par puce d'homozygotie et exome a permis de mettre en évidence le nouveau gène *LTBP3* impliqué dans l'AI associée à la brachyolmie.

ROGDI

Concernant l'axe de recherche de gènes déjà connus, nous avons étudié une famille originaire du Mali, en errance diagnostique depuis 13 ans, dont la fille, seul membre atteint, présentait une Amélogénèse imparfaite (AI), une épilepsie et des troubles du comportement. La mise en évidence récente [116] de l'implication du gène *ROGDI* dans le syndrome de Kohlschütter-Tönz (associant AI, épilepsie et retard psycho-moteur) nous a orienté vers le séquençage (technique Sanger) de ce gène. Nous avons alors identifié une nouvelle mutation c.117+1G>T dans le gène *ROGDI*, à l'état homozygote chez la fille et hétérozygote chez les parents. La validation fonctionnelle (extraction de l'ARN des fibroblastes de la patiente à partir d'une biopsie cutanée, RT-PCR des exons 1 à 3, séquençage) a révélé l'absence de l'exon 2 (suite à la destruction du site donneur d'épissage) et l'assemblage en phase de l'exon 3. Cet exon 2 codant pour une région riche en Leucine indispensable à la fonction de la protéine (dont on ignore la fonction exacte) est particulièrement conservé au cours de l'évolution. Ce résultat confirme le diagnostic de syndrome de Kohlschütter-Tönz pour cette famille et donne des perspectives pour une meilleure compréhension de l'odontogénèse et du développement du cerveau [119].

MMP20

Dans le cadre des recherches sur les gènes connus impliqués dans les AI isolées, nous avons eu l'occasion de décrire 2 nouvelles mutations du gène *MMP20* (Matrix metalloproteinase 20). Il s'agissait de 2 familles distinctes présentant des AI hypomatures à transmission autosomique récessive. Une mutation faux-sens p.T130I à l'état homozygote a été mise en évidence, ainsi qu'un hétérozygote composite associant le même faux-sens à une délétion entraînant un codon stop prématuré (p. N120fz*2).

La structure amélaire a ensuite été explorée par microscopie électronique et microanalyse (spectroscopie dispersive à rayons X, EDX, energy dispersive X-ray spectrometry). Les résultats confirment le diagnostic d'AI hypomature : le contenu minéralisé est légèrement diminué, et le calcium amélaire est substitué par du magnésium dans la structure du cristal. Ces anomalies décrites suggèrent un nouveau rôle possible pour *MMP20* dans la formation de l'émail [89].

FAM20A

Dans le cadre des AI syndromiques, le phénotype associant AI et néphrocalcinose est appelé syndrome ERS (émail-rein); et la pathologie regroupant une hyperplasie gingivale, une AI et un syndrome de fibromatose gingivale est nommé AIGFS. Le phénotype des patients ERS/AIGFS est très caractéristique et consiste en une AI hypoplasique généralisée (avec une absence quasi-totale d'émail) affectant la denture temporaire et permanente, un retard d'éruption, des calcifications intra-pulpaire, des follicules dentaires hyperplasiques, des rétentions dentaires, une hyperplasie gingivale.

En collaboration avec différents laboratoires, nous avons participé à une étude auprès de 25 patients issus de 16 familles qui a permis la découverte de l'implication de *FAM20A* dans l'AI associée à la néphrocalcinose [110]. Il s'agissait de patients présentant une néphrocalcinose inexplicée et des anomalies bucco-dentaires spécifiques (AI, hyperplasie gingivale, rétention dentaire). Une série d'analyse par "genome-wide linkage", "exome capture", "next-generation sequencing" et séquençage Sanger a été menée. Tous les patients

étaient porteurs d'une mutation bi-allélique de *FAM20A* et 20 mutations différentes ont été identifiées. Ces mutations de *FAM20A* entraînant une AI à transmission autosomique récessive semblent être associées à une néphrocalcinose (dans le syndrome ERS). La pathogénie de ces anomalies est encore incomprise, cependant la piste de l'homéostasie du calcium est avancée. Elle nécessite la régulation cellulaire des systèmes interstitiels pour moduler les mouvements ioniques. La perturbation de ces systèmes dans le rein pourrait aboutir à la néphrocalcinose.

En parallèle, nous nous sommes penchés sur une famille dont la fille de 12 ans présentait ce phénotype typique d'AI associée à une hyperplasie gingivale et une néphrocalcinose, et avons supposé l'existence d'une mutation du gène *FAM20A*. Nous avons procédé au séquençage de ce gène par technique de Sanger, après extraction de l'ADN issu d'un prélèvement salivaire. Les résultats ont montré la présence d'une mutation c.1361+1G>A, encore inconnue, et la ségrégation familiale a validé l'état homozygote chez la fille et hétérozygote chez les parents. D'après les sites de prédiction, cette mutation provoquerait la perte du site donneur physiologique d'épissage avec un saut de l'exon 11 très probable, un impact sur l'ARN constitué et donc sur la protéine (Annexe 2).

Dans un autre travail collaboratif [111], nous avons réalisé une description détaillée des caractéristiques bucco-dentaires spécifiques des patients porteurs de mutations *FAM20A* à transmission récessive. La néphrocalcinose étant asymptomatique le plus souvent, c'est l'examen rénal qui va la révéler chez l'enfant atteint par l'ERS. Aussi l'AIGFS et l'ERS pourraient être en réalité la description du même syndrome, car l'examen rénal n'est pas systématique chez tous les cas d'AIGFS rapportés. Nous proposons donc de privilégier le terme ERS pour tous les phénotypes résultant de ces mutations *FAM20A*. Par ailleurs, lorsque l'ERS est suspecté, un examen multidisciplinaire par un chirurgien-dentiste, un néphrologue et généticien clinique est recommandé.

LTBP3

Concernant l'axe de recherche de nouveaux gènes, nous avons identifié *LTBP3* grâce à une approche combinée auprès de plusieurs familles.

Tout d'abord, nous avons étudié le cas de 2 sœurs atteintes par une AI associée à un retard de croissance staturale et une platispondylie. Dans cette famille consanguine, une première analyse par zones d'homozygotie n'avait pas mis en évidence des gènes particuliers. Via une collaboration avec le département de génétique de l'hôpital Robert Debré (Pr. Verloes, Paris), nous avons inclus une autre famille (non consanguine) dont les 2 enfants atteints présentaient un phénotype similaire. Les ADN de ces deux familles ont fait l'objet d'une réalisation d'exomes (Integragen®). Les résultats et l'analyse bioinformatique nous ont permis d'identifier des mutations dans le gène *LTBP3* (latent TGF-beta binding protein 3).

La rapprochement des différents résultats avec ceux obtenus pour une 3ème et une 4ème famille par l'équipe de Pr Mortier (hôpital de Ghent, Belgique), nous a permis d'aboutir à la publication suivante [123]. Dans cet article les 4 familles sont décrites. Par ailleurs le phénotype : retard de croissance staturale, brachyolmie et AI hypoplasique avait déjà été décrit en 1996 par Verloes. De plus, nous avons étudié l'expression de ce gène durant le développement et l'odontogenèse de la souris. Les résultats montrent un émail très fin, voire absent sur les incisives et les molaires du modèle de souris KO, correspondant bien au phénotype d'AI chez l'homme.

Ces travaux de recherche, soutenu par l'Université de Strasbourg, le Ministère de la Santé (Projet Hospitalier de Recherche Clinique PHRC 2008 No.4266 « Etude clinique et moléculaire des amélogénèses imparfaites »), les Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (API, 2009-2012, « Développement de la cavité buccale : du gène au phénotype clinique chez l'Homme ») et cofinancé par le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) de l'Union européenne dans le cadre du programme INTERREG IV Rhin supérieur/Offensive Sciences A27 "Manifestations bucco-dentaires des maladies rares", ont permis d'avancer dans l'identification des nouvelles mutations et nouveaux gènes impliqués dans les anomalies crânio-faciales et bucco-dentaires. Les principaux résultats mettent en avant l'intérêt des collaborations entre partenaires scientifiques, cliniques, bio-informatiques.

Les perspectives reposent sur l'augmentation des cohortes, le développement des outils de séquençage de nouvelle génération, l'étude des modèles cellulaires et animaux afin d'améliorer la compréhension de l'amélogénèse. Ces recherches futures permettront de faire évoluer la classification des AI, d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de cette maladie rare qu'est l'amélogénèse imparfaite.

ANNEXES

Les documents présentés en guise d'annexes illustrent le travail réalisé autour des gènes connus.

L'annexe 1, intitulée « Identification d'une nouvelle mutation dans le gène FAM20A à l'origine d'une amélogénèse imparfaite associée à une hyperplasie gingivale et une néphrocalcinose » est une communication affichée (7^{èmes} *assises de génétique humaine et médicale, Bordeaux 2014*) qui rapporte le cas d'une patiente présentant un phénotype d'ERS et chez qui nous avons mis en évidence une nouvelle mutation FAM20A grâce à un séquençage Sanger.

L'annexe 2, intitulée « A new mutation in ROGDI gene causes Kohlschütter-Tönz Syndrome » est une communication affichée qui reprend les résultats de la publication 1. Ce poster a été présenté pour les congrès suivants : 11th *International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, La Londe les Maures 2013* ; *Le Mois de l'Europe, Strasbourg mai 2013* ; *CNESBO, Forum des jeunes chercheurs, Strasbourg 2013* ; *GIRCI, Mini-Club de Génétique de l'Est, Strasbourg 2014*.

L'annexe 3, intitulée « Identification d'une nouvelle mutation du gène DSPP : de la mission à Madagascar au diagnostic moléculaire » est une communication orale (45^{èmes} *Journées Internationales de la SFOP, Nantes 2015*) qui illustre l'étendue du projet. En effet, le travail de thèse s'est concentré sur l'étude de l'AI, cependant dans le cadre plus général du projet Interreg A27, l'inclusion de famille et la réalisation d'exome a également permis d'obtenir des résultats concernant la dentinogenèse imparfaite. Ces données font actuellement l'objet d'une publication en cours de soumission.

L'annexe 4 est un lexique des termes génétiques employés dans ce manuscrit.

L'annexe 5 est une liste des abréviations utilisées dans ce manuscrit.

M. Hücker^{1,2,3*}, F. Mach¹, V. Hauballer-Laugel⁶, C. Stoelze⁵,
 J. Müller^{5,6}, V. Lauen⁴, H. Dörfner², A. Reuth-Zimm^{1,2,5}
¹Faculty of Dentistry, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
²Research Center for Genetic Otorhinolaryngology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
³Department of Pediatric Otorhinolaryngology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
⁴Department of Pediatric Otorhinolaryngology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
⁵Department of Pediatric Otorhinolaryngology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany
⁶Department of Pediatric Otorhinolaryngology, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany



A new mutation in *ROGD1* gene causes Kohlschütter-Tönz Syndrome

Abstract

Kohlschütter-Tönz syndrome (KTS, OMIM 628751) is a rare autosomal recessive syndrome characterized by epilepsy, psychomotor regression and amelogenetic impotence due to mutations in *ROGD1* gene (chr. 8 p11.2). Several mutations have been recently described in 2019 in Caucasian patients [1-3].

We report a case of a 12 years old girl, the first child of consanguineous parents from Mali, presenting a hypomelanized hypomature amelogenesis imperfecta, psychomotor delay and pharmacoresistant epilepsy (R-E). Considering this clinical triad, a KTS sequencing of *ROGD1* gene was proposed.

Salivary samples from the patient and her parents were collected using Oragene and genomic DNA was extracted using QIAprep LXP (Qiagen/QIAGEN K1, DNA Genotek Inc). Based on the sequence information from the Ensembl website [4], six pairs of primers were designed using the primer3 software [5]. During exon and flanking intron regions of *ROGD1* were PCR amplified. Unidirectional sequencing of the point of PCR products was performed by Applied Biosystems ABI 3730XL from GATC Biotech. Sequences were aligned and compared with reference sequences using the BioEdit software [6]. A new homozygous mutation c.157 T>G in *ROGD1* gene was identified (Fig. 1B, 2).

ROGD1 cDNA was directly sequenced to determine the consequences of the genetic mutation in order to confirm its causative role. RNA was extracted from fibroblasts from the affected patient (male skin biopsy). RT-PCR using PCR primers specific for exons 1 to 5 were designed to amplify the anticipated spliced splice site junction. The mutation c.157 T>G identifies the physiological splice donor site of exon 2, which causes the deletion of this exon and modifications in the *ROGD1* protein function (Fig. 3, 4, 5).

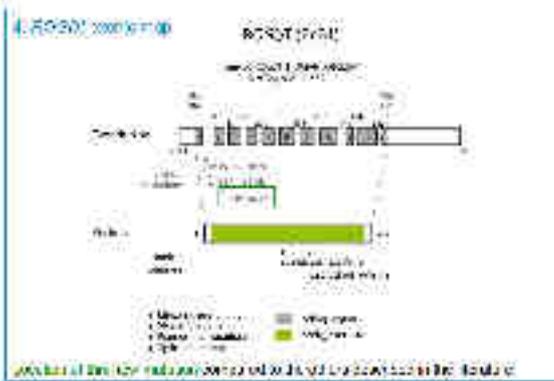
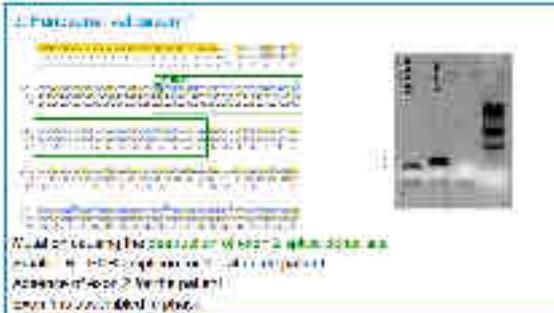
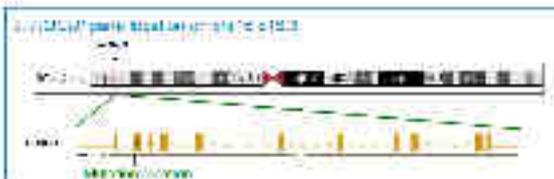
1. Identification of the location of a new heterozygous mutation (T>G) in *ROGD1* gene.

A. Affected parents phenotype:
 Hypomelanized hypomature amelogenesis imperfecta
 Psychomotor delay
 Pharmacoresistant epilepsy

C. In silico prediction:

KEYWORDS:
 Kohlschütter-Tönz syndrome, amelogenesis imperfecta, epilepsy, psychomotor regression, consanguineous parents, Mali, new mutation, *ROGD1* gene, c.157 T>G mutation, hypomelanized hypomature amelogenesis imperfecta, pharmacoresistant epilepsy, KTS, consanguineous parents, Mali, new mutation, *ROGD1* gene, c.157 T>G mutation.

CONCLUSIONS:
 The identification of this new mutation confirms the diagnosis of KTS for this patient and provides further information towards the understanding of *ROGD1* gene in enamel formation, epilepsy and neurodegeneration.



Conclusion

The identification of this new mutation confirms the diagnosis of KTS for this patient and provides further information towards the understanding of *ROGD1* gene in enamel formation, epilepsy and neurodegeneration.





**45èmes Journées Internationales
de la Société Française d'Odontologie Pédiatrique
5 et 6 juin 2015 – Nantes – Faculté de chirurgie dentaire
« Odontologie pédiatrique : faire les bons choix pour nos patients »**



COMMUNICATION ORALE

Identification d'une nouvelle mutation du gène DSPP : de la mission à Madagascar au diagnostic moléculaire

HUCKERT M.^{1,2,3}, STOETZEL C.³, MEYER J.¹, RAKOTO ALSON S.⁴, MANIERE MC.^{1,2}, BLOCH-ZUPAN A.^{1,2,5} (¹Faculté de Chirurgie-Dentaire, Université de Strasbourg (UdS), France ; ²Centre de référence des Manifestations Odontologiques des Maladies Rares, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), France ; ³Laboratoire de génétique médicale, UMR_S 1112, Faculté de Médecine, UdS, France ; ⁴Institut d'Odonto-Stomatologie Tropicale de Madagascar (IOSTM), Université de Mahajanga ; ⁵Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7104 et INSERM U964, UdS, France)

RESUME :

La dentinogenèse imparfaite est une maladie génétique à transmission autosomique dominante qui se caractérise par une hypominéralisation de la dentine, une anomalie de teinte (ambrée) des couronnes dentaires et qui affecte les deux dentures. La prévalence de cette pathologie est de 1/6000 à 1/8000 et le gène causal *DSPP*.

En 1994, une étude dans le village reculé d'Antanetilava (Madagascar) a mis en évidence des anomalies dentinaires rencontrées chez 22% du groupe étudié. Cette population isolée présente de nombreux liens de consanguinité et la croyance familiale attribuait une origine alimentaire (riz rouge ou eaux de boisson) à la maladie.

En 2004 et 2005, des expéditions ont été menées dans ce village dans le cadre d'une mission de soin et d'éducation à la santé bucco-dentaire. En parallèle, un projet de recherche a permis de collecter des données cliniques, radiographiques et des échantillons salivaires auprès de cette population.

En 2014, l'extraction d'ADN à partir des prélèvements salivaires a été réalisée pour 14 membres de cette famille (9 atteints, 5 non-atteints, prepIT-L2P OG-250 Oragene®DNA kit). Après l'étude des données phénotypiques, le diagnostic de dentinogenèse imparfaite a été posé et une étude du gène *DSPP* proposé. Ce gène contenant un grand nombre de répétitions et de zones GC-riches, son séquençage est particulièrement délicat. La réalisation d'exomes (IntegraGen, Illumina HISEQ2000) pour 5 patients atteints et 1 non atteint a donc été privilégiée.

L'analyse des résultats a mis en évidence une délétion hétérozygote d'1 pb dans l'exon 5 (p.Ser122Alafs*88) et la ségrégation familiale a été validée. Cette mutation entraîne un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré (87 positions en aval), privant très certainement la protéine d'un domaine fonctionnel important.

Cette étude illustre bien l'importance du recueil des données, de l'observation du phénotype et la notion de persévérance en matière de recherche.

Financement : Ce travail a été financé par le projet INTERREG IV/Offensive Sciences A27 « Manifestations bucco-dentaires des maladies rares » cofinancé par l'UE (FEDER).

MOTS-CLES : Dentinogenèse imparfaite, Mutation, *DSPP*

Lexique des termes utilisés concernant les mutations génétiques

- Substitution : remplacement d'un nucléotide par un autre dans la structure primaire d'un acide nucléique :
 - Synonyme : la substitution dans le codon se traduit par le même acide aminé.
 - Faux-sens : la substitution dans le codon se traduit par un acide aminé différent.
 - Non-sens : la substitution dans le codon se traduit par un codon de terminaison (codon stop) et la protéine est tronquée.
- Délétion : suppression d'un ou de plusieurs nucléotides dans la séquence primaire d'un acide nucléique :
 - Multiple de 3 nucléotides : suppression d'acides aminés, voire d'exons ou d'un gène entier.
 - Non multiple de 3 nucléotides : décalage du cadre de lecture (frameshift).
- Insertion : addition d'un ou de plusieurs nucléotides dans la séquence primaire d'un acide nucléique :
 - Multiple de 3 nucléotides : addition d'acides aminés.
 - Non multiple de 3 nucléotides : décalage du cadre de lecture (frameshift).
- Epissage (splice) : procédé par lequel l'ARN messager se transforme et se raccourcit, excluant les séquences correspondant aux introns et fusionnant les exons. L'épissage s'effectue grâce à des séquences spécifiques situées aux extrémités 5' et 3' de chaque exon appelée site donneur d'épissage et site accepteur d'épissage.
- Etat des caractères :
 - Homozygote : 2 allèles identiques d'un gène pour un même locus
 - Hétérozygote : 2 allèles différents pour un gène sur un même locus
- Etat des mutations :
 - Pour les maladies autosomiques récessives :
 - Mutation à l'état hétérozygote : le patient est sain
 - Mutation à l'état homozygote : les deux mutations parentales sont identiques et le patient est atteint.
 - Mutation à l'état hétérozygote composite : les deux mutations parentales sont différentes et le patient est atteint.
- Nomenclature des mutations :
 - g. DNA : partie de l'ADN génomique
 - c. DNA : partie de l'ADN codant
 - p. : partie de la séquence protéique
 - > : substitution nucléotidique
 - * ou X ou Stop : non-sens
 - acide aminé : nom complet, ou abréviation en 3 lettres ou en 1 lettre

del : délétion

ins : insertion

delins : insertion-délétion

+ : mutation d'épissage à partir du début de l'intron

- : mutation d'épissage à partir de la fin de l'intron

Liste des abréviations

a : améloblaste

A : angström

AD : autosomique dominant

ADN : acide désoxyribonucléique

AG : anesthésie générale

AI : amélogénèse imparfaite

AIGFS : amélogénèse imparfaite et syndrome de fibromatose gingivale

API : appel à projet inter-régional

AR : autosomique récessif

ARN : acide ribonucléique

BBP : bleu de bromo phénol

Bmp : bones morphogenetics proteins

CNIL : commission nationale de l'informatique et des libertés

CNV : copy number variation

CPP : coiffe pédodontique préformée

CVI : ciment verre-ionomère

d : dentine

d[4]Phenodent : Diagnostiquer les défauts dentaires, bases de données

DGRI : direction générale de la recherche et de l'innovation

DISC1 : disrupted in schizophrenia 1

DMH : hypominéralisation molaire en denture temporaire

e : matrice amélaire

EDX : spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie

EEC : dysplasie ectodermique avec ectrodactylie et fente palatine

EHBD : enseignement à l'hygiène bucco-dentaire

er : prisme de l'émail

ERS : email rein syndrome
F : forward ou sens
FEDER : dons européen de développement régional
Fgf : fibroblasts growth factor
HTS : high-throughput sequencing
IGBMC : institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire
IR ou Interrod : émail interprismatique
JED : jonction émail-dentine
kb : kilo-bases
KTZS : syndrome de Kohlschütter-Tönz
LOC : syndrome Laryngo-onycho-cutané
M : mitochondrie
MAP : mitogen activating protein
MEOPA : mélange équimolaire d'oxygène et de protoxyde d'azote
MIH : hypominéralisation molaire-incisive
MLS : microphthalmie avec stries linéaires cutanées
NF-kB : nuclear factor-kappa B
NGS : séquençage nouvelle génération
NNSPLICE : neural network splice
nu : noyau
o : odontoblastes
ORL : oto-rhino-laryngologie
P : périkyaties
PCR : polymérase chain reaction
PHRC : projet hospitalier de recherche clinique
R : reverse ou antisens
R ou Rod: prisme de l'émail
rER : reticulum Endoplasmique Rugueux
RMT : Région Métropolitaine Trinationale du Rhin Supérieur
RNS : syndrome de Raine

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

SFOP : société française d'odontologie pédiatrique

Shh : sonic hedgehog homolog

SNP : single nucleotide polymorphism

SR : stries de Retzius

TDO : syndrome tricho-dento-osseux

TE : Tris-EDTA

Tgf : transforming growth factor

Tm : température de fusion (melting temperature)

TNF : tumor necrosis factor

Tp : prolongement de Tomes

TW : terminal web

UV : ultra-violet

WES : whole exome sequencing

Wnt : wingless

X : chromosome X

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

WEB RESSOURCES

Phenodent/[D4] <http://www.phenodent.org>

Ensembl <http://www.ensembl.org>

Primer3 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>

UCSC <http://genome.ucsc.edu>

NNSPLICE <http://www.fruitfly.org>

Gene expression in tooth <http://bite-it.helsinki.fi>

OMIM <http://www.omim.org>

NCBI (dbSNP, uniprot, 1000 genomes browser, pubmed) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Orphanet <http://www.orpha.net>

Genosmile.eu <http://www.genosmile.eu>

Eurexpress <http://www.eurexpress.org>

Genepaint <http://www.genepaint.org>

EVS <http://evs.gs.washington.edu>

String database <http://string-db.org>

Clinical Trials <http://www.clinicaltrials.gov>

BIBLIOGRAPHIE

1. Bei, M., *Molecular genetics of tooth development*. Curr Opin Genet Dev, 2009. **19**(5): p. 504-10.
2. Simmer, J.P. and J.C. Hu, *Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry*. J Dent Educ, 2001. **65**(9): p. 896-905.
3. Bartlett, J.D. and C.E. Smith, *Modulation of cell-cell junctional complexes by matrix metalloproteinases*. J Dent Res, 2013. **92**(1): p. 10-7.
4. Goldberg, M., *Manuel d'histologie et de biologie Buccale*. Masson ed. 1993. 43-52.
5. Simon, F., *Amélogénèse Imparfaites : quelles sont les données acquises de la science ?* Thèse de Docteur en Chirurgie Dentaire soutenue à Lyon, 2013.
6. Simmer, J.P., et al., *Regulation of dental enamel shape and hardness*. J Dent Res, 2010. **89**(10): p. 1024-38.
7. Thesleff, I. and P. Sharpe, *Signalling networks regulating dental development*. Mech Dev, 1997. **67**(2): p. 111-23.
8. Bei, M., *Molecular genetics of ameloblast cell lineage*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2009. **312B**(5): p. 437-44.
9. Alliot-Licht, B., *Morphogénèse cranio-faciale et Odontogénèse*. UE spécifique odontologie-PACES [en ligne] <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=1903402> (consulté le 24 août 2015), 2012.
10. Nanci, A., *Ten Cate's Oral Histology : Development, Structure and Function*, ed. Elsevier. 2012.
11. Robinson, C., *Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 388.
12. McGuire, J.D., et al., *Enamel organic matrix: potential structural role in enamel and relationship to residual basement membrane constituents at the dentin enamel junction*. Connect Tissue Res, 2014. **55 Suppl 1**: p. 33-7.
13. Bartlett, J.D., *Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates*. ISRN Dent, 2013. **2013**: p. 684607.
14. Hu, J.C., et al., *Enamel formation and amelogenesis imperfecta*. Cells Tissues Organs, 2007. **186**(1): p. 78-85.
15. Piette E, G.M., *La dent normale et pathologique*, ed. DeBoeck. 2001.
16. Parry, D.A., et al., *Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(2): p. 266-73.
17. He, L.H. and M.V. Swain, *Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics*. J Mech Behav Biomed Mater, 2008. **1**(1): p. 18-29.
18. Lynch, C.D., et al., *Hunter-Schreger Band patterns in human tooth enamel*. J Anat, 2010. **217**(2): p. 106-15.
19. Caruntu, I., *Morfogeneza sistemului stomatognat and Histologia sistemului stomatognat*. [en ligne] http://iasi-medecine.weebly.com/uploads/5/4/8/2/5482113/email_fr.pdf (consulté le 24 août 2015), 2000 and 2001.
20. Simon, A., *Corrélations phénotypes/génotypes des défauts ultra-structuraux de l'émail dans les amélogénèses imparfaites*. Thèse de Docteur en Chirurgie Dentaire soutenue à Strasbourg, 2014.
21. Jung, S.H., M. and F.M. Clauss, M.C., *Traitement conservateur des dents atteintes d'hypominéralisations molaires-incisives (MIH)*. Réalités Cliniques, 2012. **23**(4): p. 271-80.
22. Muller-Bolla, M., *Fiches pratiques d'odontologie pédiatrique*. Editions CdP, 2014.
23. Crawford, P.J., M. Aldred, and A. Bloch-Zupan, *Amelogenesis imperfecta*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: 17.
24. Aldred, M.J., R. Savarirayan, and P.J. Crawford, *Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century*. Oral Dis, 2003. **9**(1): p. 19-23.
25. Witkop, C.J., Jr., *Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification*. J Oral Pathol, 1988. **17**(9-10): p. 547-53.

26. Nusier, M., et al., *Phenotypic diversity and revision of the nomenclature for autosomal recessive amelogenesis imperfecta*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. **97**(2): p. 220-30.
27. Pavlic, A., et al., *Severely hypoplastic amelogenesis imperfecta with taurodontism*. Int J Paediatr Dent, 2007. **17**(4): p. 259-66.
28. Gadhia, K., et al., *Amelogenesis imperfecta: an introduction*. Br Dent J, 2012. **212**(8): p. 377-9.
29. Wang, X.P., et al., *Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 719-30.
30. Bloch-Zupan, A., *Les Amélogénèses Imparfaites*. Clinica, 2010. **31**: p. 512-16.
31. Hart, T.C. and P.S. Hart, *Genetic studies of craniofacial anomalies: clinical implications and applications*. Orthod Craniofac Res, 2009. **12**(3): p. 212-20.
32. Pousette Lundgren, G., et al., *A Randomized Controlled Trial of Crown Therapy in Young Individuals with Amelogenesis Imperfecta*. J Dent Res, 2015. **94**(8): p. 1041-7.
33. Marquezin, M.C., et al., *Aesthetic and functional rehabilitation of the primary dentition affected by amelogenesis imperfecta*. Case Rep Dent, 2015. **2015**: ID790890.
34. Koruyucu, M., et al., *Clinical findings and long-term managements of patients with amelogenesis imperfecta*. Eur J Dent, 2014. **8**(4): p. 546-52.
35. Pini, N.I., et al., *Enamel microabrasion: An overview of clinical and scientific considerations*. World J Clin Cases, 2015. **3**(1): p. 34-41.
36. Alachioti, X.S., et al., *Amelogenesis imperfecta and anterior open bite: Etiological, classification, clinical and management interrelationships*. J Orthod Sci, 2014. **3**(1): p. 1-6.
37. Kamble, V.D. and R.D. Parkhedkar, *Multidisciplinary approach for restoring function and esthetics in a patient with amelogenesis imperfecta: a clinical report*. J Clin Diagn Res, 2013. **7**(12): p. 3083-5.
38. Corcuera-Flores, J.R., et al., *Dental treatment for handicapped patients; sedation vs general anesthesia and update of dental treatment in patients with different diseases*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2014. **19**(2): e170-6.
39. Dong, J., et al., *Enamelin maps to human chromosome 4q21 within the autosomal dominant amelogenesis imperfecta locus*. Eur J Oral Sci, 2000. **108**(5): p. 353-8.
40. Kawasaki, K. and K.M. Weiss, *Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4060-5.
41. Gibson, C.W., et al., *Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31871-5.
42. Salido, E.C., et al., *The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes*. Am J Hum Genet, 1992. **50**(2): p. 303-16.
43. Chan, H.C., et al., *Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds*. Eur J Oral Sci, 2011. **119 Suppl 1**: p. 311-23.
44. Greene, S.R., et al., *A new frameshift mutation encoding a truncated amelogenin leads to X-linked amelogenesis imperfecta*. Arch Oral Biol, 2002. **47**(3): p. 211-7.
45. Hart, P.S., et al., *A nomenclature for X-linked amelogenesis imperfecta*. Arch Oral Biol, 2002. **47**(4): p. 255-60.
46. Hart, P.S., et al., *Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations*. Arch Oral Biol, 2002. **47**(4): p. 261-5.
47. Lagerstrom, M., et al., *A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1)*. Genomics, 1991. **10**(4): p. 971-5.
48. Wright, J.T., *The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta*. Am J Med Genet A, 2006. **140**(23): p. 2547-55.
49. Wright, J.T., et al., *Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families*. Cells Tissues Organs, 2006. **194**(2-4): p. 279-83.
50. Kim, J.W., et al., *A novel splice acceptor mutation in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II*. Hum Genet, 2004. **115**(3): p. 248-54.
51. Sekiguchi, H., et al., *A case of amelogenesis imperfecta of deciduous and all permanent teeth*. Bull Tokyo Dent Coll, 2001. **42**(1): p. 45-50.

52. Lench, N.J. and G.B. Winter, *Characterisation of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1)*. Hum Mutat, 1995. **5**(3): p. 251-9.
53. Hobson, G.M., et al., *A large X-chromosomal deletion is associated with microphthalmia with linear skin defects (MLS) and amelogenesis imperfecta (XAI)*. Am J Med Genet A, 2009. **149A**(8): p. 1698-705.
54. Rajpar, M.H., et al., *Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(16): p. 1673-7.
55. Mardh, C.K., et al., *A nonsense mutation in the enamelin gene causes local hypoplastic autosomal dominant amelogenesis imperfecta (AIH2)*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 1069-74.
56. Hart, T.C., et al., *Novel ENAM mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localised enamel defects*. J Med Genet, 2003. **40**(12): p. 900-6.
57. Lindemeyer, R.G., C.W. Gibson, and T.J. Wright, *Amelogenesis imperfecta due to a mutation of the enamelin gene: clinical case with genotype-phenotype correlations*. Pediatr Dent, 2010. **32**(1): p. 56-60.
58. Kim, J.W., et al., *Mutational analysis of candidate genes in 24 amelogenesis imperfecta families*. Eur J Oral Sci, 2006. **114 Suppl 1**: p. 3-12; discussion 39-41, 379.
59. Krebsbach, P.H., et al., *Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene*. J Biol Chem, 1996. **271**(8): p. 4431-5.
60. MacDougall, M., et al., *Ameloblastin gene (AMBN) maps within the critical region for autosomal dominant amelogenesis imperfecta at chromosome 4q21*. Genomics, 1997. **41**(1): p. 115-8.
61. Poulter, J.A., et al., *Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(20): p. 5317-24.
62. Kivirikko, S., et al., *Mutational hotspots in the LAMB3 gene in the lethal (Herlitz) type of junctional epidermolysis bullosa*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(2): p. 231-7.
63. Kim, J.W., et al., *LAMB3 mutations causing autosomal-dominant amelogenesis imperfecta*. J Dent Res, 2013. **92**(10): p. 899-904.
64. Poulter, J.A., et al., *Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta*. Eur J Hum Genet, 2014. **22**(1): p. 132-5.
65. Huckert M, et al., *Épidermolyse bulleuse dystrophique, particularités de la prise en charge sous anesthésie générale* RFOP, 2011. **6**(4): p. 170-174.
66. Burgeson, R.E., et al., *A new nomenclature for the laminins*. Matrix Biol, 1994. **14**(3): p. 209-11.
67. Phillips, R.J., et al., *Laryngo-onycho-cutaneous syndrome: an inherited epithelial defect*. Arch Dis Child, 1994. **70**(4): p. 319-26.
68. Yuen, W.Y., et al., *Enamel defects in carriers of a novel LAMA3 mutation underlying epidermolysis bullosa*. Acta Derm Venereol, 2012. **92**(6): p. 695-6.
69. Burgeson, R.E., et al., *The structure of type VII collagen*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **460**: p. 47-57.
70. Saito, M., T. Masunaga, and A. Ishiko, *A novel de novo splice-site mutation in the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB): specific exon skipping could be a prognostic factor for DDEB pruriginosa*. Clin Exp Dermatol, 2009. **34**(8): e934-6.
71. Umemoto, H., et al., *Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts*. Am J Pathol, 2012. **181**(5): p. 1659-71.
72. Franzke, C.W., et al., *Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs*. Embo J, 2002. **21**(19): p. 5026-35.
73. Nakamura, H., et al., *Analysis of the COL17A1 in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa and amelogenesis imperfecta*. Int J Mol Med, 2006. **18**(2): p. 333-7.
74. Lee, S.K., et al., *Mutational spectrum of FAM83H: the C-terminal portion is required for tooth enamel calcification*. Hum Mutat, 2008. **29**(8): e95-9.
75. Kim, J.W., et al., *FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta*. Am J Hum Genet, 2008. **82**(2): p. 489-94.

76. Hart, P.S., et al., *Novel FAM83H mutations in Turkish families with autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta*. Clin Genet, 2009. **75**(4): p. 401-4.
77. El-Sayed, W., et al., *Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal-recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(5): p. 699-705.
78. Wright, J.T., et al., *Phenotypic variation in FAM83H-associated amelogenesis imperfecta*. J Dent Res, 2009. **88**(4): p. 356-60.
79. Parry, D.A., et al., *Mutations in C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(3): p. 565-71.
80. Parry, D., et al., *Identification of Mutations in SLC24A4, Encoding a Potassium-Dependent Sodium/Calcium Exchanger, as a Cause of Amelogenesis Imperfecta*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(2): p. 307-12.
81. Wang, S., et al., *STIM1 and SLC24A4 Are Critical for Enamel Maturation*. J Dent Res, 2014. **93**(7 suppl): p. 94S-100S.
82. Sulem, P., et al., *Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans*. Nat Genet, 2007. **39**(12): p. 1443-52.
83. Wang, S.K., et al., *ITGB6 loss-of-function mutations cause autosomal recessive amelogenesis imperfecta*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(8): p. 2157-63.
84. Seymen, F., et al., *Novel ITGB6 mutation in autosomal recessive amelogenesis imperfecta*. Oral Dis, 2015. **21**(4): p. 456-61.
85. Poulter, J.A., et al., *A missense mutation in ITGB6 causes pitted hypomineralized amelogenesis imperfecta*. Hum Mol Genet, 2014. **23**(8): p. 2189-97.
86. Caterina, J.J., et al., *Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49598-604.
87. Bartlett, J.D., et al., *Matrix metalloproteinase 20 promotes a smooth enamel surface, a strong dentino-enamel junction, and a decussating enamel rod pattern*. Eur J Oral Sci, 2011. **119** Suppl 1: p. 199-205.
88. Papagerakis, P., et al., *Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta*. J Dent Res, 2008. **87**(1): p. 56-9.
89. Gasse, B., et al., *Homozygous and compound heterozygous MMP20 mutations in amelogenesis imperfecta*. J Dent Res, 2013. **92**(7): p. 598-603.
90. Kim, J.W., et al., *MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta*. J Med Genet, 2005. **42**(3): p. 271-5.
91. Ozdemir, D., et al., *MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta*. J Dent Res, 2005. **84**(11): p. 1031-5.
92. Wang, S.K., et al., *Novel KLK4 and MMP20 mutations discovered by whole-exome sequencing*. J Dent Res, 2013. **92**(3): p. 266-71.
93. Lee, S.K., et al., *MMP20 hemopexin domain mutation in amelogenesis imperfecta*. J Dent Res, 2010. **89**(1): p. 46-50.
94. Hu, J.C., et al., *Characterization of the mouse and human PRSS17 genes, their relationship to other serine proteases, and the expression of PRSS17 in developing mouse incisors*. Gene, 2000. **251**(1): p. 1-8.
95. Hart, P.S., et al., *Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta*. J Med Genet, 2004. **41**(7): p. 545-9.
96. Katsura, K.A., et al., *WDR72 models of structure and function: a stage-specific regulator of enamel mineralization*. Matrix Biol, 2014. **38**: p. 48-58.
97. Lee, S.K., et al., *Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization*. J Dent Res, 2010. **89**(12): p. 1378-82.
98. Lacruz, R.S., et al., *Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling*. J Cell Physiol, 2012. **227**(5): p. 2264-75.

99. Picard, C., et al., *STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity*. N Engl J Med, 2009. **360**(19): p. 1971-80.
100. Bohm, J., et al., *Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy*. Am J Hum Genet, 2013. **92**(2): p. 271-8.
101. Misceo, D., et al., *A dominant STIM1 mutation causes Stormorken syndrome*. Hum Mutat, 2014. **35**(5): p. 556-64.
102. Deutsch, D., et al., *Mapping of the human tuftelin (TUFT1) gene to chromosome 1 by fluorescence in situ hybridization*. Mamm Genome, 1994. **5**(7): p. 461-2.
103. Jeremias, F., et al., *Genes expressed in dental enamel development are associated with molar-incisor hypomineralization*. Arch Oral Biol, 2013. **58**(10): p. 1434-42.
104. Hassan, M.Q., et al., *Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(20): p. 9248-61.
105. Dong, J., et al., *DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism*. Am J Med Genet A, 2005. **133A**(2): p. 138-41.
106. Price, J.A., et al., *Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(3): p. 563-9.
107. Zhang, Z., et al., *Transcriptional factor DLX3 promotes the gene expression of enamel matrix proteins during amelogenesis*. PLoS One, 2015. **10**(3): e0121288.
108. Wright, J.T., et al., *DLX3 c.561_562delCT mutation causes attenuated phenotype of tricho-dento-osseous syndrome*. Am J Med Genet A, 2008. **146A**(3): p. 343-9.
109. Nalbant, D., et al., *FAM20: an evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells*. BMC Genomics, 2005. **6**: 11.
110. Jaureguiberry, G., et al., *Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations*. Nephron Physiol, 2012. **122**(1-2): p. 1-6.
111. de la Dure-Molla, M., et al., *Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations*. Orphanet J Rare Dis, 2014. **9**: 84.
112. Yang, A., et al., *p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities*. Mol Cell, 1998. **2**(3): p. 305-16.
113. Kantaputra, P.N., O. Matangkasombut, and W. Sripathomsawat, *Split hand-split foot-ectodermal dysplasia and amelogenesis imperfecta with a TP63 mutation*. Am J Med Genet A, 2012. **158A**(1): p. 188-92.
114. Alves, L.U., et al., *A novel c.1037C > G (p.Ala346Gly) mutation in TP63 as cause of the ectrodactyly-ectodermal dysplasia and cleft lip/palate (EEC) syndrome*. Genet Mol Biol, 2015. **38**(1): p. 37-41.
115. Polok, B., et al., *Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(2): p. 259-65.
116. Schossig, A., et al., *Mutations in ROGDI Cause Kohlschutter-Tonz Syndrome*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(4): p. 701-7.
117. Schossig, A., et al., *Epileptic encephalopathy and amelogenesis imperfecta: Kohlschutter-Tonz syndrome*. Eur J Med Genet, 2012. **55**(5): p. 319-22.
118. Mory, A., et al., *A nonsense mutation in the human homolog of Drosophila rogdi causes Kohlschutter-Tonz syndrome*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(4): p. 708-14.
119. Huckert, M., et al., *A Novel Mutation in the ROGDI Gene in a Patient with Kohlschutter-Tonz Syndrome*. Mol Syndromol, 2014. **5**(6): p. 293-8.
120. Tucci, A., et al., *Kohlschutter-Tonz syndrome: mutations in ROGDI and evidence of genetic heterogeneity*. Hum Mutat, 2013. **34**(2): p. 296-300.
121. Oklu, R. and R. Hesketh, *The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family*. Biochem J, 2000. **352 Pt 3**: p. 601-10.
122. Verloes, A., et al., *A new form of skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta and platyspondyly*. Clin Genet, 1996. **49**(1): p. 2-5.

123. Huckert, M., et al., *Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(11): p. 3038-49.
124. Dugan, S.L., et al., *New recessive truncating mutation in LTBP3 in a family with oligodontia, short stature, and mitral valve prolapse*. Am J Med Genet A, 2015. **167**(6): p.1396-9.
125. Noor, A., et al., *Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF-beta binding protein 3*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(4): p. 519-23.
126. Bertola, D.R., et al., *Brachyolmia with amelogenesis imperfecta: further evidence of a distinct entity*. Am J Med Genet A, 2009. **149A**(3): p. 532-4.
127. Hao, J., et al., *Dentin matrix protein 4, a novel secretory calcium-binding protein that modulates odontoblast differentiation*. J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15357-65.
128. Tagliabracci, V.S., L.A. Pinna, and J.E. Dixon, *Secreted protein kinases*. Trends Biochem Sci, 2012. **38**(3): p. 121-30.
129. Simpson, M.A., et al., *Mutations in FAM20C also identified in non-lethal osteosclerotic bone dysplasia*. Clin Genet, 2009. **75**(3): p. 271-6.
130. Acevedo, A.C., et al., *Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations*. BMC Med Genet, 2015. **16**: 8.
131. Heimler, A., et al., *Sensorineural hearing loss, enamel hypoplasia, and nail abnormalities in sibs*. Am J Med Genet, 1991. **39**(2): p. 192-5.
132. Witkop, C.J., Jr., L.J. Brearley, and W.C. Gentry, Jr., *Hypoplastic enamel, onycholysis, and hypohidrosis inherited as an autosomal dominant trait. A review of ectodermal dysplasia syndromes*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1975. **39**(1): p. 71-86.
133. Al-Dosari, M.S., et al., *3M syndrome: an easily recognizable yet underdiagnosed cause of proportionate short stature*. J Pediatr, 2012. **161**(1): p. 139-45.
134. Robertson, I.B., et al., *Latent TGF-beta-binding proteins*. Matrix Biol, 2015.
135. Laugel-Haushalter, V., et al., *Molars and incisors: show your microarray IDs*. BMC Res Notes, 2013. **6**: 113.
136. Prasad MK, et al., *A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with oro-dental involvement*. 2015. **En révision Journal of Medical Genetics**.
137. Jensen, P., et al., *A neurogenomics approach to gene expression analysis in the developing brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2004. **132**(2): p. 116-27.
138. Bloch-Zupan, A.S., H. Scully, C., *Dento/Oro/Craniofacial Anomalies and Genetics*. Elsevier Inc. London, 2012.
139. Desmet, F.O., et al., *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(9): e67.
140. Kohlschutter, A., et al., *Familial epilepsy and yellow teeth--a disease of the CNS associated with enamel hypoplasia*. Helv Paediatr Acta, 1974. **29**(4): p. 283-94.
141. Mory, A., et al., *Kohlschutter-Tonz syndrome: clinical and genetic insights gained from 16 cases deriving from a close-knit village in Northern Israel*. Pediatr Neurol, 2014. **50**(4): p. 421-6.
142. NCBI, *Database resources of the National Center for Biotechnology Information*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Database issue): D8-D20.
143. Powell, S., et al., *eggNOG v3.0: orthologous groups covering 1133 organisms at 41 different taxonomic ranges*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): D284-9.
144. Punta, M., et al., *The Pfam protein families database*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): D290-301.
145. Reese, M.G., et al., *Improved splice site detection in Genie*. J Comput Biol, 1997. **4**(3): p. 311-23.
146. Yeo, G. and C.B. Burge, *Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals*. J Comput Biol, 2004. **11**(2-3): p. 377-94.
147. Bloch-Zupan, A., *When neuropediatrics meets odontology*. Neuropediatrics, 2007. **38**(2): p. 57-8.
148. Begue-Kirn, C., et al., *Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation*. Eur J Oral Sci, 1998. **106**(5): p. 963-70.

149. Al-Hashimi, N., J.Y. Sire, and S. Delgado, *Evolutionary analysis of mammalian enamelin, the largest enamel protein, supports a crucial role for the 32-kDa peptide and reveals selective adaptation in rodents and primates*. J Mol Evol, 2009. **69**(6): p. 635-56.
150. Bartlett, J.D., et al., *Enamelysin mRNA displays a developmentally defined pattern of expression and encodes a protein which degrades amelogenin*. Connect Tissue Res, 1998. **39**(1-3): p. 101-9; discussion 141-9.
151. Bartlett, J.D., et al., *A developmental comparison of matrix metalloproteinase-20 and amelogenin null mouse enamel*. Eur J Oral Sci, 2006. **114 Suppl 1**: p. 18-23; discussion 39-41, 379.
152. Caterina, J., et al., *Cloning, characterization, and expression analysis of mouse enamelysin*. J Dent Res, 2000. **79**(9): p. 1697-703.
153. Delgado, S., M. Ishiyama, and J.Y. Sire, *Validation of amelogenesis imperfecta inferred from amelogenin evolution*. J Dent Res, 2007. **86**(4): p. 326-30.
154. Hu, J.C., et al., *Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars*. Eur J Oral Sci, 2002. **110**(4): p. 307-15.
155. Kawasaki, K. and T. Suzuki, *Molecular evolution of matrix metalloproteinase 20*. Eur J Oral Sci, 2011. **119 Suppl 1**: p. 247-53.
156. Lu, Y., et al., *Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation*. Biol Chem, 2008. **389**(6): p. 695-700.
157. Meredith, R.W., et al., *Pseudogenization of the tooth gene enamelysin (MMP20) in the common ancestor of extant baleen whales*. Proc Biol Sci, 2011. **278**(1708): p. 993-1002.
158. Simmer, J.P. and J.C. Hu, *Expression, structure, and function of enamel proteinases*. Connect Tissue Res, 2002. **43**(2-3): p. 441-9.
159. Uskokovic, V., et al., *Hydrolysis of amelogenin by matrix metalloproteinase-20 accelerates mineralization in vitro*. Arch Oral Biol, 2011. **56**(12): p. 1548-59.
160. Wright, J.T., et al., *Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families*. Cells Tissues Organs, 2011. **194**(2-4): p. 279-83.
161. Yamakoshi, Y., et al., *Enamel proteins and proteases in Mmp20 and Klk4 null and double-null mice*. Eur J Oral Sci, 2011. **119 Suppl 1**: p. 206-16.
162. Evan, A.P., R.J. Unwin, and J.C. Williams, Jr., *Renal stone disease: a commentary on the nature and significance of Randall's plaque*. Nephron Physiol, 2011. **119**(4): p. p49-53.
163. Kleta, R. and D. Bockenhauer, *Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies*. Nephron Physiol, 2006. **104**(2): p. p73-80.
164. Vivante, A., et al., *Familial autosomal recessive renal tubular acidosis: importance of early diagnosis*. Nephron Physiol, 2011. **119**(3): p. p31-9.
165. Bockenhauer, D., et al., *Epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations*. N Engl J Med, 2009. **360**(19): p. 1960-70.
166. Carr, I.M., et al., *IBDfinder and SNPsetter: tools for pedigree-independent identification of autozygous regions in individuals with recessive inherited disease*. Hum Mutat, 2009. **30**(6): p. 960-7.
167. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
168. McKenna, A., et al., *The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data*. Genome Res, 2010. **20**(9): p. 1297-303.
169. Dellow, E.L., et al., *Amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, and hypocalciuria syndrome in two siblings from a large family with consanguineous parents*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(12): p. 3193-6.
170. Paula, L.M., et al., *Case report of a rare syndrome associating amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis in a consanguineous family*. Arch Oral Biol, 2005. **50**(2): p. 237-42.
171. Martelli-Junior, H., et al., *Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome: a case report and review of the literature*. Nephron Physiol, 2011. **118**(3): p. p62-5.

172. Hall, R.K., et al., *Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. Case studies of clinical features and ultrastructure of tooth enamel in two siblings*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1995. **79**(5): p. 583-92.
173. Berdal, A., et al., *Cell- and stage-specific expression of vitamin D receptor and calbindin genes in rat incisor: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. Dev Biol, 1993. **155**(1): p. 172-9.
174. Bleich, M., Q. Shan, and N. Himmerkus, *Calcium regulation of tight junction permeability*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1258**: p. 93-9.
175. Goldsmith, D.J. and J. Cunningham, *Mineral metabolism and vitamin D in chronic kidney disease--more questions than answers*. Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(6): p. 341-6.
176. Loupy, A., et al., *PTH-independent regulation of blood calcium concentration by the calcium-sensing receptor*. J Clin Invest, 2012. **122**(9): p. 3355-67.
177. O'Sullivan, J., et al., *Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(5): p. 616-20.
178. Cho, S.H., et al., *Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta*. Hum Mutat, 2012. **33**(1): p. 91-4.
179. Shan, Q., et al., *Insights into driving forces and paracellular permeability from claudin-16 knockdown mouse*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1165**: p. 148-51.
180. Dimke, H., J.G. Hoenderop, and R.J. Bindels, *Molecular basis of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport: insights from the TRP channel family*. J Physiol, 2011. **589**(Pt 7): p. 1535-42.
181. Breiderhoff, T., et al., *Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(35): p. 14241-6.
182. An, C., et al., *A transgenic mouse line with a 58-kb fragment deletion in chromosome 11E1 that encompasses part of the Fam20a gene and its upstream region shows growth disorder*. Kobe J Med Sci, 2010. **55**(4): p. E82-92.
183. Vogel, P., et al., *Amelogenesis imperfecta and other biomineralization defects in Fam20a and Fam20c null mice*. Vet Pathol, 2012. **49**(6): p. 998-1017.
184. Gonzalez-Begne, M., et al., *Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT)*. J Proteome Res, 2009. **8**(3): p. 1304-14.
185. Qian, W.J., et al., *Enhanced detection of low abundance human plasma proteins using a tandem IgY12-SuperMix immunoaffinity separation strategy*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(10): p. 1963-73.
186. MacGibbon, D., *Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction*. Aust Dent J, 1972. **17**(1): p. 61-3.
187. Cetrullo, N., M.G. Guadagni, and G. Piana, *Two cases of familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: dental findings*. Eur J Paediatr Dent, 2006. **7**(3): p. 146-50.
188. Elizabeth, J., et al., *Amelogenesis imperfecta with renal disease--a report of two cases*. J Oral Pathol Med, 2007. **36**(10): p. 625-8.
189. Lubinsky, M., et al., *Syndrome of amelogenesis imperfecta, nephrocalcinosis, impaired renal concentration, and possible abnormality of calcium metabolism*. Am J Med Genet, 1985. **20**(2): p. 233-43.
190. Normand de la Tranchade, I., et al., *Amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis: a new case of this rare syndrome*. J Clin Pediatr Dent, 2003. **27**(2): p. 171-5.
191. Phakey, P., et al., *Ultrastructural study of tooth enamel with amelogenesis imperfecta in Al-nephrocalcinosis syndrome*. Connect Tissue Res, 1995. **32**(1-4): p. 253-9.
192. Suda, N., Y. Kitahara, and K. Ohyama, *A case of amelogenesis imperfecta, cleft lip and palate and polycystic kidney disease*. Orthod Craniofac Res, 2006. **9**(1): p. 52-6.
193. Kala Vani, S.V., M. Varsha, and Y.U. Sankar, *Enamel renal syndrome: a rare case report*. J Indian Soc Pedod Prev Dent, 2012. **30**(2): p. 169-72.
194. Wang, S.K., et al., *FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS)*. PLoS Genet, 2013. **9**(2): e1003302.

195. Kantaputra, P.N., et al., *Enamel-Renal-Gingival syndrome, hypodontia, and a novel FAM20A mutation*. Am J Med Genet A, 2014. **164A**(8): p. 2124-8.
196. Cabral, R.M., et al., *Autosomal recessive gingival hyperplasia and dental anomalies caused by a 29-base pair duplication in the FAM20A gene*. J Hum Genet, 2013. **58**(8): p. 566-7.
197. Wang, S.K., et al., *FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome*. J Dent Res, 2014. **93**(1): p. 42-8.
198. Backman, B. and A.K. Holm, *Amelogenesis imperfecta: prevalence and incidence in a northern Swedish county*. Community Dent Oral Epidemiol, 1986. **14**(1): p. 43-7.
199. Witkop, C.J., *Hereditary defects in enamel and dentin*. Acta Genet Stat Med, 1957. **7**(1): p. 236-9.
200. Chosack, A., et al., *Amelogenesis imperfecta among Israeli Jews and the description of a new type of local hypoplastic autosomal recessive amelogenesis imperfecta*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1979. **47**(2): p. 148-56.
201. Ooya, K., J. Nalbandian, and T. Noikura, *Autosomal recessive rough hypoplastic amelogenesis imperfecta. A case report with clinical, light microscopic, radiographic, and electron microscopic observations*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1988. **65**(4): p. 449-58.
202. Nakata, M., O. Kimura, and D. Bixler, *Interradicular dentin dysplasia associated with amelogenesis imperfecta*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1985. **60**(2): p. 182-7.
203. dos Santos Neto, P., et al., *Imaging evaluation of the gingival fibromatosis and dental abnormalities syndrome*. Dentomaxillofac Radiol, 2011. **40**(4): p. 236-43.
204. Martelli-Junior, H., et al., *Case reports of a new syndrome associating gingival fibromatosis and dental abnormalities in a consanguineous family*. J Periodontol, 2008. **79**(7): p. 1287-96.
205. Feller, L., et al., *Enamel dysplasia with hamartomatous atypical follicular hyperplasia (EDHFH) syndrome: suggested pathogenic mechanisms*. Sadj, 2008. **63**(2): p. 102-5.
206. Peters, E., M. Cohen, and M. Altini, *Rough hypoplastic amelogenesis imperfecta with follicular hyperplasia*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1992. **74**(1): p. 87-92.
207. Roquebert, D., et al., *Amelogenesis imperfecta, rough hypoplastic type, dental follicular hamartomas and gingival hyperplasia: report of a case from Central America and review of the literature*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. **106**(1): p. 92-8.
208. van Heerden, W.F., et al., *Amelogenesis imperfecta: multiple impactions associated with odontogenic fibromas (WHO) type*. J Dent Assoc S Afr, 1990. **45**(11): p. 467-71.
209. Feller, L., et al., *Enamel dysplasia with odontogenic fibroma-like hamartomas: review of the literature and report of a case*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(5): p. 620-4.
210. Miloglu, O., et al., *Pre-eruptive coronal resorption and congenitally missing teeth in a patient with amelogenesis imperfecta: a case report*. Eur J Dent, 2009. **3**(2): p. 140-4.
211. Hegde, S., *Multiple unerupted teeth with amelogenesis imperfecta in siblings*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(5): p. 235-7.
212. Raubenheimer, E.J. and C.E. Noffke, *Central odontogenic fibroma-like tumors, hypodontia, and enamel dysplasia: review of the literature and report of a case*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002. **94**(1): p. 74-7.
213. Fu, X.J., et al., *Enamel-renal syndrome associated with hypokalaemic metabolic alkalosis and impaired renal concentration: a novel syndrome?* Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(10): p. 2959-62.
214. Tagliabracci, V.S., et al., *Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization*. Science, 2012. **336**(6085): p. 1150-3.
215. Eames, B.F., et al., *Mutations in fam20b and xylt1 reveal that cartilage matrix controls timing of endochondral ossification by inhibiting chondrocyte maturation*. PLoS Genet, 2011. **7**(8): e1002246.
216. Molla, M., et al., *Enamel protein regulation and dental and periodontal physiopathology in MSX2 mutant mice*. Am J Pathol, 2010. **177**(5): p. 2516-26.
217. Ababneh, F.K., et al., *Hereditary deletion of the entire FAM20C gene in a patient with Raine syndrome*. Am J Med Genet A, 2013. **161A**(12): p. 3155-60.

218. Wright, J.T., L.B. Johnson, and J.D. Fine, *Development defects of enamel in humans with hereditary epidermolysis bullosa*. Arch Oral Biol, 1993. **38**(11): p. 945-55.
219. Nibali, L., et al., *Hereditary gingival hyperplasia associated with amelogenesis imperfecta: a case report*. Quintessence Int, 2012. **43**(6): p. 483-9.
220. Ravi Prakash, S.M., G.N. Suma, and S. Goel, *Cowden syndrome*. Indian J Dent Res, 2010. **21**(3): p. 439-42.
221. Kumar, C.A., et al., *Oral hamartomas with von Recklinghausen disease*. Ann Saudi Med, 2011. **31**(4): p. 428-30.
222. Araujo Lde, J., et al., *Oral and neurocutaneous phenotypes of familial tuberous sclerosis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2011. **111**(1): p. 87-94.
223. Subramaniam, P., M. Gupta, and A. Mehta, *Oral health status in children with renal disorders*. J Clin Pediatr Dent, 2012. **37**(1): p. 89-93.
224. Lin, H.M., et al., *Localization of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation*. Calcif Tissue Int, 1994. **55**(1): p. 38-45.
225. Josephsen, K., et al., *Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(6): C1299-307.
226. Paine, M.L., et al., *Role of NBCe1 and AE2 in secretory ameloblasts*. J Dent Res, 2008. **87**(4): p. 391-5.
227. Hashem, A., et al., *Impact of moderate and severe hypodontia and amelogenesis imperfecta on quality of life and self-esteem of adult patients*. J Dent, 2013. **41**(8): p. 689-94.
228. Dabovic, B., et al., *Bone defects in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice; a role for Ltbp in TGF-beta presentation*. J Endocrinol, 2002. **175**(1): p. 129-41.
229. Dabovic, B., et al., *Bone abnormalities in latent TGF-[beta] binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-[beta] bioavailability*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 227-32.
230. Dabovic, B., et al., *Osteopetrosis-like phenotype in latent TGF-beta binding protein 3 deficient mice*. Bone, 2005. **37**(1): p. 25-31.
231. Nieman, B.J., M.D. Wong, and R.M. Henkelman, *Genes into geometry: imaging for mouse development in 3D*. Curr Opin Genet Dev, 2011. **21**(5): p. 638-46.
232. Klopčič, B., et al., *TGF-beta superfamily signaling is essential for tooth and hair morphogenesis and differentiation*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(11-12): p. 781-99.
233. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.
234. Hyttiäinen, M., C. Penttinen, and J. Keski-Oja, *Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2004. **41**(3): p. 233-64.
235. Penttinen, C., et al., *Secretion of human latent TGF-beta-binding protein-3 (LTBP-3) is dependent on co-expression of TGF-beta*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 17): p. 3457-68.
236. Inage, T., et al., *Ultrastructural differentiation in the distal ends of ameloblasts from the presecretory zone to the early secretory zone*. J Nihon Univ Sch Dent, 1990. **32**(4): p. 259-69.
237. Zhu, Q., et al., *In situ hybridization analysis of transforming growth factor-beta 1 RNA expression during mouse tooth development*. Chin J Dent Res, 2000. **3**(2): p. 21-5.
238. Fan, M.W., Z. Bian, and Y.G. Gao, *Immunohistochemistry and in situ hybridization investigation of transforming growth factor-beta: during odontoblast and ameloblast differentiation*. Chin J Dent Res, 1998. **1**(2): p. 17-21.
239. Khan, Q.E., et al., *Expression of Clu and Tgfb1 during murine tooth development: effects of in-vivo transfection with anti-miR-214*. Eur J Oral Sci, 2013. **121**(4): p. 303-12.
240. Haruyama, N., et al., *Overexpression of transforming growth factor-beta1 in teeth results in detachment of ameloblasts and enamel defects*. Eur J Oral Sci, 2006. **114 Suppl 1**: p. 30-4; discussion 39-41, 379.
241. Gao, Y., et al., *TGF-beta1 and TGFBR1 are expressed in ameloblasts and promote MMP20 expression*. Anat Rec (Hoboken), 2009. **292**(6): p. 885-90.

242. Tsuchiya, M., et al., *Transforming growth factor-beta1 expression is up-regulated in maturation-stage enamel organ and may induce ameloblast apoptosis*. Eur J Oral Sci, 2009. **117**(2): p. 105-12.
243. Suzuki, M., et al., *Fluoride affects enamel protein content via TGF-beta1-mediated KLK4 inhibition*. J Dent Res, 2014. **93**(10): p. 1022-7.
244. Cho, A., et al., *TGF-ss regulates enamel mineralization and maturation through KLK4 expression*. PLoS One, 2013. **8**(11): e82267.
245. Tjaderhane, L., et al., *Polarity of mature human odontoblasts*. J Dent Res, 2013. **92**(11): p. 1011-6.
246. Sehic, A., et al., *Gene expression and dental enamel structure in developing mouse incisor*. Eur J Oral Sci, 2010. **118**(2): p. 118-30.
247. Lacruz, R.S., et al., *Targeted overexpression of amelotin disrupts the microstructure of dental enamel*. PLoS One, 2012. **7**(4): e35200.
248. Bartlett, J.D. and J.P. Simmer, *Kallikrein-related peptidase-4 (KLK4): role in enamel formation and revelations from ablated mice*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 240.
249. Koli, K., M.J. Ryyanen, and J. Keski-Oja, *Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs)-1 and -3 coordinate proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Bone, 2008. **43**(4): p. 679-88.
250. Kanaan, R.A. and L.A. Kanaan, *Transforming growth factor beta1, bone connection*. Med Sci Monit, 2006. **12**(8): RA164-9.
251. Alliston, T., E. Piek, and R. Derynck, *22 TGF-beta Family Signaling in Skeletal Development, Maintenance and Disease*. In Derynck, R. and Miyazono, K. (eds). The TGF-beta Family. Cold Spring Harbor Monograph Archive, North America, 50, 2008.
252. Grigelioniene, G., et al., *Autosomal dominant brachyolmia in a large Swedish family: phenotypic spectrum and natural course*. Am J Med Genet A, 2014. **164A**(7): p. 1635-41.
253. Iida, A., et al., *Clinical and radiographic features of the autosomal recessive form of brachyolmia caused by PAPSS2 mutations*. Hum Mutat, 2013. **34**(10): p. 1381-6.
254. Adapala, R.K., et al., *TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals*. J Mol Cell Cardiol, 2013. **54**: p. 45-52.
255. Ramaswamy, G., et al., *Altered responsiveness to TGF-beta results in reduced Papss2 expression and alterations in the biomechanical properties of mouse articular cartilage*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(2): R49.
256. Colarossi, C., et al., *Lung alveolar septation defects in Ltbp-3-null mice*. Am J Pathol, 2005. **167**(2): p. 419-28.
257. Chen, Y., et al., *Growth retardation as well as spleen and thymus involution in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice*. J Cell Physiol, 2003. **196**(2): p. 319-25.
258. Dobolyi, A. and M. Palkovits, *Expression of latent transforming growth factor beta binding proteins in the rat brain*. J Comp Neurol, 2008. **507**(3): p. 1393-408.
259. Pugach, M.K. and C.W. Gibson, *Analysis of enamel development using murine model systems: approaches and limitations*. Front Physiol, 2014. **5**: 313.
260. Fleischmannova, J., et al., *Mouse models of tooth abnormalities*. Eur J Oral Sci, 2008. **116**(1): p. 1-10.
261. Geoffroy, V., et al., *VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants*. PeerJ, 2015. **3**: e796.
262. Redin, C., et al., *Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alstrom syndromes*. J Med Genet, 2012. **49**(8): p. 502-12.
263. Bloch-Zupan, A., et al., *Homozygosity mapping and candidate prioritization identify mutations, missed by whole-exome sequencing, in SMOC2, causing major dental developmental defects*. Am J Hum Genet, 2011. **89**(6): p. 773-81.
264. Laugel-Hausalter, V., et al., *From the transcription of genes involved in ectodermal dysplasias to the understanding of associated dental anomalies*. Mol Syndromol, 2012. **3**(4): p. 158-68.
265. Rabbani, B., et al., *Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders*. J Hum Genet, 2012. **57**(10): p. 621-32.

266. Gilissen, C., et al., *Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability*. Nature, 2014. **511**(7509): p. 344-7.
267. Mrozik, K.M., et al., *Effect of coating Straumann Bone Ceramic with Emdogain on mesenchymal stromal cell hard tissue formation*. Clin Oral Investig, 2012. **16**(3): p. 867-78.



Mathilde HUCKERT



Identification de nouveaux gènes impliqués dans les anomalies crânio-faciales et bucco-dentaires

Résumé

Les Amélogénèses imparfaites constituent un groupe d'altération de l'émail dentaire d'origine génétique. Cette pathologie peut exister de manière isolée ou associée à d'autres symptômes dans le cadre de syndromes. Certains gènes impliqués sont déjà connus, cependant de nouvelles mutations et de nouveaux gènes restent à identifier. L'étude de familles informatives dans le cadre de ce projet de recherche sur le massif crânio-facial et bucco-dentaire, associée à des stratégies d'identification génétique telles que la sélection de gènes candidats, les zones d'homozygotie, le séquençage haut débit, ont permis d'obtenir des résultats probants. Des investigations futures passant par l'augmentation des cohortes, le développement des outils de séquençage de nouvelle génération, l'étude des modèles cellulaires et animaux permettront d'améliorer la compréhension de l'amélogénèse.

Mots-clés : Amélogénèse imparfaite, mutation, PCR, séquençage, génétique, SNP, bio-informatique

Résumé en anglais

Amelogenesis imperfecta (AI) represents hereditary conditions affecting the quality and quantity of enamel. This disease can exist in isolation or in association with other symptoms in the form of syndromes. Several genes involved in AI are already known, however mutations in these genes are not sufficient to explain all cases of AI. This suggests that mutations in yet unidentified genes underlie AI. The study of informative families included in this research project on cranio-facial and oro-dental anomalies, by using genetic strategies such as candidate gene mutational analysis, homozygosity mapping and next generation sequencing, allowed the discovery of novel genes and mutations in AI. Future investigations based on the recruitment of new families, the development of new next generation sequencing tools and the establishment of cellular and animal models will improve our understanding of amelogenesis.

Key words: Amelogenesis Imperfecta, mutation, PCR, sequencing, genetics, SNP, bioinformatics