

Université de Montréal

**Effets d'agents biologiques, administrés localement, sur  
la formation des tissus calcifiés**

par

Rima Wazen

Département Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.)  
en Sciences Biomédicales

Octobre 2006

© Rima Wazen, 2006



W

4

055

2007

V.030

19 12

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Effets d'agents biologiques, administrés localement, sur  
la formation des tissus calcifiés**

présentée par :

Rima Wazen

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur :	Dr.Gilles Lavigne
Directeur de recherche :	Dr.Antonio Nanci
Membre du jury :	Dr.Guy Boileau
Examineur externe :	Dr.René St-Arnaud
Représentant du doyen de la FES:	Dr.Gilles Lavigne

## Résumé

L'organe dentaire est couramment utilisé pour étudier l'organogenèse et la formation des tissus calcifiés. La matrice extracellulaire de ces tissus contient une quantité minime de protéines non-collagéniques (PNCs), néanmoins, celles-ci jouent un rôle majeur dans la régulation des événements cellulaires et matriciels. Malgré des progrès considérables, les mécanismes précis de l'action des PNCs ne sont pas encore établis.

Afin de pouvoir manipuler expérimentalement les tissus calcifiés, nous avons tiré avantage du modèle de la 'fenêtre chirurgicale' dans l'os de la mandibule et du tibia chez le rat. Celui-ci permet d'administrer localement divers agents biologiques à l'aide d'une mini-pompe osmotique. Cette approche a été combinée de façon innovatrice au traçage moléculaire, à la mutagenèse dirigée et à la transgénèse pour des études fonctionnelles sur deux PNCs majeures de l'os : l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP), et une PNC amélaire : l'améloblastine (AMBN).

Nous avons étudié si l'OPN trouvée aussi dans la circulation et le liquide interstitiel participe à la formation de l'os. La protéine extraite de l'os du rat a été conjuguée au dinitrophénol (DNP) afin de la distinguer des protéines endogènes. Le complexe OPN-DNP a été infusé et son cheminement suivi dans le temps par immunolocalisation à l'or colloïdal. Les résultats ont démontré, pour la première fois dans un contexte physiologique, que

l'OPN circulante s'incorpore dans la matrice osseuse. Cette forme d'OPN, que l'on croyait jusqu'à présent non fonctionnelle en minéralisation, aurait un champ d'action plus vaste que prévu. Les PNCs circulantes pourraient donc avoir un impact inattendu sur les événements initiaux de la formation osseuse pour lesquels peu de molécules sont requises.

L'implication des motifs d'acides glutamiques de la BSP dans l'adhésion au minéral a ensuite été évaluée. La protéine recombinante native et la forme mutante dont les séquences ont été remplacées par des alanines, ont été conjuguées au DNP et infusées. La distribution et la quantification de ces protéines sur les surfaces osseuses ont été déterminées par immunocytochimie. La substitution de ces groupements produit une différence significative dans la capacité de liaison de la BSP à la matrice osseuse minéralisée. Ces résultats ont validé chez l'animal une fonction fondée sur des analyses *in vitro* et des prédictions *in silico*, et suggèrent que ces motifs interviennent dans l'activité de la BSP dans l'environnement osseux.

Finalement, nous avons effectué du transfert de gène à l'aide de lentivirus codant pour la protéine fluorescente verte et l'AMBN. L'expression des protéines a été révélée par immunohistochimie. Cette transgénèse locale nous a permis, pour la première fois, de cibler directement les cellules qui constituent le tissu osseux, et d'y exprimer de façon stable une protéine pertinente à la minéralisation provenant d'un autre tissu. Cette preuve de principe représente une étape essentielle pour l'application de la transgénèse locale dans des modèles de formation, réparation et pathologie osseuse.

En conclusion, notre approche expérimentale apporte de nouvelles perspectives sur la fonction de l'OPN et de la BSP, et notamment surmonte les difficultés normalement rencontrées lors du transfert de gènes dans les tissus calcifiés.

**Mots-clés :** Tissus calcifiés, Matrice extracellulaire, Protéines non-collagéniques, Modèle animal.

## Abstract

The tooth organ and surrounding periodontal tissues are extensively used in developmental biology to study organogenesis and investigate the events that regulate the formation of calcified tissues. Non-collagenous matrix proteins (NCPs) are minor components of these tissues but they regulate important cellular and matrix events. Despite major progress in our knowledge on calcified tissues, the molecular mechanisms regulating their formation are still not completely understood.

We have taken advantage of the characteristics of the 'bony window' model to manipulate the events involved in the formation of calcified tissues. This approach consists of an osmotic minipump hooked to a 'window' created in the bone of the hemimandible and in the tibia of rats which allows the local delivery of biological agents. This system has been applied with tracer studies, site-directed mutagenesis and transgenesis to generate pertinent fundamental information on the function of two multifunctional NCPs found in bone: osteopontin (OPN) and bone sialoprotein (BSP), and an enamel NCP: ameloblastin (AMBN).

First, tracer studies were done with OPN, an NCP also found in tissue fluids, to determine whether this circulating form of OPN may also participate in active bone formation. Intact molecules, extracted from rat bone, were tagged with dinitrophenol (DNP) to distinguish



them from endogenous molecules. DNP-tagged molecules were infused and their sites of action/accumulation were immunolocalized using colloidal gold labeling. Our results show, for the first time in the complex *in vivo* environment, that circulating form of OPN can integrate into forming bone and suggest that such molecule could play a more active role than previously suspected during bone formation. Circulating NPCs may intervene in initial events of mineralization where only few molecules are necessary.

Then, we have evaluated the contribution of proposed functional glutamic acid domains on the mineral binding capacity of BSP. Both a native BSP and a mutated form of BSP on which glutamic acid-rich sequences were replaced with alanine groups were tagged with DNP. Following their infusion, the distribution of BSP-DNP was revealed using quantitative immunogold labeling. We have observed a significant reduction in the binding capacity to mineralized surfaces of the mutated protein. These experiments, under physiological conditions, are in agreement with the reported *in vitro* assays and *in silico* predictions on the participation of these groups in the mineral binding activity of BSP.

Finally, we have used gene transfer studies using a lentiviral vector encoding for the green fluorescent protein and AMBN to create local transgenic conditions. Following the infusion, protein expression was visualized using immunohistochemistry. Results from our study demonstrate that this approach can be used to efficiently transduce and stably express matrix proteins, and to directly target osteogenic cells. This proof of principle is a

mandatory step in the development of novel gene transfer strategies for hard tissue repair and treatment of pathological bone loss.

In conclusion, our experimental approach generated new information on the function of OPN and BSP, and importantly established the feasibility of using gene transfer in calcified tissues.

**Keywords :** Calcified tissues, Extracellular matrix, Non-collagenous proteins, Animal model.

# Table des matières

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XXII</b>
<b>CHAPITRE 1 - INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
LES TISSUS CALCIFIÉS DENTAIREs .....	1
<i>Amélogénèse</i> .....	3
<i>La matrice extracellulaire des tissus calcifiés dentaires</i> .....	3
Les protéines amélaireS .....	4
Les protéines de la matrice osseuse .....	7
<i>L'évolution des protéines non-collagéniques</i> .....	9
LES APPROCHES EXPÉRIMENTALES POUR ÉTUDIER LES TISSUS DENTAIREs .....	10
LA THÉRAPIE GÉNIQUE : LE NOUVEL AVENIR DE LA MÉDECINE.....	13
<i>Le transfert de gènes – du concept à la pratique</i> .....	14
Les méthodes non virales .....	14
Les méthodes virales .....	14
Les voies pour le transfert de gènes .....	17
<b>OBJECTIFS DE RECHERCHE</b> .....	<b>19</b>

<b>CHAPITRE 2 – ARTICLE I</b> .....	<b>21</b>
A TRACER STUDY WITH SYSTEMICALLY AND LOCALLY ADMINISTERED DINITROPHENYLATED OSTEOPONTIN .....	21
SOMMAIRE .....	22
ABSTRACT.....	24
INTRODUCTION.....	25
MATERIALS AND METHODS .....	28
<i>Dinitrophenylation</i> .....	28
<i>Surgical Procedures</i> .....	28
<i>Tissue Processing</i> .....	30
<i>Immunocytochemistry</i> .....	31
RESULTS .....	33
DISCUSSION .....	37
ACKNOWLEDGMENTS.....	39
LITERATURE CITED.....	40
FIGURE LEGENDS .....	44
 <b>CHAPITRE 3 – ARTICLE II</b> .....	 <b>54</b>
IN VIVO FUNCTIONAL ANALYSIS OF POLYGLUTAMIC ACID DOMAINS IN RECOMBINANT BONE SIALOPROTEIN.....	54
SOMMAIRE .....	55
ABSTRACT.....	57
INTRODUCTION.....	59
MATERIALS AND METHODS .....	61
<i>Site-directed Mutagenesis</i> .....	61
<i>Dinitrophenylation</i> .....	61
<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blotting</i> .....	62
<i>Surgical Procedure</i> .....	63
<i>Tissue Processing</i> .....	63
<i>Immunocytochemistry</i> .....	64

<i>Quantification of Immunolabeling</i> .....	65
<i>Molecular Modeling</i> .....	65
RESULTS .....	67
DISCUSSION .....	70
ACKNOWLEDGMENTS.....	76
LITERATURE CITED.....	77
FIGURE LEGENDS .....	83
<b>CHAPITRE 4 – ARTICLE III</b> .....	<b>90</b>
LOCAL GENE TRANSFER TO CALCIFIED TISSUE CELLS USING PROLONGED INFUSION OF A LENTIVIRAL VECTOR .....	90
SOMMAIRE .....	91
ABSTRACT.....	94
INTRODUCTION.....	95
RESULTS .....	98
DISCUSSION .....	101
MATERIALS AND METHODS .....	105
<i>Lentiviral Vector Production and Titer Determination</i> .....	105
<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blotting</i> .....	105
<i>Cell Culture Studies with MC3T3 Cells</i> .....	106
<i>Cell Isolation of Primary Calvaria-Derived Osteogenic Cells</i> .....	106
<i>Transduction of MC3T3 and Primary Calvaria-Derived Cells with Lentivirus</i> .....	107
<i>Detection of Transgene Expression in Cells by Immunofluorescence</i> .....	107
<i>Surgical Procedure</i> .....	108
<i>Tissue Processing and Detection of Transgene Expression</i> .....	109
ACKNOWLEDGMENTS.....	111
REFERENCES .....	112
TITLES AND LEGENDS TO FIGURES .....	120

<b>CHAPITRE 5 - DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>132</b>
<i>La dynamique des protéines non-collagéniques circulantes : leurs localisations.....</i>	<i>132</i>
<i>La dynamique des protéines non-collagéniques circulantes : leurs fonctions .....</i>	<i>135</i>
<i>L'application du modèle de la fenêtre chirurgicale au transfert de gène .....</i>	<i>139</i>
<i>Les protéines amélaire – une nouvelle catégorie d'agents thérapeutiques de l'os ?</i>	<i>141</i>
<i>L'utilisation de la transgénèse dans les tissus calcifiés.....</i>	<i>143</i>
Le rétablissement d'un phénotype par une approche de transfert de gène .....	144
Le promoteur - un choix judicieux pour contrôler l'expression du transgène .....	145
Application de lentivirus pour créer des animaux transgéniques.....	147
Le ciblage des cellules souches et applications de la transgénèse locale à des fins thérapeutiques .....	149
 <b>CONCLUSION.....</b>	 <b>152</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	 <b>154</b>

## Liste des figures

<b>FIGURE 1 : SCHÉMA REPRÉSENTATIF ILLUSTRANT LES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS D'UNE HÉMI-MANDIBULE DE RAT.....</b>	<b>2</b>
<b>FIGURE 2 : LA FENÊTRE CHIRURGICALE CHEZ LE RAT. ....</b>	<b>12</b>
 <i>Figures de l'article I</i>	
<b>FIGURE 1.....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURE 2.....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURE 3.....</b>	<b>50</b>
<b>FIGURE 4.....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURE 5.....</b>	<b>52</b>
<b>FIGURE 6.....</b>	<b>53</b>
 <i>Figures de l'article II</i>	
<b>FIGURE 1.....</b>	<b>85</b>
<b>FIGURE 2.....</b>	<b>86</b>
<b>FIGURE 3.....</b>	<b>87</b>
<b>FIGURE 4.....</b>	<b>88</b>
<b>FIGURE 5.....</b>	<b>89</b>
 <i>Figures de l'article III</i>	
<b>FIGURE 1.....</b>	<b>123</b>
<b>FIGURE 2.....</b>	<b>124</b>
<b>FIGURE 3.....</b>	<b>125</b>
<b>FIGURE 4.....</b>	<b>126</b>
<b>FIGURE 5.....</b>	<b>127</b>
<b>FIGURE 6.....</b>	<b>128</b>
<b>FIGURE 7.....</b>	<b>129</b>
 <b>FIGURE 3 : LA FENÊTRE CHIRURGICALE ADAPTÉE À LA SOURIS. ....</b>	 <b>145</b>

## Liste des sigles et des abréviations

%	Pourcentage
A	Alanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALB	Albumine
	Anticorps de lapin anti-albumine de rat
ALB-DNP	Albumine conjuguée au dinitrophénol
Alpha-MEM	Milieu de culture de base de type alpha ( <i>alpha-Minimal Essential Medium</i> )
AMBN	Améloblastine ( <i>Ameloblastin, Amelin</i> ou <i>Sheathlin</i> )
	Anticorps de lapin anti-améloblastine de souris
AMBN KO	Souris déficiente pour le gène de l'améloblastine
AMBN-LV	Lentivirus codant pour le gène de l'améloblastine
AMEL	Amélogénine
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsi	Petit acide ribonucléique interférent ( <i>small interfering RNA</i> )
BAG-75	<i>Bone Acidic Glycoprotein-75</i>
BLC	Ostéoblaste quiescent ( <i>Bone Lining Cell</i> )



BMP	Protéine de la morphogénèse osseuse ( <i>Bone Morphogenetic Protein</i> )
BSP	Sialoprotéine osseuse ( <i>Bone Sialoprotein</i> ) Anticorps de lapin anti-sialoprotéine osseuse humaine (LF100)
BSP KO	Souris déficiente pour le gène de la sialoprotéine osseuse
BV	Vaisseau sanguin ( <i>Blood Vessel</i> )
°C	Degré Celsius
CKII	Caséine kinase II
CL	Ligne cémentente ( <i>Cement Line</i> )
cm	Centimètre
cm <sup>2</sup>	Centimètre carré
Coll	Collagène
cPPT	<i>Central PolyPurine Tract</i>
DGEA	Séquence d'acides aminés Aspartate-Glycine-Glutamate-Alanine
DMEM	Milieu de culture Eagle de type Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DMP-1	Phosphoprotéine de la matrice dentinaire 1 ( <i>Dentin matrix phosphoprotein 1</i> )
DNP	Dinitrophénol Anticorps de lapin anti-dinitrophényle
DS	Fenêtre chirurgicale ( <i>Drilling Site</i> )
DPP	Phosphoprotéine de la dentine ( <i>Dentin Phosphoprotein</i> )
DSP	Sialoprotéine de la dentine ( <i>Dentin Sialoprotein</i> )
DSPP	Sialophosphoprotéine de la dentine ( <i>Dentin Sialophosphoprotein</i> )

E	Acide glutamique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique ( <i>Disodium Ethylenediamine Tetra-Acetic acid</i> )
EF1-alpha	Promoteur ubiquitaire du facteur d'élongation et de traduction 1-alpha
ENAM	Énaméline
FBS	Sérum de veau foetal ( <i>Fœtal Bovin Serum</i> )
g	Gramme
G	Glycine
G	Appareil de Golgi
Xg	Force gravitationnelle
GAG	Protéine de la nucléocapside ( <i>Viral Helper Gene</i> )
GFP	Protéine fluorescente verte ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GFP-LV	Lentivirus codant pour le gène de la protéine fluorescente verte
H	Heure ( <i>hour</i> )
HA	Hydroxyapatite
HEK293	Cellules embryonnaires de rein humain 293 ( <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i> )
HRP	Peroxydase de raifort ( <i>Horseradish Peroxydase</i> )
HPV	Papillomavirus humain ( <i>Human Papillomavirus</i> )
iNOS	<i>Inductible Nitric Oxide Synthase</i>
IU	Unité infectieuse ( <i>Infectious Unit</i> )
IU/mL	Unité infectieuse par millilitre ( <i>Infectious Unit per Milliliter</i> )
i.v.	Intraveineuse

kb	Kilobase d'ADN ou d'ARN
kDa	Kilodalton
KO	Animal dont un gène est inactivé ou déficient ( <i>Knock-out</i> )
kV	Kilovolt
LL	<i>Lamina Limitans</i>
LTR	Longue répétition terminale ( <i>Long-term repeats</i> )
LV	Lentivirus
M	Concentration molaire
M	Stade de maturation de l'incisive
MC3T3	Lignée de cellules osseuses de souris
MEM Earle's	Milieu de culture de base avec sels de Earle ( <i>Minimum Essential Medium with Earle's salts</i> )
MEPE	Phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire ( <i>Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein</i> )
mg	Milligramme
MGC	Cellule géante multinuclée ( <i>Multinucleated Giant Cell</i> )
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
mm <sup>2</sup>	Millimètre carré
MW	Poids moléculaire ( <i>Molecular Weight</i> )
NaCl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre

NO	Oxyde nitrique ( <i>Nitric Oxyde</i> )
Ob	Ostéoblaste
Oc	Ostéocyte
OC	Ostéocalcine
Ocl	Ostéoclaste
ON ou SPARC	Ostéonectine
OPN	Ostéopontine ( <i>SPP-1, Osteopontin or Secreted Phosphoprotein-1</i> ) Anticorps de lapin anti-ostéopontine humaine LF-123
OPN-DNP	Ostéopontine conjuguée au dinitrophénol
OPN KO	Souris déficiente pour le gène de l'ostéopontine
p	Degré de signification
PBS	Tampon de sel de phosphate ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
pH	Potentiel des ions d'hydrogène ( <i>Potential of Hydrogen Ion</i> )
PHEX	<i>Phosphate Regulating gene with Homologies to Endopeptidase and the X Chromosome</i>
pI	Point isoélectrique
PNC	Protéine non-collagénique ( <i>NCP, Non-collagenous Protein</i> )
Poly [A]	Séquence d'acides aminés riches en alanines
Poly [E]	Séquence d'acides aminés riches en acides glutamiques
prBSP <sub>E</sub>	Protéine recombinante de Sialoprotéine osseuse synthétisée dans une cellule procaryotique contenant les séquences d'acides glutamiques
prBSP <sub>E</sub> -DNP	prBSP <sub>E</sub> conjuguée au dinitrophénol

prBSP <sub>A</sub>	Protéine recombinante de Sialoprotéine osseuse synthétisée dans une cellule procaryotique dont les séquences d'acides glutamiques ont été mutées pour des séquences d'alanines
prBSP <sub>A</sub> -DNP	prBSP <sub>A</sub> conjuguée au dinitrophénol
PS	Stade de présécrétion de l'incisive
PSI	Séquence d'encapsidation ( <i>Packaging Signal</i> )
RBC	Globule rouge ( <i>Red Blood Cell</i> )
RGD	Séquence d'acides aminés Arginine-Glycine-Aspartate
rpm	Rotation par minute ( <i>Rotation per Minute</i> )
Rev	Élément de régulation ( <i>Regulation Element</i> )
RRE	Élément de réponse à l'élément Rev ( <i>Rev-Responsive Element</i> )
Runx2	<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i> (aussi connu comme Cbfa1)
S	Stade de sécrétion de l'incisive
sec	Seconde
SCPP	<i>Secretory Calcium-Binding Phosphoprotein</i>
SDS	Sulfate de dodécyle et de sodium
SDS-PAGE	SDS - Gel d'électrophorèse de polyacrylamide ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SIBLING	<i>Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein</i>
Tween-20	Monolauréate de polyoxyéthylène sorbitane-20
µg	Microgramme
µg/h	Microgramme par heure
µg/mL	Microgramme par millilitre

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Microgramme par microlitre
$\mu\text{L}$	Microlitre
$\mu\text{L}/\text{h}$	Microlitre par heure
$\mu\text{m}$	Micromètre
$\mu\text{m}^2$	Micromètre carré
$\mu\text{m}/\text{day}$	Micromètre par jour ( <i>Micrometer per day</i> )
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine type I ( <i>HIV, Human Immunodeficiency Virus</i> )
VIS	Virus de l'immunodéficience du singe
VIF	Virus de l'immunodéficience félin
VSVG	Virus de la stomatite vésiculaire ( <i>Vesicular Stomatitis Virus G Glycoprotein</i> )
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element</i>

*À mes parents, Raymond et Mony*

## Remerciements

Tout au long de ces cinq dernières années, j'ai été entourée de personnes extraordinaires qui m'ont permis de réaliser mon doctorat dans une ambiance de travail très agréable.

J'aimerais particulièrement remercier mon directeur de recherche, Docteur Antonio Nanci, qui m'a accepté au sein de son équipe et qui a dirigé ma formation. L'enthousiasme pour la science, l'intuition scientifique, la ténacité et la patience dont il fait preuve, m'a permis de réaliser ces projets de recherche et ont grandement contribué à la richesse de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aux membres du Jury pour avoir accepté de participer à la soutenance de cette thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux que j'ai eu la chance de croiser au laboratoire et qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Merci à Docteur Charles E. Smith pour son aide et ses commentaires attentionnés lors de la rédaction des manuscrits.

Je désire exprimer ma profonde gratitude à madame Sylvia Francis Zalzal et madame Micheline Fortin pour leurs diverses connaissances et expériences dans le domaine, leur enthousiasme ainsi que leurs nombreux encouragements.



Enfin, je tiens à remercier chaleureusement mes parents Raymond et Mony, ma famille, et Paul qui m'ont été encouragés à poursuivre mes études. Leur soutien a été un atout important dans la réussite de mes objectifs.

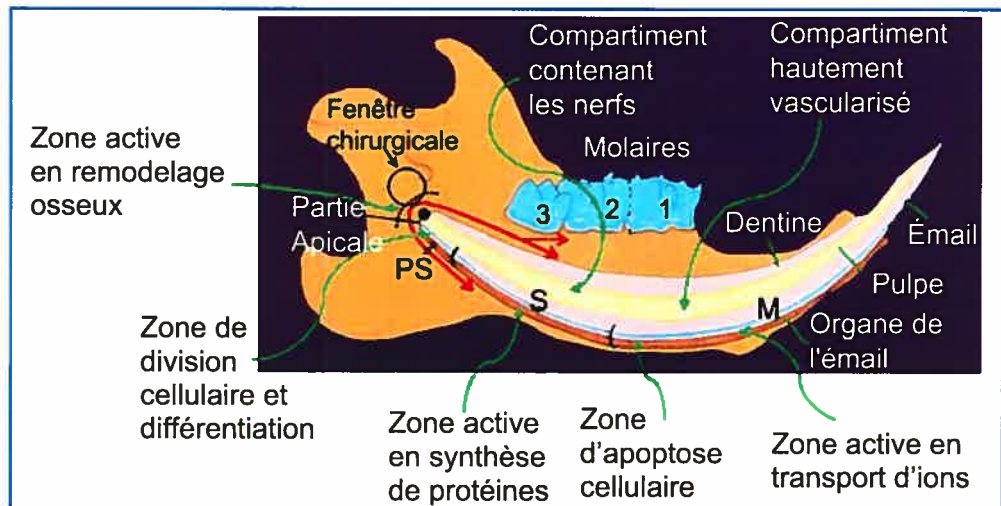
## **Chapitre 1 - Introduction**

La biologie du développement a comme objectif général d'étudier, d'interpréter et d'intégrer les divers mécanismes cellulaires et moléculaires dans un cadre tissulaire et organique. Chaque tissu possède un phénotype spécifique mais des homologies morphogénétiques existent entre eux. Au cours des années, les informations concernant l'organogenèse, la morphogenèse et l'histodifférentiation ont permis de cerner les changements moléculaires et les patrons d'expression génétique accompagnant ces mécanismes cellulaires.

### **Les tissus calcifiés dentaires**

La dent représente un modèle original et captivant pour la biologie du développement. Son apport à l'acquisition de connaissances sur les mécanismes cellulaires ne cesse de grandir. Les recherches à ce niveau ont démontré l'importance des interactions épithélio-mésenchymateuses, séquentielles et réciproques, pour l'initiation de la formation de la dent, pour l'acquisition d'une forme spécifique ainsi que pour la différenciation des améloblastes et des odontoblastes (revues de Thesleff *et al.* 1981; 1996; Ruch 1987; 1995; Slavkin 1990; Jernvall *et al.* 2000). Toutefois, les processus précis impliqués dans la régulation de ces évènements sont encore méconnus.

La dentition des rongeurs est particulièrement intéressante pour examiner ces phénomènes. Celle-ci est composée de deux paires d'incisives et de six paires de molaires situées à la partie postérolatérale. L'incisive, dont l'aspect cylindrique lui confère une apparence unique, a une croissance continue. Dans sa partie apicale, il existe des zones de prolifération, de croissance cellulaire et de potentiel d'éruption conservées durant toute la vie de l'animal (Smith 1975) (Figure 1, page 2). Ainsi, dans une hémimandibule de rat, on peut trouver toutes les composantes nécessaires à la croissance et à la maturation d'une dent et les données recueillies peuvent être extrapolées à l'humain. De plus, contrairement aux autres organes d'origine épithélio-mésenchymateuse, la mandibule du rat est caractérisée par la présence de tissus calcifiés collagéniques (cément, dentine et os alvéolaire) et non-collagéniques (émail, cément acellulaire afibrillaire) (Bosshardt *et al.* 1998). Ceci en fait donc un modèle remarquable pour caractériser et comparer les événements cellulaires et extracellulaires menant à la formation de ces tissus.



**Figure 1 :** Schéma représentatif illustrant les différents compartiments d'une hémimandibule de rat. La position de la fenêtre chirurgicale, près de la partie apicale de l'incisive, permet d'accéder aux différents tissus et régions de l'organe dentaire. PS, stade de présécrétion; S, stade de sécrétion; M, stade de maturation (schéma adapté de Lavoie 2001).

## **Amélogénèse**

Pour former une couche d'émail, les améloblastes doivent traverser trois phases: la présécrétion, la sécrétion et la maturation (revue de Nanci 2003). Durant le stade de présécrétion, les améloblastes se préparent à synthétiser la matrice organique. Ils s'allongent, développent leurs organites de sécrétion protéique (le réticulum endoplasmique rugueux et le golgi), polarisent leur noyau et élaborent des précurseurs de protéines amélaire. L'étape de sécrétion correspond au déversement continu des protéines matricielles et à la minéralisation partielle de l'émail. Enfin, au cours de la maturation, les améloblastes varient leur morphologie à la surface apicale de façon cyclique, passant d'une surface lisse à plissée (prolongement de Tomes). Grâce à cette «modulation», la phase organique est éliminée, alors que les sels et minéraux (phosphate de calcium et carbonate de calcium) sont déposés dans la matrice pour permettre la minéralisation finale de l'émail (revues de Warshawsky 1985; Simmer *et al.* 1995).

## **La matrice extracellulaire des tissus calcifiés dentaires**

On pourrait croire, à première vue, que l'os et l'émail sont deux matrices différentes. La matrice osseuse est principalement constituée de protéines non-collagéniques (PNCs) et de collagène de type I qui offre un support structural aux tissus et aux cristaux. Ces PNCs sont produites par des cellules de type mésenchymateux : les ostéoblastes. Dans l'émail, les cellules sont plutôt de type épithélial. La phase organique de l'émail, dépourvue de collagène, est graduellement enlevée lors de l'étape de maturation. La matrice extracellulaire de l'os est déposée avant d'être minéralisée, celle de l'émail se minéralise

immédiatement après sa sécrétion. Seul l'os peut subir un remodelage et une résorption de sa matrice. Les propriétés des cristaux de l'os et de la dent sont différentes, entre autres au niveau de leur taille, leur composition et leur stoechiométrie.

Cependant, les tissus calcifiés partagent quelques similarités fondamentales au niveau de leur structure et de leur formation. La matrice extracellulaire contient des protéines qui organisent les ions de calcium et de phosphate en une matrice minéralisée et structurée. La matrice organique contient, à l'exception de l'émail dentaire et du ciment acellulaire afibrillaire, du collagène de type I. Toutefois, malgré la prédominance du collagène de type I dans la matrice extracellulaire, les PNCs régulent la nucléation, la croissance et la forme des cristaux. Ces protéines multifonctionnelles sont importantes puisqu'elles contrôlent à la fois les événements cellulaires et matriciels. Les caractéristiques et les fonctions des principales protéines amélaire et ceux de la matrice osseuse seront discutées.

### **Les protéines amélaire**

L'émail, d'origine épithéliale, possède une matrice organique composée exclusivement de deux familles de PNCs: les amélogénines (90%) et les non-amélogénines (1-3%) (revue de Fincham *et al.* 1999; revue de Nanci *et al.* 1996; Nanci *et al.* 1998; revue de Smith *et al.* 1996; revue de Smith 1998). Les amélogénines (AMEL) (5-30 kDa) s'accumulent dans l'émail durant le stade de sécrétion et en moindre quantité près du site de croissance des cristaux (Nanci *et al.* 1998). Elles subissent une dégradation continue, en fragment de faible poids moléculaire durant la phase de maturation, pour laisser place à la phase minérale

correspondant à 95% du poids de l'émail (Nanci *et al.* 1996; 1998). Les gènes d'AMEL humains et bovins sont localisés sur les chromosomes sexuels X et Y, tandis que chez la souris et le rat, ils se retrouvent uniquement sur le chromosome X (revue de Fincham *et al.* 1999). Les divers isoformes d'AMEL que l'on trouve dans l'émail résultent de l'épissage alternatif de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) (revues de Simmer 1995; Veis 2003). L'AMEL a des propriétés bipolaires lui permettant de s'auto-assembler en nanosphères ayant un diamètre de 12-20 nm (Fincham *et al.* 1994; 1995; Moradian-Oldak *et al.* 1994; Paine *et al.* 1997; revue de Paine *et al.* 2005). L'élimination de cette protéine est essentielle pour la croissance des cristaux. Elle régulerait leur grosseur, leur taille et leur orientation (Deutsch *et al.* 1995; Beniash *et al.* 2005). La prédominance de l'AMEL dans l'émail, l'apparition d'un phénotype semblable à celui de l'amélogénèse imparfaite chez les animaux déficients (*knock-out, KO*) en AMEL et sa conservation au cours de l'évolution lui confèrent une importance pour la minéralisation de l'émail (revue de Fincham *et al.* 1999; Gibson *et al.* 2001; revue de Paine *et al.* 2005).

L'améloblastine (AMBN), l'énaméline (ENAM), la tufteline et une protéine sulfatée composent la famille des non-amélogénines. Ces molécules sont généralement hydrophiles, phosphorylées, glycosylées et/ou sulfatées. Dans cette famille de protéines, l'AMBN (60-70 kDa) est aussi connue sous le nom d'Améline ou de *Sheathline* (Krebsbach *et al.* 1996; Brookes *et al.* 2001). Le gène d'AMBN est localisé sur le chromosome 4 chez l'humain et sur le chromosome 5 chez la souris. Quatre isoformes résultant de l'épissage alternatif de l'ARNm ont été trouvés (Lee *et al.* 2003). L'AMBN est normalement produite par les améloblastes et de façon transitoire par les cellules de la gaine d'Hertwig et les

préodontoblastes (Fong *et al.* 1996; Bosshardt *et al.* 1998; Simmons *et al.* 1998). À l'inverse de l'AMEL, la protéine intacte d'AMBN (60-70 kDa) s'accumule à la surface de l'émail en formation, au site de croissance des cristaux et ce durant les stades de sécrétion et de maturation (Nanci *et al.* 1998; Uchida *et al.* 1998). L'AMBN est rapidement dégradée durant le stade de maturation en fragments de 13-17 kDa et ceux-ci se retrouvent dans la région plus profonde de l'émail (Nanci *et al.* 1998; revue de Fincham *et al.* 1999; revue de Brookes *et al.* 2001). Hu *et al.* (1997) et Nanci *et al.* (1998) ont proposé que cette protéine agirait sur la promotion de la formation des cristaux, sur leur élongation, sur leur support et les protégerait contre l'adsorption par les différents inhibiteurs. Puisqu'elle est exprimée de façon transitoire par les préodontoblastes, elle pourrait servir de molécule de signalisation lors des interactions épithélio-mésenchymateuses (Nanci *et al.* 1998). Récemment, Fukumoto *et al.* (2004) ont suggéré que l'AMBN pourrait jouer un rôle dans l'adhésion et la différenciation des améloblastes. Une séquence consensus Aspartate-Glycine-Glutamate-Alanine (DGEA) permettant l'interaction avec les intégrines a été rapportée chez le rat et la souris, et pourrait interagir à la surface des améloblastes avec les ions phosphates (Cerny *et al.* 1996; Lee *et al.* 2003). Cependant, puisque cette séquence n'est pas conservée entre les espèces, cette fonction ne peut être essentielle à la croissance des cristaux. L'AMBN possède un site potentiel de phosphorylation pour la caséine kinase II (CKII) similaire à celui de la sialoprotéine osseuse (BSP) et de l'ostéopontine (OPN) (Krebsbach *et al.* 1996). De plus, les études ont démontré que le facteur de transcription Runx2 interagit avec le promoteur de l'AMBN, la BSP et l'OPN (Ducy *et al.* 1997; Dhamija *et al.* 2001). L'importance de l'AMBN durant la formation de l'émail est aussi démontrée par le fait que les animaux transgéniques surexprimant l'AMBN ont un phénotype semblable à celui de

l'amélogénèse imparfaite (Paine *et al.* 2003) et que les animaux AMBN KO présentent plusieurs anomalies durant la formation de la dent (Fukumoto *et al.* 2004).

### **Les protéines de la matrice osseuse**

Les différentes PNCs retrouvées dans la matrice osseuse sont l'OPN, la BSP, l'ostéonectine (ON ou SPARC), la fibronectine et la tenascine. En général, ces glycoprotéines sont riches en acides sialiques. La BSP et l'OPN figurent parmi les deux principales protéines associées à la formation de l'os et du ciment (revues de Denhardt *et al.* 1998; Sodek *et al.* 2000). Elles sont sécrétées de façon précoce par les cellules ostéoblastiques lors de la minéralisation. L'OPN, une protéine phosphorylée, aussi connue sous le nom de *Secreted Phosphoprotein-1* (SPP-1), est présente dans divers tissus calcifiés (dentine, ciment et os), non minéralisés (parodonte, système vasculaire et immunitaire, rein et cancer) et les fluides biologiques (sang, lait et urine). Cette protéine existe sous différentes formes selon le niveau de phosphorylation. Dans la matrice osseuse, l'OPN est hautement phosphorylée et, comme l'AMEL, régulerait de façon négative la formation et la croissance des cristaux (Hunter *et al.* 1996; Wada *et al.* 1999; Gericke *et al.* 2005). Par immunocytochimie, l'OPN a été localisée aux interfaces matricielles, sur les lignes cémententes et dans la *lamina limitans* à la surface de l'os (McKee *et al.* 1996c; 1996a; 1996b; revue de Nanci 1999). Ikeda *et al.* (1992) l'ont également localisée par hybridation *in situ* aux sites destinés à la résorption osseuse. Son importance dans le processus de minéralisation repose sur sa distribution tissulaire, son affinité pour les ions de calcium et sa présence aux sites de minéralisation.



L'OPN, la BSP, la SPARC, la thrombospondin-1, -2 et la tenascine-C, -X font partie de la famille des protéines matricellulaires (revues de Bornstein 1995; 2002; Sodek *et al.* 2002; Alford *et al.* 2006). Ces protéines matricielles sont exprimées dans les tissus calcifiés et y jouent un rôle de 'modulateur biologique' plutôt qu'une fonction de régulation de la structure des tissus. Elles contrôlent la fonction d'une cellule grâce à des interactions cellule-matrice, via une liaison directe avec des composants de la matrice extracellulaire, divers récepteurs, des facteurs de croissance ou des cytokines. De plus, les animaux KO de cette famille de protéines ne génèrent pas des phénotypes évidents.

L'OPN possède une séquence Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) permettant l'adhésion aux intégrines, ce qui permet d'enclencher différentes voies de signalisation cellulaire (*e.g.* phosphatidyl-inositol 3-kinase, Ras/MAPK, Ras/Rho, facteur nucléaire kappa B) (revues de Sodek *et al.* 2000; Denhardt *et al.* 2001a; Rangaswami *et al.* 2006). Ces dernières influencent l'organisation du cytosquelette, la migration et la prolifération cellulaire, le processus d'apoptose et la phagocytose ainsi que la séquestration des ions de calcium. Des études immunocytochimiques ont démontré l'existence d'une forme intracellulaire d'OPN (aussi appelé OPN intracellulaire perimembranaire) (Zohar *et al.* 1997; 1998). Celle-ci est exprimée au niveau de la membrane cellulaire et est colocalisée avec le récepteur CD44 (Zohar *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2002). Ce complexe protéique s'associerait à trois molécules d'actines (ezrine, radixine, moesine) et serait donc impliqué dans la migration cellulaire des fibroblastes embryonnaires, des macrophages et des cellules cancéreuses (Zohar *et al.* 2004).

L'OPN est reconnue comme une molécule pro-inflammatoire surtout sécrétée par les macrophages et son expression a été rapportée à la phase précoce de l'activation des cellules lymphocytaires T (revues de Denhardt *et al.* 2001a; 2001b; Sodek *et al.* 2006). Elle activerait également la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (*e.g.* interféron  $\gamma$  ou interleukine-12) (Ashkar *et al.* 2000). Son activité dépendrait de son état de phosphorylation et de sa liaison au récepteur  $\alpha_v\beta_3$ , via le motif RGD. Cette dernière étude a aussi démontré qu'elle inhiberait la sécrétion des cytokines régulatrices (*e.g.* interleukine-10) par une liaison de la forme déphosphorylée de l'OPN au récepteur CD44. Dans un modèle d'arthrite rhumatoïde, les souris OPN KO présentent une réduction de la destruction articulaire, de l'angiogenèse et de l'apoptose des chondrocytes (Yumoto *et al.* 2002). Cependant, un effet anti-inflammatoire de l'OPN a aussi été rapporté (Rollo *et al.* 1996). Elle inhiberait la synthèse d'iNOS (*Inductible Nitric Oxide Synthase*) pour ainsi réduire la quantité d'oxyde nitrique (NO) produite par les macrophages et les cellules épithéliales des tubules rénaux (revue de Denhardt *et al.* 2001b).

Dans des conditions physiologiques, l'OPN est présente dans les fluides biologiques, dont la concentration en sel de calcium est élevée, afin d'en prévenir la minéralisation. Elle est aussi retrouvée dans les cas de calcification ectopique comme le tartre (Kido *et al.* 1995), la lithiase rénale (Kohri *et al.* 1993; McKee *et al.* 1995), l'athérosclérose (Giachelli *et al.* 1993; Hirota *et al.* 1993; Ikeda *et al.* 1993) et le rétrécissement aortique (O'Brien *et al.* 1995). Dans les reins, cette protéine est surtout exprimée dans l'anse de Henlé, près d'une région propice à la précipitation des sels de calcium (McKee *et al.* 1995). Dans une situation d'hyperoxalurie, les souris OPN KO ont formé plus de cristaux d'oxalate de

calcium dans les tubules rénaux (Wesson *et al.* 2003). Ces études suggèrent que l'OPN influence la nucléation, la croissance et l'agrégation des cristaux. De plus, la présence d'OPN à ces sites de calcification a été attribuée à une production cellulaire locale (*e.g.* cellules musculaires lisses et cellules endothéliales) et à une synthèse par les macrophages (revue de Giachelli *et al.* 2000).

Les souris OPN KO ne présentent pas de phénotype osseux majeur. Leur développement et leur comportement ne se distinguent pas de celui des animaux normaux (Liaw *et al.* 1998; Rittling *et al.* 1998). Cependant, il a été montré que les os de ces animaux sont plus résistants et ont un taux de minéralisation plus élevé (Boskey *et al.* 2002). Dans un modèle d'ostéoporose, les souris OPN KO ont subi une perte osseuse moins importante, malgré un nombre d'ostéoclastes plus grand (Yoshitake *et al.* 1999). Les ostéoclastes formés ont un niveau d'expression du récepteur CD44 réduit, sont moins mobiles et ne peuvent pas correctement résorber la matrice osseuse (Chellaiah *et al.* 2003). *In vitro*, Ihara *et al.* (2001) ont noté une inhibition de la résorption osseuse induite par l'hormone parathyroïde. Une augmentation de la formation de l'os corticale a même été notée chez les souris déficientes en OPN traitées avec cette hormone (Kitahara *et al.* 2003). Cette protection contre la résorption osseuse a aussi été observée chez les souris OPN KO suivant le test de la suspension caudale (Ishijima *et al.* 2001). Dans le cas d'une réparation tissulaire, plus de débris tissulaires, une désorganisation du tissu et une altération de la fibrillogénèse du collagène au site de la lésion ont été dénotés chez les souris OPN KO (Liaw *et al.* 1998).

Les animaux déficients en OPN ne présentent aucune anomalie rénale. Toutefois, l'obstruction urétérale et l'ischémie rénale dans ces souris ont conduit à une infiltration de macrophages beaucoup moins importante comparativement aux animaux normaux (Ophascharoensuk *et al.* 1999; Persy *et al.* 2003). Cette molécule pourrait donc aider à attirer les macrophages aux sites de lésions. Il est important de noter que les macrophages et les ostéoclastes dérivent des monocytes, et par conséquent, l'OPN pourrait jouer un rôle dans la migration et la différenciation finale des cellules précurseurs.

Dans le domaine des maladies du système cardiovasculaire, l'OPN inhibe la calcification dans la plaque d'athérome (Giachelli *et al.* 1993; Speer *et al.* 2002; revue de Speer *et al.* 2004; Steitz *et al.* 2002) et dans les bioprothèses valvulaires (Ohri *et al.* 2005). Elle n'est pas exprimée de façon constitutive dans le système vasculaire mais son expression est induite suivant une lésion. Par exemple, suite à un infarctus, elle est sécrétée par les macrophages (Murry *et al.* 1994). L'absence du gène de l'OPN a entraîné une mauvaise cicatrisation du myocarde et une dilatation du ventricule gauche (Trueblood *et al.* 2001). Elle est donc importante pour la sécrétion du collagène lors d'une réparation tissulaire du tissu cardiaque. L'inactivation du gène de l'OPN, dans une souris déficiente pour la protéine matricielle Gla, a également causé une calcification anormale des vaisseaux sanguins (Speer *et al.* 2002).

L'ostéopontine est aussi impliquée dans plusieurs cancers du sein, du côlon, de la prostate, des ostéosarcomes, des carcinomes disséminés et des mélanomes, ce qui a conduit à son utilisation comme marqueur de la progression de la tumeur (revues de Weber 2001; Rittling

*et al.* 2004). Les résultats des études sur l'OPN dans ces cancers sont souvent paradoxaux puisque sa fonction dépend de plusieurs paramètres dont le type de tumeur, le microenvironnement et le système expérimental utilisé. Elle est considérée comme une molécule protumorale favorisant la formation de métastase. Suivant l'injection de cellules mélanomiques, les animaux normaux avaient plus de métastases osseuses et pulmonaires que les souris OPN KO (Nemoto *et al.* 2001). Certaines études ont suggéré que cette molécule serait impliquée dans la transformation des cellules cancéreuses (Wu *et al.* 2000). Par contre, Morimoto *et al.* (2002) ont proposé qu'elle participerait à la prévention de la transformation de ces cellules. Aussi, un plus grand nombre de métastases pulmonaires a également été trouvé chez les souris OPN KO, mais celles-ci étaient plus petites (Crawford *et al.* 1998).

La BSP (revue de Ganss *et al.* 1999), phosphorylée, glycosylée et sulfatée, est exclusive aux tissus minéralisés (cément, dentine et os) quoiqu'elle a déjà été détectée dans le cartilage hypertrophié (Chen *et al.* 1992a). Elle est sécrétée par les ostéoblastes «actifs», lors du remodelage osseux, aux sites de formation *de novo* de l'os (Chen *et al.* 1991; 1992a). Les interfaces os-cartilage sont enrichies de cette protéine. Puisqu'il a été établi que l'association de la BSP à la matrice se faisait avant la minéralisation de celle-ci, ceci suggère un rôle de nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (HA) (Kasugai *et al.* 1991; Hunter *et al.* 1996). Sa séquence RDG, comme celle de l'OPN, permet l'adhésion aux intégrines et la signalisation cellulaire. Les nombreuses modifications post-traductionnelles de la protéine participeraient aux interactions matrice-matrice et matrice-cellule (revue de Qin *et al.* 2004). Par exemple, la phosphorylation influencerait la croissance des cristaux,

tandis que la glycosylation affecterait l'adhésion cellulaire. De plus, ces modifications ainsi que la présence de deux séquences riches en acides glutamiques (poly [E]) dans la partie N-terminale de la protéine seraient impliquées dans l'adhésion de la protéine aux HA (Oldberg *et al.* 1988; Stubbs, III *et al.* 1997; Goldberg *et al.* 2001; revue de Qin *et al.* 2004).

Il a été rapporté que la BSP est immunodétectée aux sites initiaux de minéralisation (Bianco *et al.* 1993) et qu'elle est colocalisée aux surfaces enrichies de la protéine *bone acidic glycoprotein-75* (BAG-75) dont l'expression est retrouvée uniquement durant la formation de l'os et de la dentine (Gorski *et al.* 2004; Midura *et al.* 2004). De plus, le niveau d'expression de la BSP et celui de son ARNm sont augmentés dans les chondrocytes hypertrophiés et les ostéoblastes (Fisher *et al.* 1983; Bianco *et al.* 1991). Enfin, les résultats présentés par Bellahcène *et al.* (2000) ont démontré la participation de la BSP dans l'angiogenèse durant la formation osseuse. La BSP pourrait donc jouer un rôle majeur durant les premiers événements menant à la formation des tissus calcifiés.

Une seule étude sur les souris BSP KO a été rapportée dans la littérature. Un résumé de communication par Aubin *et al.* (1995) a révélé que ces animaux avaient quelques différences physiologiques comparativement aux animaux normaux. Leur calvaria serait plus mince et l'espace occupé par la moelle osseuse serait réduit. Dans le tibia, cette réduction est aussi observée aux sites d'ossification secondaire de l'épiphyse. Chez les animaux plus âgés, les incisives seraient légèrement plus longues. L'absence marquée de phénotype osseux laisse croire qu'il existe des mécanismes compensatoires qui

s'enclenchent lors du développement des souris BSP KO. Contrairement aux études sur les animaux OPN KO, l'effet de l'inactivation de gène de la BSP n'a pas encore été évalué dans un modèle d'ostéoporose ou de guérison osseuse.

La BSP a été retrouvée dans les cellules cancéreuses de la prostate (Waltregny *et al.* 1998), des poumons (Bellahcène *et al.* 1997), de la glande thyroïde (Bellahcène *et al.* 1998) et dans certains sarcomes dérivés des tissus calcifiés (*e.g.* ostéosarcomes, odontomes améloblastiques et ostéoclastomes) (revue de Ganss *et al.* 1999). Cependant, le rôle spécifique de la protéine n'a pas encore complètement été élucidé. Son association à des microcalcifications d'HA, dans les cancers mammaires humains, laisse croire qu'elle serait impliquée dans l'acquisition d'un phénotype osseux par les cellules cancéreuses (Bellahcène *et al.* 1994). La BSP favoriserait également l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses sur la matrice minéralisée grâce aux interactions avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Sung *et al.* 1998; Karadag *et al.* 2004). Récemment, l'étude de Nam *et al.* (2006) a illustré que la capacité du TGF $\beta$  à promouvoir la formation des métastases dépend de l'expression de la BSP. Le taux sérique de la BSP est corrélée au développement de métastases osseuses et a un intérêt clinique certain pour le pronostic précoce de la maladie (Diel *et al.* 1999; Fedarko *et al.* 2001).

## L'évolution des protéines non-collagéniques

Bien que les PNCs soient structurellement différentes, elles semblent partager quelques similarités. Fisher *et al.* (2001) ont proposé que les deux principales PNCs de l'os, l'OPN et la BSP, fassent partie de la famille des SIBLINGs (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein*). En plus de ces deux protéines osseuses, cette famille comprend la phosphoprotéine de la matrice dentinaire 1 (*Dentin Matrix Protein 1*, DMP-1), la sialophosphoprotéine dentinaire (DSPP) et la phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire (*Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein*, MEPE). Les membres de cette famille de protéines sont distincts au niveau de leur séquence primaire. Cependant, l'analyse de leurs exons révèle une certaine homologie de fonctions entre les protéines de l'os et de la dent. En effet, les gènes de ces protéines sont regroupés sur le chromosome humain 4 et ces protéines sécrétées se retrouvent majoritairement dans les tissus calcifiés. Elles possèdent une séquence RGD d'adhésion aux intégrines et contiennent plusieurs modifications post-traductionnelles (revue de Qin *et al.* 2004). Les deux derniers exons codent généralement pour la majeure partie de la séquence de la protéine. Cette famille de protéines a la capacité de se lier et de réguler l'activité des métalloprotéinases de la matrice (Fedarko *et al.* 2004).

Des travaux récents ont démontré l'existence de liens communs entre la calcification de la dent et l'os (Kawasaki *et al.* 2003; 2004; revue de Huq *et al.* 2005). En effet, chez les mammifères, des protéines amélaire (AMEL, AMBN et ENAM), des protéines de la famille des SIBLINGs, des protéines salivaires ainsi que des caséines du lait dériveraient de



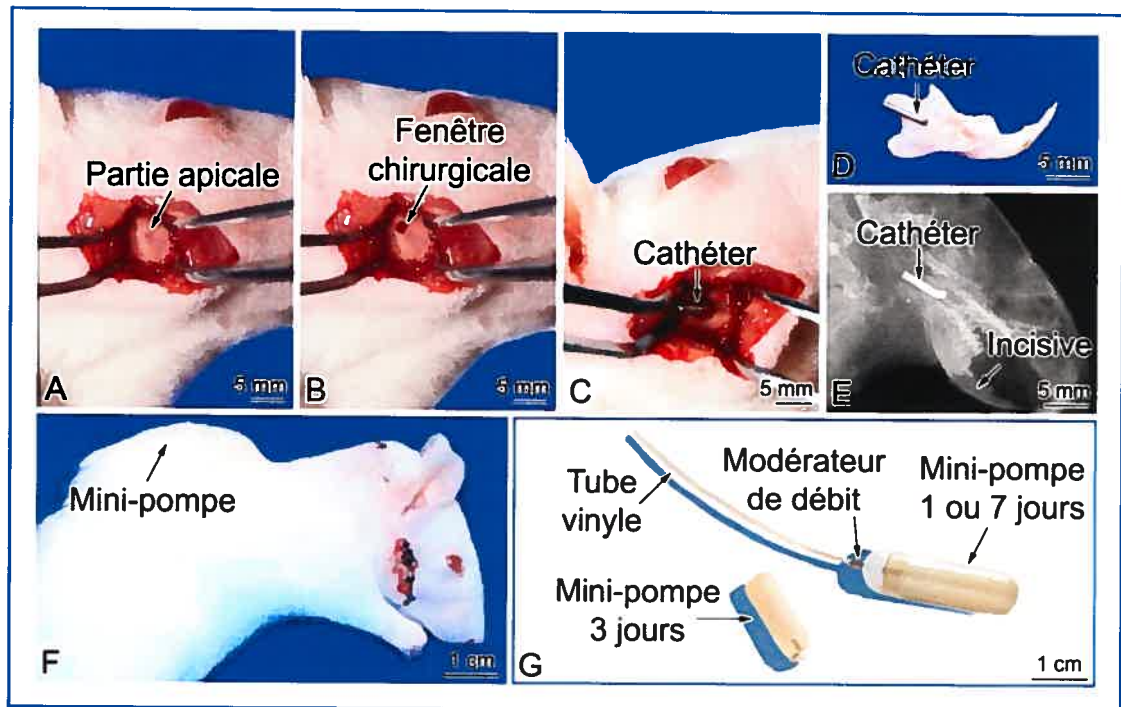
la duplication d'un gène ancestral commun SPARC et formeraient la famille des *Secretory Calcium-Binding Phosphoprotein* (SCPP) (Kawasaki *et al.* 2005b; revue de Sire *et al.* 2005).

## **Les approches expérimentales pour étudier les tissus dentaires**

Diverses approches expérimentales, *in vivo*, pour étudier la dent ont été développées : le sectionnement d'une partie de l'os alvéolaire ou de la zone apicale de l'incisive de rat, et l'excision radiculaire pour étudier l'activité cellulaire (Herzberg *et al.* 1941; Bryer 1957; Berkovitz *et al.* 1969; 1971a; 1971b). La création de défauts osseux de dimension critique (qui ne se réparent pas de façon naturelle) a été également utilisée pour étudier la réparation et le remodelage de l'os (Schmitz *et al.* 1986). Redondo *et al.* (1995) ont utilisé le modèle d'ostéotomie de l'os alvéolaire de la mandibule, à la surface labiale de la dent, afin de cibler les stades de sécrétion et de maturation des améloblastes. Ces techniques comportent de nombreux désavantages : i) elles causent des dommages considérables à l'organe de l'émail, ii) elles créent une présence importante de débris osseux au site de chirurgie, et iii) elles produisent un effet néfaste à l'animal (trauma, douleurs). McKee *et al.* (1993) ont raffiné une méthode chirurgicale consistant en une microadministration d'agents via une fenêtre chirurgicale dans l'os alvéolaire, ciblant eux aussi la zone de sécrétion et de maturation de l'incisive. Cependant, une période de latence était nécessaire afin de permettre le déplacement des tissus endommagés, ainsi qu'une deuxième chirurgie pour l'injection des produits. Comme les approches précédentes, cette méthode cible un stade de développement spécifique de l'incisive.

Une technique innovatrice a été mise au point au laboratoire (Vu *et al.* 1999; Orsini *et al.* 2001) et consiste en la création d'une fenêtre dans l'os alvéolaire, du côté buccal, près de l'apex de l'incisive (Figure 2, page 12). L'administration de divers produits se fait via un système de mini-pompe osmotique reliée à la fenêtre chirurgicale via un tube en vinyle et un cathéter de métal. La position de la fenêtre chirurgicale permet un accès à l'organe de l'émail et à une zone active en remodelage osseux (Figure 1, page 2). De plus, la partie apicale de l'incisive est un site riche en cellules souches et actives en prolifération cellulaire (Smith 1975).

L'injection systémique d'agents biologiques requiert généralement de larges doses afin d'atteindre le tissu cible à des concentrations assez grandes pour être détectées et produire un effet. Ces concentrations sont rarement physiologiques et sont restreintes lorsque les produits sont disponibles en petite quantité. La microinjection est une alternative permettant une infusion locale des produits; cependant, les volumes utilisés sont souvent limités et les injections ne sont pas reproductibles d'un animal à l'autre. L'espace parodontal consiste en une zone cloisonnée où des quantités minimales d'agents doivent être administrées afin d'obtenir une grande concentration locale. C'est un avantage important lorsqu'on travaille avec des protéines difficiles à purifier. De plus, contrairement aux microinjections, cette approche permet une administration continue et un contrôle spatial, quantitatif et temporel des produits.



**Figure 2 : La fenêtre chirurgicale chez le rat.** (A) Une incision verticale, suivant la direction des fibres musculaires, expose l'os de la mandibule au niveau de l'apex de la dent. (B) Une fenêtre osseuse est créée, à l'aide d'une fraise dentaire (1.5 mm de diamètre) dans l'os alvéolaire entourant l'organe de l'émail, près de la partie apicale de l'incisive. (C) Le cathéter de métal est installé dans le trou. (D) Photographie d'une hémimandibule isolée de rat illustrant la position du cathéter. (E) Le positionnement et la stabilité du cathéter sont vérifiés par une radiographie, latéro-latérale, à 12 pulsions/min. (F) Le tube de vinyle est passé sous le masséter. La mini-pompe osmotique est glissée sous la peau, dans la partie postérieure du cou. Les muscles et la peau sont suturés avec des fils résorbables et des fils non résorbables respectivement. (G) Photographie montrant les mini-pompes osmotiques Alzet<sup>®</sup>, le modérateur de débit et le tube de vinyle.

L'hémimandibule du rat est donc un modèle unique pour étudier le développement de la dent et la formation des tissus calcifiés afin de mieux comprendre les phénomènes qui les régissent, et ainsi développer des approches biologiques plus précises pour le traitement de leurs affections. Le système de la fenêtre chirurgicale associé à une mini-pompe osmotique permet d'altérer localement l'expression des PNCs, de modifier le tissu et ainsi nous informer sur leurs activités cellulaires et matricielles.

### **La thérapie génique : le nouvel avenir de la médecine**

À l'origine, la thérapie génique visait surtout à corriger les maladies héréditaires, telles l'hémophilie ou la myopathie de Duchenne, mais les espoirs suscités par cette nouvelle technique se sont vite répandus aux domaines orthopédiques et aux maladies parodontales (revues de Evans *et al.* 2004; Kofron *et al.* 2005). Le principe de cette nouvelle voie thérapeutique consiste à introduire dans une cellule cible ou à modifier l'expression d'un gène au niveau cellulaire dans le but de réparer un défaut génétique ou d'augmenter la réponse biologique causée par une maladie.

L'essentiel des recherches actuelles portent sur l'élaboration et le développement de systèmes de transfert de gènes. Les vecteurs doivent être efficaces, sûrs, spécifiques à un type cellulaire et être produits à de grandes concentrations. De plus, ils doivent pouvoir infecter les cellules quiescentes afin d'obtenir une expression à long terme du transgène.

## **Le transfert de gènes – du concept à la pratique**

### **Les méthodes non virales**

L'introduction de gènes dans une cellule, à l'aide de vecteurs non viraux, dépend des mécanismes cellulaires pour livrer et exprimer le gène. Les techniques non virales incluent les liposomes, les polymères, les plasmides d'acide désoxyribonucléique (ADN) et l'électroporation (revue de Partridge *et al.* 2004). Ces vecteurs non viraux livrent l'ADN de façon épisomale et présentent de nombreux avantages; leur production est relativement simple, ils sont stables chimiquement. Ils sont sécuritaires et ne provoquent pas de réponse immunitaire autorisant une administration répétée. Cependant, la faible efficacité de transfection et l'expression transitoire des gènes d'intérêt limitent grandement leur utilisation.

### **Les méthodes virales**

Plusieurs avantages sont reliés à l'emploi des vecteurs viraux pour effectuer un transfert de gène par rapport aux traitements 'classiques' à l'aide de protéines. L'effet thérapeutique des protéines dépend de plusieurs facteurs, dont la nécessité d'une administration répétée pour maintenir l'expression de la protéine, son temps de demi-vie, son origine et sa pureté. Au contraire, les vecteurs peuvent être produits à de grandes concentrations. Ils peuvent infecter différents types de cellules, ils ont une grande efficacité de transfection et l'expression des gènes peut être soutenue et régulée. Les vecteurs les plus communs sont

les rétrovirus, les lentivirus, les adénovirus et les virus associés à un adénovirus (*adeno-associated virus*).

Les vecteurs rétroviraux de type murin de Moloney, dont le matériel génétique est de l'ARN qui est transcrit en ADN, sont parmi les premiers vecteurs viraux à avoir été utilisés (Ellis *et al.* 1989; Blaese *et al.* 1995). Le transgène (jusqu'à 10 kb) peut s'intégrer dans le génome et se retrouver dans les cellules filles permettant son expression prolongée (revues de Dai *et al.* 2004; Verma *et al.* 2005). De plus, ils ne provoquent pas de réponse immunitaire. Il a été démontré que les rétrovirus pouvaient également infecter les tissus calcifiés (Breitbart *et al.* 1999; Laurencin *et al.* 2001; Oreffo *et al.* 2001; revue de Partridge *et al.* 2004). Cependant, leur utilisation est limitée par le risque de mutagenèse et le fait qu'ils nécessitent des cellules cibles en mitose pour que le transfert ait lieu, réduisant ainsi l'efficacité d'une application directe *in vivo*.

Les lentivirus font partis de la famille des rétrovirus (revue de Verma *et al.* 2005). Ils sont efficaces et puissants pour le transfert de gène. Ces vecteurs viraux dérivent du virus de l'immunodéficience humaine type I (VIH-1), du singe (VIS) ou du félin (VIF). Ils infectent les cellules en division ainsi que les cellules quiescentes, intègrent le génome de façon stable, ne provoquent pas de réaction immunitaire, ont un grand tropisme et permettent une expression prolongée du transgène (Federico 2003). Les lentivirus peuvent transférer une grande variété de tissus et de types cellulaires incluant les cellules musculaires (Kafri *et al.* 1997), les glandes salivaires (Shai *et al.* 2005), le foie (Kafri *et al.* 1997), les neurones (Naldini *et al.* 1996a; 1996b), les kératinocytes (Ghazizadeh *et al.* 2004) et les cellules de la

moelle osseuse (Zhang *et al.* 2002). Toutefois, très peu d'études ont été faites dans les tissus calcifiés (Gouze *et al.* 2002; 2003; Kyrkanides *et al.* 2004; Sugiyama *et al.* 2005).

Les adénovirus, dont le matériel génétique est de l'ADN double brin, sont plus efficaces pour le transfert de gène puisqu'ils peuvent être produits à de très haute concentration ( $10^{12}$  particules/ml) en plus d'avoir une grande capacité de clonage (près de 30 kb) (revues de Yla-Herttuala *et al.* 2000; Verma *et al.* 2005). Ce type de vecteur a été largement utilisé pour la réparation de défauts osseux, la régénération osseuse de malformations congénitales ou de lésions traumatiques (revues de Alden *et al.* 2000; Helm *et al.* 2000; Baltzer *et al.* 2000b; 2004; Dai *et al.* 2004; Luo *et al.* 2005). Le gène transféré n'est pas intégré au génome de la cellule cible ce qui diminue le risque de mutagenèse mais limite l'expression du transgène dans le temps. De plus, ces vecteurs peuvent causer une réponse immunitaire empêchant l'augmentation de la dose de virus ou son administration répétée (Newman *et al.* 1995; revue de Niyibizi *et al.* 1998; Musgrave *et al.* 1999; Baltzer *et al.* 2000b; revue de Boissier *et al.* 2004; revue de Verma *et al.* 2005).

Les recherches actuelles se tournent vers une nouvelle classe de vecteurs viraux de la famille des parvovirus: les virus associés à un adénovirus (revues de Schwarz 2000; Ulrich-Vinther *et al.* 2002; Dai *et al.* 2004; Verma *et al.* 2005). Plusieurs avantages sont reliés à l'utilisation de ce type de virus non enveloppé à ADN simple brin. Ce vecteur viral peut infecter divers types cellulaires de façon très efficaces, il est faiblement immunogène et permet l'expression à long terme de la protéine d'intérêt. L'administration intramusculaire de vecteur codant pour des protéines de la morphogenèse osseuse 2 ou 4 (*Bone*

*Morphogenetic Proteins*, BMP) a induit la formation d'une matrice osseuse sans provoquer de réponse immunitaire (Chen *et al.* 2003; Luk *et al.* 2003). La taille de l'insert (environ 5 kb), les difficultés de production et le risque de mutagenèse ont restreint l'usage de ce vecteur (revues de Schwarz 2000; Dai *et al.* 2004). De plus, l'administration répétée de ce virus peut provoquer une réponse immunitaire (Boissier *et al.* 2004).

### **Les voies pour le transfert de gènes**

La thérapie génique *ex vivo* consiste à prélever les cellules cibles, les modifier génétiquement avec le gène d'intérêt, puis à les réintroduire dans l'organisme au site désiré. Des cellules exprimant des BMPs ont été implantées pour étudier le potentiel régénératif de ces protéines (revues de Dai *et al.* 2004; Franceschi 2005). Cette approche s'est avérée plus efficace, sécuritaire, reproductible et nécessite une faible quantité de virus. En pratique, elle implique plusieurs manipulations en laboratoire et donc serait moins efficace si elle devait être appliquée aux études cliniques à grande échelle.

La thérapie génique *in vivo* consiste à injecter le vecteur portant le gène thérapeutique directement dans la circulation sanguine; le vecteur devrait alors atteindre spécifiquement les cellules cibles. L'administration de vecteurs viraux dans les tissus calcifiés s'est fait par : i) une injection systémique (Kostenuik *et al.* 2004; Katsube *et al.* 2005), ii) une injection intramusculaire (Musgrave *et al.* 1999; Alden *et al.* 2000; Luk *et al.* 2003; Chen *et al.* 2003), iii) une injection directe dans une cavité naturelle telle que les articulations, l'espace synovial et la moelle osseuse (Kuboki *et al.* 1999; Watanabe *et al.* 2000; Gouze *et*



*al.* 2002; Hiltunen *et al.* 2003; Robbins *et al.* 2003) ou iv) une injection dans un défaut osseux (malformations congénitales, lésions traumatiques) (Alden *et al.* 2000; Baltzer *et al.* 2000a; 2000b; Helm *et al.* 2000; Ashinoff *et al.* 2004). Pour infecter un nombre suffisant de cellules et pour que l'expression du gène persiste, une grande quantité de virus doit être injectée (revue de Franceschi 2005). Ceci devient problématique lorsque l'on travaille avec des animaux de petites tailles, la grandeur de ces animaux limite le volume de virus que l'on peut administrer localement.

## Objectifs de recherche

Notre travail vise à contribuer à la compréhension des phénomènes qui régissent la formation et le maintien des tissus calcifiés, de façon à développer des approches plus précises et plus efficaces pour le traitement de leurs affections. Des travaux récents ont suggéré que les divers tissus calcifiés, quoique structurellement différents, partagent des caractéristiques communes lors de leur formation (revue de Boskey 2003). Entre autre, l'activité principale des PNCs tissus calcifiés collagéniques (cément, dentine et os alvéolaire) et non-collagéniques (émail, cément acellulaire afibrillaire) seraient essentiellement de réguler le processus de minéralisation (revue de Nanci *et al.* 1999). Certaines PNCs osseuses dériveraient du même gène ancestral que les PNCs amélaire (Kawasaki *et al.* 2005b; revue de Sire *et al.* 2005). Il a aussi été démontré que les protéines amélaire seraient capable d'influencer d'autres tissus calcifiés; elles seraient osséoinductives et elles induiraient la réparation dentinaire (revue de Veis 2003; Goldberg *et al.* 2006).

Malgré l'importance de ces protéines dans les tissus calcifiés, plusieurs animaux déficients pour les PNCs ne présentent aucun phénotype ou défaut apparent. En effet, due à l'importance vitale des tissus calcifiés, ces animaux développeraient des mécanismes compensatoires dans ces tissus. De plus, l'information sur l'activité, les propriétés et la structure des PNCs dérivent généralement d'études *in vitro* ou de prédictions *in silico* qui ne reflètent pas toujours la complexité de l'environnement physiologique. Notre *hypothèse centrale de travail* est que la manipulation locale des PNCs dans leur microenvironnement

nous renseignerait sur leurs rôles, et les informations acquises dans un tissu pourront servir à la compréhension générale des principes fondamentaux qui régulent les phénomènes de biominéralisation de tous les tissus calcifiés.

Nous avons utilisé le système de la 'fenêtre chirurgicale' combinée au traçage moléculaire, à la mutagenèse dirigée et à la transgénèse pour adresser les trois hypothèses spécifiques qui suivent :

- 1) Le rôle précis de l'OPN *in vivo* et son comportement suivant sa sécrétion dans l'environnement extracellulaire demeurent encore ambigus. De ce fait l'OPN se retrouve aussi dans les fluides biologiques, incluant le sang. La forme circulante de l'OPN est considérée importante pour la progression des tumeurs (revue de Rittling *et al.* 2004), cependant son rôle possible lors de la minéralisation a été largement ignoré. L'OPN dans la circulation sanguine serait complexée au Facteur H, ce qui la rend inactive puisqu'elle serait inaccessible pour la liaison à d'autres molécules (Fedarko *et al.* 2000). D'autres études considèrent les diverses protéines osseuses comme des produits de dégradation et sont d'ailleurs utilisés comme marqueurs sériques de l'état osseux (Bautista *et al.* 1996; Singhal *et al.* 1997). Dans le premier article, nous avons posé l'hypothèse que la forme circulante de l'OPN aurait aussi un rôle actif lors de la formation des tissus calcifiés.
- 2) Les expériences de minéralisation *in vitro* ont établi que des séquences riches en acides glutamiques présentes dans la BSP contribuent largement à l'activité de nucléation des

cristaux d'HA (Tye *et al.* 2003). Les prédictions *in silico* ont également suggéré que ces variants moléculaires pourraient favoriser son adhésion au minéral. Le microenvironnement dans lequel les protéines se retrouvent influence aussi leurs propriétés physicochimiques; l'effet d'une protéine sur la minéralisation peut varier selon qu'elle soit en solution ou adsorber sur une matrice. Il est donc crucial d'évaluer la fonction d'une protéine dans un milieu biologique multifactoriel. *Le postulat du deuxième article est qu'in vivo les groupements poly [E] favoriseraient la liaison de la BSP aux surfaces minéralisées constituée d'un mélange de protéines et de minéraux.*

- 3) À l'origine, l'AMBN était considérée comme une PNC retrouvée exclusivement dans l'émail où elle agirait sur la promotion de la formation des cristaux. Il a récemment été démontré que l'AMBN était aussi exprimée lors du développement de l'os craniofacial (Spahr *et al.* 2006). Cependant, les conséquences de cette expression embryonnaire sur la formation de l'os adulte restent encore à déterminer. Afin d'adresser ces questions, nous avons eut recours à la transgénèse. Toutefois, le transfert de gène dans les tissus calcifiés s'avère être un processus encore complexe puisqu'il faut s'assurer de cibler directement les cellules ostéogéniques qui forment la matrice osseuse. Ce dernier aspect n'a cependant pas encore été établi pour des approches de transgénèse *in vivo*. *Notre hypothèse de travail dans le troisième article est que la combinaison de la transgénèse à une infusion lente et contrôlée via la 'fenêtre chirurgicale' nous permettrait de transférer, de façon stable, les différents types cellulaires de l'os.* Ces travaux représentent une étape essentielle à l'élaboration d'études ultérieures visant à déterminer l'effet de l'AMBN sur la formation osseuse.

## *Chapitre 2*

### **A Tracer Study with Systemically and Locally Administered Dinitrophenylated Osteopontin**

Reproduced, with permission, from *Antonio Nanci, Rima M. Wazen, Sylvia Francis  
Zalzal, Micheline Fortin, Harvey A. Goldberg, Graeme K. Hunter and Lucian-Dorin  
Ghitescu: A Tracer Study with Systemically and Locally Administered  
Dinitrophenylated Osteopontin.*

*Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 52. 12: 1591-1600 (2004)

## Sommaire

L'ostéopontine (OPN) est une protéine non-collagénique (PNC) présente dans les tissus calcifiés à base de collagène mais qui se retrouve aussi dans les divers fluides du corps, incluant le sang. Jusqu'à présent, il n'a pas encore été démontré que l'OPN circulante a un rôle actif et qu'elle participe à la formation des tissus calcifiés. Afin d'étudier cette possibilité, nous avons conjugué l'OPN au dinitrophénol (DNP). Le complexe a été administré de façon intraveineuse ou infusé, à l'aide d'une mini-pompe osmotique, au travers d'une fenêtre chirurgicale créée dans l'hémimandibule du rat. L'albumine dinitrophénylée (ALB-DNP) a été utilisée comme contrôle. La localisation des protéines marquées au DNP a été réalisée par immunocytochimie à l'or colloïdal. Ainsi, il a été démontré que l'OPN-DNP, administrée à distance, s'associe et s'accumule aux mêmes sites osseux que son homologue endogène : les foyers initiaux de minéralisation, aux surfaces et aux interfaces de l'os ainsi que dans les accumulations de matériels organiques non-collagéniques autour et entre les fibres calcifiées de collagènes. Même si l'ALB-DNP a été administrée à une concentration largement supérieure, elle ne s'est pas accumulée à ces sites. Ces résultats illustrent, pour la première fois, que l'OPN circulante s'incorpore dans la matrice osseuse en formation ce qui suggère que les protéines circulantes, généralement considérées comme non fonctionnelles, pourraient également contribuer à la formation des tissus calcifiés.

A Tracer Study with Systemically and Locally Administered Dinitrophenylated Osteopontin

Antonio Nanci<sup>1</sup>, Rima M.Wazen<sup>1</sup>, Sylvia F. Zalzal<sup>1</sup>, Micheline Fortin<sup>1</sup>, Harvey A. Goldberg<sup>3</sup>, Graeme K.Hunter<sup>3</sup> and Dorin-Lucian Ghitescu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Faculty of Dentistry,  
<sup>2</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal,  
Montreal, QC, Canada, <sup>3</sup>CIHR Group in Skeletal Development and Remodeling, School of  
Dentistry, University of Western Ontario, ON, Canada

Corresponding author:

Antonio Nanci,

Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials,

Faculty of Dentistry, Université de Montréal,

P.O. Box. 6128, Station Centre-Ville,

Montreal, QC, Canada, H3C 3J7;

Tel: (514) 343-5846

Fax: (514) 343-2233

████████████████████

## **Abstract**

Osteopontin (OPN), a major noncollagenous matrix protein of bone, is also found in tissue fluids and in the circulation. It is still not clear whether circulating OPN contributes to bone formation. To elucidate this question, rat OPN was tagged with dinitrophenol groups and administered to rats either intravenously or by infusion with an osmotic minipump through a 'surgical window' in the bone of the hemimandible. Dinitrophenylated rat albumin was used as a control. The presence and distribution of tagged proteins were revealed by immunogold labeling on sections of tibia and alveolar bone. Tagged molecules of OPN were found in mineralization foci, surfaces and interfaces and matrix accumulations among calcified collagen fibrils. Even though dinitrophenylated albumin was administered at several fold higher concentrations, it did not accumulate in these sites. These results show that circulating OPN can incorporate in specific compartments of forming bone and suggest that such molecules may play a more important role than previously suspected.

**KEYWORDS:** Tracer, Immunocytochemistry, Osteopontin, Albumin



## Introduction

Osteopontin (OPN) is an acidic phosphorylated glycoprotein that is rich in aspartic acid, glutamic acid and serine residues, and contains an RGD sequence for cell attachment (reviewed by Sodek *et al.*, 2000). It is a member of the SIBLING family of proteins secreted by osteoblasts in forming bone (Fisher *et al.*, 2001), where it accumulates in mineralization foci, spaces between mineralized collagen fibrils and in cement lines (Nanci, 1999). In addition, it is also expressed by a broad variety of cells (Qin *et al.*, 2004; Denhardt *et al.*, 2001), suggesting a multiplicity of functions in diverse biological events. Because it has a strong affinity for hydroxyapatite, it accumulates in calcified matrices where it modulates formation and growth of mineral (Hunter *et al.*, 1994). Osteopontin expression increases as a result of injury and disease and is closely associated with ectopic calcified deposits (Steitz *et al.*, 2002).

Osteopontin is present not only in tissues but also dissolved in serum and tissue fluids (Sodek *et al.*, 2000; Rittling and Chambers, 2004). The potential contribution of these circulating forms of OPN to calcified tissue biology has received little attention. Indeed, a number of bone matrix components are normally found in the circulation but these are generally regarded as metabolic byproducts of bone formation and resorption that have no function at distant sites. To our knowledge there is only one study that explored the fate of circulating OPN (VandenBos *et al.*, 1999). This light microscope study showed that

intravenously administered  $^{125}\text{I}$ -OPN can be transported via the circulation and deposited into a number of calcified tissues. The amount of tracer administered was “three orders of magnitude” greater than the quantity of free OPN reported in human serum (concentrations in rat serum are not known). Under these conditions, some  $^{125}\text{I}$ -OPN was also found in enamel, a compartment in which the presence of OPN has not been revealed by biochemical assays and immunohistochemical techniques. Therefore, the authors concluded that they “could not exclude the possibility that the relatively high dose of injected OPN could have lead to a somewhat artificial distribution pattern”. These results nonetheless clearly highlighted the possibility that OPN in calcified tissues is derived not only from local cellular sources but it may also be recruited from outside the local environment via the circulation.

Proteins have been tagged with chemical groups other than  $^{125}\text{I}$  in order to visualize them. One such alternative method is dinitrophenylation, involving the covalent addition of dinitrophenol (DNP) groups to the  $\epsilon$ -lysine residues of proteins (Little and Eisen, 1967). This reaction, like iodination, generally does not alter the physiochemical properties of the tagged molecules (Kessler *et al.*, 1982). Thereafter, detection of tagged proteins is highly sensitive because several DNP groups can be attached to a protein and the antigenicity of those groups is resistant to tissue processing conditions (Kessler *et al.*, 1982; Ghitescu and Bendayan, 1992; Ghitescu and Bendayan, 1992). Dinitrophenylated albumin (ALB) has been administered to study vascular permeability (Ghitescu and Bendayan, 1992; Arshi *et al.*, 2000). In calcified tissues, DNP-tagged ALB was used to investigate the uptake of

proteins by ameloblasts and odontoblasts (Nanci *et al.*, 1996). These cells, as well as osteoblasts, were shown to possess high levels of endocytotic activity and to take up protein non-selectively from the interstitial fluids.

The objective of the present study was to test the hypothesis that circulating forms of OPN may participate in bone formation. Tracer protocols such as those described above generally involve intravenous injections of relatively large amounts of proteins in order to saturate tissues throughout the body in quantities large enough to be detected. Such large dosages rarely are physiological. Our laboratory has developed an experimental system that allows the controlled administration of biological and chemical agents through a 'surgical window' in the rat hemimandible. (Vu *et al.*, 1999; Orsini *et al.*, 2001). This system was used to infuse near physiological amounts of dinitrophenol-tagged OPN and to demonstrate that the tracer molecules reach and are incorporated into the same sites where endogenous OPN is believed to accumulate and act (Nanci, 1999).

## **Materials and Methods**

### **Dinitrophenylation**

Albumin (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada) and bone-extracted rat OPN (Goldberg and Sodek, 1994) were tagged with DNP according to the method described by (Little and Eisen, 1967). Briefly, distilled water, potassium carbonate (BDH, Inc, Toronto, ON, Canada), 2,4-dinitrobenzene sulfonic acid (Sigma-Aldrich) and proteins were mixed in a 0.2:1:2:4 ratio by weight for 48 hours, at room temperature, shielded from light. At the end of the reaction, the unreacted DNP was removed by dialysis for 72 hours against 0.01M phosphate-buffered saline (PBS), containing 0.85% NaCl, pH 7.2, in 12-kDa-dialysis tubing (Sigma-Aldrich). The complexes were concentrated by centrifugation at 300-350Xg, 4°C for 20 min, in Centricon<sup>®</sup> YM-10 ultrafiltration tubes (Millipore Corporation, Bedford, MA).

### **Surgical Procedures**

Juvenile (5-6 weeks old), male Wistar rats weighting  $100 \pm 10$ g (Charles Rivers Canada; St-Constant, QC, Canada) were anesthetized with an intraperitoneal injection of a 1:1:2 mixture of Hypnorm (fentanyl citrate and fluanison; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), Versed (midazolam; Hoffmann-LaRoche, Mississauga, ON, Canada) and distilled water. An 8-mm incision was made through the skin following an imaginary line

extending between the auditory meatus and the lip commissure (Fig. 1a). To expose the hemimandible, the masseter muscle was separated along the length of the fibers with a scalpel surgical blade (No 15C; Almedic, Montreal, QC, Canada). A dental drill fitted first with a size 010 carbide round burr (Brassler, Montreal, QC, Canada), followed by a size 014, was used to make a hole in the alveolar wall on the bony elevation associated with the apical end of the incisor, at ~2 mm from the posterior border of the ramus, (Fig. 1b). During drilling, the surgical site was irrigated with physiological saline. One or 3 day Alzet osmotic minipumps (model 2001D for 1 day (8.0  $\mu\text{L}/\text{h}$ ) and 1003D for 3 days (1.0  $\mu\text{L}/\text{h}$ ); Alza Corporation, Palo Alto, CA) filled with complexes were slipped under the skin through a second incision made on the posterior region of the neck of the animal. A piece of vinyl tubing (size 0.72 x 1.22 mm; Scientific Commodities Inc., Lake Havasu City, AZ) was hooked to the minipump and its free end passed through the neck area and underneath the masseter muscle. A metal catheter, made by bending a 20G1 needle (Becton-Dickinson; Rutherford, NJ), was used to connect the vinyl tubing to the bony hole. The metal catheter was immobilized against the bone surface with tissue adhesive (Indermil™; Patterson Dental Supply Inc., Montreal, QC, Canada) and bone cement (Zimmer, Warsaw, IN). The muscle was rejoined with 4-0 chromic gut sutures and the skin was closed with 4-0 silk sutures (Patterson Dental Supply Inc.). The surgical site was cleaned and disinfected with 70% ethanol. The animals received an injection of Temgesic® (Buprenorphine hydrochloride, Reckitt and Colman, Hull, UK) after surgery, and were fed with soft food containing Temgesic®. X-rays, at 10 pulses per minutes, were taken to verify the positioning and the stability of the catheter (Fig. 1c).

Six male Wistar rats weighting  $100 \pm 10$ g (Charles Rivers Canada) were anesthetized and injected through the jugular vein with DNP-tagged ALB or OPN.

The route of administration, concentrations and total of amounts of complexes administered, and times of sacrifice of animals are summarized in Table 1. Negative control rats received only saline through the 'surgical window'.

All animal procedures and experimental protocols described above were in accordance with guidelines of the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of Université de Montréal.

### **Tissue Processing**

The animals were anesthetized with 20% chloral hydrate solution (0.4 mg/g body weight; Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) and sacrificed by perfusion through the left ventricle with lactate Ringer (Abbott Laboratories; Montreal, QC, Canada) for 30 seconds, followed by a fixative solution consisting of 4% paraformaldehyde (BDH; Toronto, ON, Canada) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) in 0.08M sodium cacodylate (Electron Microscopy Sciences) buffer containing 0.05% calcium chloride (Sigma-Aldrich), pH 7.2, for 20 minutes. Treated and contralateral mandibles were taken, as well as the knees, and placed in the fixative solution for 24 hours at 4°C. The hemimandibles and knees were washed with 0.1M sodium cacodylate buffer,

pH 7.2 and decalcified with 4.13% disodium ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA; Fisher Scientific) for 14 days at 4°C (Warshawsky and Moore, 1967). The decalcifying solution was changed every two days. Decalcified tissues were extensively washed in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, conventionally dehydrated in graded ethanol and embedded in LR White resin (London Resin Company; Berkshire, UK) or osmicated with potassium ferrocyanide (Sigma-Aldrich) -reduced osmium tetroxide (Electron Microscopy Sciences) (Neiss, 1984), dehydrated in acetone and embedded in Taab 812 epoxy resin (Marivac, Halifax, NS, Canada). Both resins were polymerized at 58°C for 48 hours. Some samples were left calcified and similarly processed for embedding.

Light microscope observations were made on 1µm semi-thin sections obtained with glass knives on a Reichert Jung Ultracut E ultramicrotome and stained with toluidine blue. Ultrathin sections 80-100 nm in thickness were cut with a diamond knife and transferred on Formvar<sup>®</sup>-coated (polyvinyl formate) 200-mesh nickel grids, and processed for postembedding colloidal gold immunolabeling.

### **Immunocytochemistry**

Immunolocalization of proteins was done as previously described (Nanci et al., 1996) using the postembedding colloidal gold method (reviewed in Bendayan, 1995). Briefly, grid-mounted sections of osmicated tissues were first treated with a saturated aqueous solution of sodium metaperiodate (Fisher Scientific) (Bendayan and Zollinger, 1983). All sections

were placed, for 15 minutes, on blocking solution consisting of 0.01M PBS, pH 7.2, containing 1% PBS-ovalbumin (Sigma-Aldrich) and then transferred on a drop of anti-DNP antibody (1:200, 1 hours; Dako Corp, Carpinteria, CA) to reveal the DNP-protein complexes, anti-OPN (1:10, 2 hours; LF-123; courtesy of Dr. L.W. Fisher, NIDCR, NIH, Bethesda, MD) or rabbit anti-rat ALB (1:60, 2 hours; ICN Pharmaceutical, Aurora, OH) antibodies to immunodetect endogenous molecules. Following incubation with primary antibodies, the grids were rinsed with PBS and placed again on the blocking solution for 15 minutes. A protein A-gold complex with particle size of 10-12 nm (prepared in house as described by Bendayan, 1995) was used to reveal the site of antibody binding. Finally, the grids were washed with PBS, followed by distilled water. All grids were stained with 4% aqueous uranyl acetate for 6 minutes and with lead citrate for 2 minutes, and examined in a JEOL JEM-1200 operated at 60 kV or a JEOL JEM-2011 transmission electron microscope operated at 80 kV.



## Results

### Histological Observations

Light microscopic observations of semi-thin sections in the region of the 'surgical window' of animals infused with complexes for 1 day showed the characteristics of an early tissue repair reaction (Fig. 1d). Bone debris produced during drilling (Fig. 1f), fibrin clot (Fig. 1e) and a cellular infiltrate comprising inflammatory cells, some osteoclasts and/or multinucleated giant cells and fibroblast-like cells (Figs. 1d, 1e, 1f and 1g) were present at the periphery of the hole. While osteoclasts were seen on bone debris and in the bone at the periphery, their presence was not visibly increased in animals infused with dinitrophenylated conjugates (Figs. 1e and 1g) as compared to controls infused with saline only (data not shown). As early as 3-days after the start of infusion, evidence of new bone formation was observed in animals infused either with saline only or DNP-protein complexes (Figs. 1h and 1i).

### Intravenous injections of ALB-DNP

Endogenous albumin was immunodetected in the interstitial space between osteoblasts and in osteoid, but there was no significant accumulation in the bone matrix (Fig. 2a). The presence of labeling between cells suggests that albumin can diffuse from the interstitial fluid, between cells and into osteoid. Tagged ALB was detected in the initial bone matrix deposited onto old bone (Fig. 2b) and in osteoid (Fig. 2c). Very few gold particles were

found in association with cement lines, lamina limitans or interfibrillar accumulations of noncollagenous matrix proteins. Calcified cartilage and bone exhibited almost no gold particles despite the occasional nearby presence of ALB-DNP in the tissue fluid (Fig. 2d).

#### Intravenous injections of OPN-DNP

Twenty-four hours following intravenous injections of OPN-DNP, tagged molecules were immunodetected on the surface of exposed calcified cartilage spicules in the primary spongiosa of the tibia (Fig. 3a). In some mixed spicules, cement lines between calcified cartilage and bone or between adjacent layers of bone exhibited gold particles (Fig. 3b). In general, bone was labeled along its surface but not in deeper regions, indicating that the unlabeled regions likely formed before the tracer was administered. Gold particles were found in mineralization foci in the osteoid seam and over accumulations of interfibrillar matrix in bone (Fig. 3c). Endogenous OPN was immunodetected in these areas (Fig. 3d).

#### One-day infusions of OPN-DNP

When high doses of OPN-DNP (Table 1) were infused over a 24-hour period, labeling was observed both at the drill site and at distant sites such as the growth plate. Gold particles were found in cement lines, interfibrillar matrix accumulations in bone (Fig. 4a), and mineralization foci in osteoid (Fig. 4b). At the drilling site, there was a concentration of tagged molecules on exposed bone surfaces but many of them were also trapped in the adjacent fibrin clot (Fig. 4c). Drilling caused microfractures and disrupted the collagen-packing network resulting in diffusion of tracers into deeper bone (data not shown).

When near-physiological concentrations of OPN-DNP (Table 1) were infused for 24 hours, tagged proteins were found mainly in the surface layer of bone surrounding the hole, and in the fibrin clot at the surgical site (Fig. 4d). The density of labeling over these compartments appeared to be somewhat less than with the higher dose (compare Fig. 4c with 4 d). Some tracer molecules were found in deeper regions of bone along surfaces exposed during the surgical procedure, such as osteocyte canaliculi and split cement lines (Fig. 4e). Very few gold particles were observed in deeper, undisturbed bone regions. Tagged molecules were not detected in tissue sections from tibia. With the tissue processing and incubation conditions used in this study, no endogenous OPN was immunodetected in interstitial / circulating fluid compartments.

#### Three-day infusions of ALB-DNP

Despite infusion of amounts of ALB-DNP many fold larger than those for OPN, this tagged protein accumulated mainly in the fibrin clot in the hole region. However, some gold particles were also found over the bone matrix near surfaces exposed by the drilling (Fig. 5a). The labeling associated with bone diminished away from the bony hole and no apparent tagged albumin was observed at the surface of calcified bone matrix. Tagged molecules diffused through osteocyte canaliculi but these were not incorporated in the bone matrix (Fig. 5b). Some ALB-DNP was found among the collagen fibrils of osteoid situated in proximity to the 'surgical window' (Fig. 5c).

### Three-day infusions OPN-DNP

Some mineralization foci (Fig. 6a) were labeled with OPN-DNP and the tagged molecules integrated into both osteoid and newly formed bone (Fig. 6b). OPN-DNP was also detected near the drill site along surfaces destined for resorption by osteoclasts or around small bone debris surrounded by macrophages (Fig. 6c). Like endogenous OPN (Fig. 6e), infused OPN-DNP was present in the lamina limitans surrounding osteocytes and coating the bone surface near bone lining cells (Fig. 6d).

### Controls

Only few, randomly distributed gold particles were observed over tissue sections from animals injected with saline and incubated with anti-DNP antibody (data not shown). No significant immunolabeling was seen in contralateral hemimandible and tibial tissues. Incubation of tissue sections with protein A-gold likewise resulted in little background labeling.

## Discussion

The results of this study demonstrate that OPN can be conjugated to DNP and that, at least some OPN transported via the blood circulation or diffusing locally in interstitial fluid can integrate into bone under normal formative conditions or at sites of damage, a result consistent with the study of VandenBos *et al.* (1999).

Moreover, ultrastructural localizations of the tracer documented that exogenous OPN gets incorporated into various compartments of bone where endogenous OPN is believed to accumulate and act (Nanci, 1999). One major advantage of the 'surgical window' approach is that it allows the continuous administration of tracer in amounts that do not exceed the level of endogenous OPN constantly circulating through the tissues in the hemimandible.

Albumin was employed as a control since this serum protein is found in bone but has significantly lower inhibitory effect on hydroxyapatite formation than OPN (Hunter *et al.*, 1994; Robey, 1996). Some ALB-DNP is trapped in bone exposed during drilling but the complexed protein, administered either systemically or locally, does not accumulate to any significant extent into noncollagenous matrix proteins-enriched compartments. The relatively low affinity of this protein for bone is further demonstrated by the relatively modest labeling observed despite the fact that several fold larger quantities of ALB-DNP were administered compared to OPN-DNP. Thus, the behavior of ALB with respect to bone is not significantly changed by dinitrophenylation. This, together with the fact that OPN-

DNP incorporates at sites where endogenous molecules are believed to act, suggests that addition of dinitrophenol residues to a protein does not modify its affinity for bone.

Although it would be anticipated that circulating OPN would be attracted to sites of mineralization, this may not necessarily be the case since it has been suggested that circulating OPN is strongly bound to complement factor H and thus sequestered, and that its activities are limited to their functional ranges (Fedarko et al., 2000). Our results suggest that in our experimental model binding of OPN to factor H must occur over a time frame which allows the molecules to be available for incorporation in bone and/or that OPN prefers a calcifying matrix to complement factor H.

In conclusion, this first ultrastructural study demonstrates that dinitrophenylated OPN can be traced following either systemic or local administration and that the 'surgical window' in the rat hemimandible is an efficient system for investigating the fate of proteins administered at low concentrations per unit time. It also clearly shows that circulating OPN can integrate into bone compartments such as mineralization foci and cement lines. This suggests that the action of this matrix protein extends beyond its microenvironment. Circulating molecules may have an important impact on initial events of bone formation for which few molecules are generally required. The 'surgical window' approach allows to investigating the fate of noncollagenous matrix proteins over time after they are released from the cells that manufacture them, and is applicable to a number of functional studies

such as determining the behavior of different isoforms and evaluating the activity of predicted functional groups.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to Dr.Charles E. Smith for his comments and discussions on the manuscript. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

## Literature Cited

Arshi K, Bendayan M, Ghitescu DL (2000) Alterations of the rat mesentery vasculature in experimental diabetes. *Lab Invest* 80:1171-1184.

Bautista DS, Saad Z, Chambers AF, Tonkin KS, O'Malley FP, Singhal H, Tokmakejian S, Bramwell V, Harris JF (1996) Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: Basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* 29:231-239.

Bendayan M (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-159.

Bendayan M, Zollinger M (1983) Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem* 31:101-109.

Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR (2001) Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:723-749.

Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW (2000) Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem* 275:16666-16672.

Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW (2001) Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res* 7:4060-4066.



Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS (2001) Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280:460-465.

Ghitescu L, Bendayan M (1992) Transendothelial transport of serum albumin: A quantitative immunocytochemical study. *J Cell Biol* 117:745-755.

Goldberg HA, Sodek J (1994) Purification of mineralized tissue-associated osteopontin. *J of Tissue Culture Methods* 16:211-215.

Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem Pharmacol* 300:723-728.

Kessler KF, Barth RF, Wong K-P (1982) Physicochemical studies of dinitrophenylated bovine serum albumin. *Int J Pept Protein Res* 20:73-80.

Little JR, Eisen HN (1967) Preparation of immunogenic 2,4-dinitrophenyl and 2,4,6-trinitrophenyl proteins. In: Williams, C. A. and Chase, M. W. (eds) *Methods in Immunology and Immunocytochemistry*, Vol. 1. Academic Press, Inc., New York, pp 128-133.

Nanci A (1999) Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: Relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 126:256-269.

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

Neiss WF (1984) Electron staining of the cell surface coat by osmium-low ferrocyanide. *H* 80:231-242.

Orsini G, Zalzal S, Nanci A (2001) Localized infusion of tunicamycin in rat hemimandibles: alteration of the basal lamina associated with maturation stage ameloblasts. *J Histochem Cytochem* 49:165-176.

Qin C, Baba O, Butler WT (2004) Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:126-136.

Rittling SR, Chambers AF (2004) Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 90:1877-1881.

Robey PG (1996) Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., and Rodan, G. A. (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diego, pp 155-165.

Schaffner W, Weissmann C (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 56:502-514.

Schreiber G, Urban J, Zahringer J, Reutter W, Frosch U (1971) The secretion of serum protein and the synthesis of albumin and total protein in regenerating rat liver. *J Biol Chem* 246:4531-4538.

Singhal H, Bautista DS, Tonkin KS, O'Malley FP, Tuck AB, Chambers AF, Harris JF (1997) Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin Cancer Res* 3:605-611.

Sodek J, Ganss B, McKee MD (2000) Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:279-303.

Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM (2002) Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 161:2035-2046.

VandenBos T, Bronckers AL, Goldberg HA, Beertsen W (1999) Blood circulation as source for osteopontin in acellular extrinsic fiber cementum and other mineralizing tissues. *J Dent Res* 78:1688-1695.

Vu D-D, Daniel NG, Nanci A (1999) In vivo model for the experimental manipulation of calcified tissues: A surgical approach for accessing the odontogenic organ and associated tissues in the rat incisor. *J Histochem Cytochem* 47:1-14.

Warshawsky H, Moore G (1967) A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 15:542-549.

## Figure Legends

**Figure 1.** (A) Photograph illustrating the separated masseter muscle, the hole (arrows) drilled in the hemimandible and the metal catheter linking the tubing of the osmotic minipump to the hole. (B) Isolated hemimandible with catheter in place. (C) X-ray showing the position of the catheter. (D-G) Light micrographs illustrating the histological appearance of a bone defect 1 day after its creation. The drilling site (DS) contains a granulation tissue with fibrin, bone debris, an inflammatory cell infiltrate, and multinucleated giant cells (MGC). Osteoclasts (Ocl) are frequently apposed to bone surfaces in proximity to the hole. (H,I) Light micrographs illustrating the histological appearance of the drilling site at day 3 after creation of the surgical window. Note that there is already new bone formation along the walls of the bony hole [osteoblasts (Ob)]. A cement line (CL) demarcates the new from the old bone. The new bone is less metachromatic and contains plump, cuboidal osteoblasts with well-developed Golgi regions (G, here appearing as pale paranuclear regions). Bars in A-C = 1 cm, Bar in D = 300  $\mu\text{m}$ , Bars in E, F = 75  $\mu\text{m}$ , Bar in G = 150  $\mu\text{m}$ , Bars in H, I = 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** Electron micrographs illustrating the distribution of endogenous albumin (ALB) and of dinitrophenylated albumin (ALB-DNP) following intravenous injection. (A) Endogenous albumin is abundantly present in the intercellular space (arrows) between osteoblasts and in osteoid, but comparatively less in bone. (B-D) Similarly, tagged albumin

is found in osteoid but very few gold particles are associated with interfibrillar accumulations of noncollagenous matrix (arrowheads), cement lines (CL) or calcified bone matrix. RBC, red blood cell; Ob, osteoblasts. Bars = 500 nm.

**Figure 3.** Immunocytochemical preparations of tibial bone (A-C) following a single intravenous injection of dinitrophenylated osteopontin (OPN-DNP) and (D) for endogenous osteopontin (OPN). (A) The lamina limitans (LL) coating calcified cartilage frequently incorporates tagged molecules. (B) These are also found in the cement line (CL) separating adjacent regions of bone in mixed spicules and (C) in interfibrillar matrix accumulations (arrowheads) among the calcified collagen. (D) Characteristic labeling for osteopontin over a CL and interfibrillar matrix accumulations. N; nucleus; Ob, Osteoblast. Bars = 500 nm.

**Figure 4.** Immunocytochemical preparations of (A,B) tibial and (C) alveolar bone after a 24-hour infusion of high (A-C) and near-physiological doses (D,E) of dinitrophenylated osteopontin (OPN-DNP). (A) Labeling was found on cement lines (CL) separating calcified cartilage from bone and, in some regions, over matrix accumulations (arrowheads) among the calcified collagen fibrils. (B) Dinitrophenylated OPN was occasionally associated with mineralization foci in osteoid. (C) The fibrin clot at the drill site sequesters some of the tagged molecules, particularly when high amounts of tracer are infused. When lower concentrations are administered, tracer accumulate mainly on bone surfaces exposed during drilling either (D) along the wall of the bony hole or (E) slightly below the surface where

adjacent layers of bone sometimes pull apart along cement lines (arrowheads). Such defects allow diffusion of tagged molecules to deeper regions of bone. Bars in A, B = 200 nm, Bars in C-E = 500 nm.

**Figure 5.** Immunocytochemical preparations of alveolar bone after a 3-day infusion of dinitrophenylated albumin (ALB-DNP). (A,C) Tagged albumin is mainly found in the fibrin clot along the walls of the bony hole and in osteoid near the drill sites. Note the absence of labeling on the exposed bone surface (arrowheads). (B) Some tracer diffuses along osteocyte canaliculi. Bars = 500 nm.

**Figure 6.** Electron micrographs of alveolar bone after 3-day infusions of near-physiological doses of dinitrophenylated osteopontin (OPN-DNP) (A-D) immunolabeled for dinitrophenol and (E) endogenous osteopontin. (A) Tagged molecules get incorporated in new bone formed during the infusion interval at mineralization foci, (B) cement lines (CL) and (D) lamina limitans (LL) associated with bone lining cells (BLC). (C) They also coat bone debris at the drill site. (E) Endogenous osteopontin typically accumulates in cement lines between adjacent layers of bone and to a lesser extent in the lamina limitans surrounding osteocytes (Oc) lacunae. Ob; osteoblasts. Bars = 500 nm.

**TABLE 1**

## Experimental Outline

Experimental Agent	Method of Administration	Range	Amount	Time of Sacrifice
<sup>(a)</sup> ALB-DNP	i.v.	Near-physiological <sup>(c)</sup>	127 mg	2-8 h
ALB-DNP	Minipump	Near-physiological	300 µg/h	3 days
<sup>(b)</sup> OPN-DNP	i.v.	High	25 µg	24 h
OPN-DNP	Minipump	Near-physiological	0.52 µg/h	1 day
OPN-DNP	Minipump	High	3.54 µg/h	1 day
OPN-DNP	Minipump	Near-physiological	0.32 µg/h	3 days

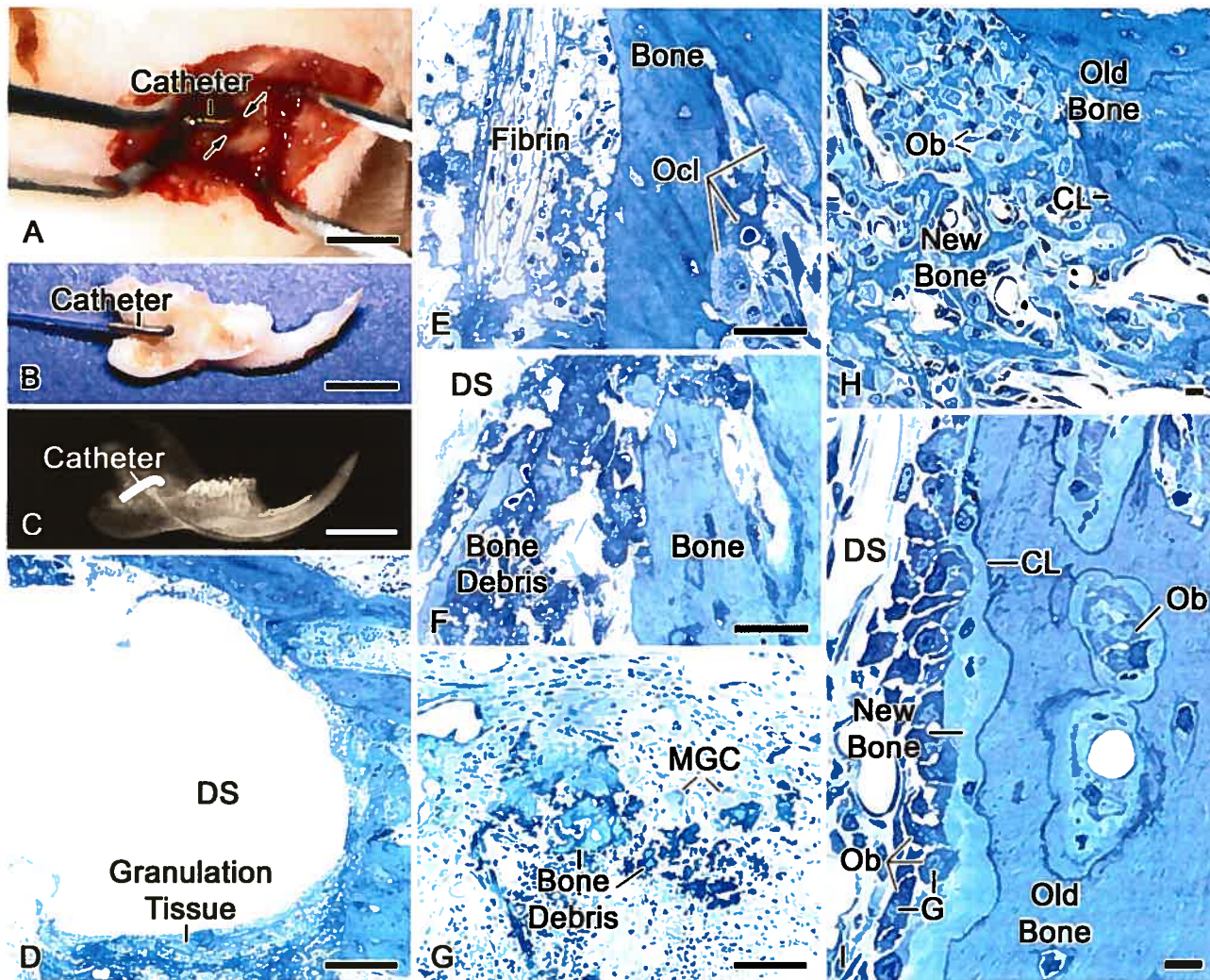
ALB concentration in rat serum: 29.2 mg/ml (Schreiber et al., 1971).

OPN concentration in human serum: 1) total OPN: 439 ng/ml (Fedarko et al., 2001), 2) free OPN: 33-47 ng/ml (Bautista et al., 1996; Singhal et al., 1997).

<sup>(a)</sup> The protein concentration of ALB-DNP complexes was determined to be 20 mg/ml using the method of (Schaffner and Weissmann, 1973).

<sup>(b)</sup> The concentration of OPN-DNP complex was estimated at 50 µg/µl based on yields obtained preparing ALB-DNP.

<sup>(c)</sup> For single systemic injections, near physiological doses do not exceed the total amount of endogenous protein present in blood. For local delivery, the infusion rate per hour does not exceed estimated amounts passing through the tissues in the blood.



*Figure 1*



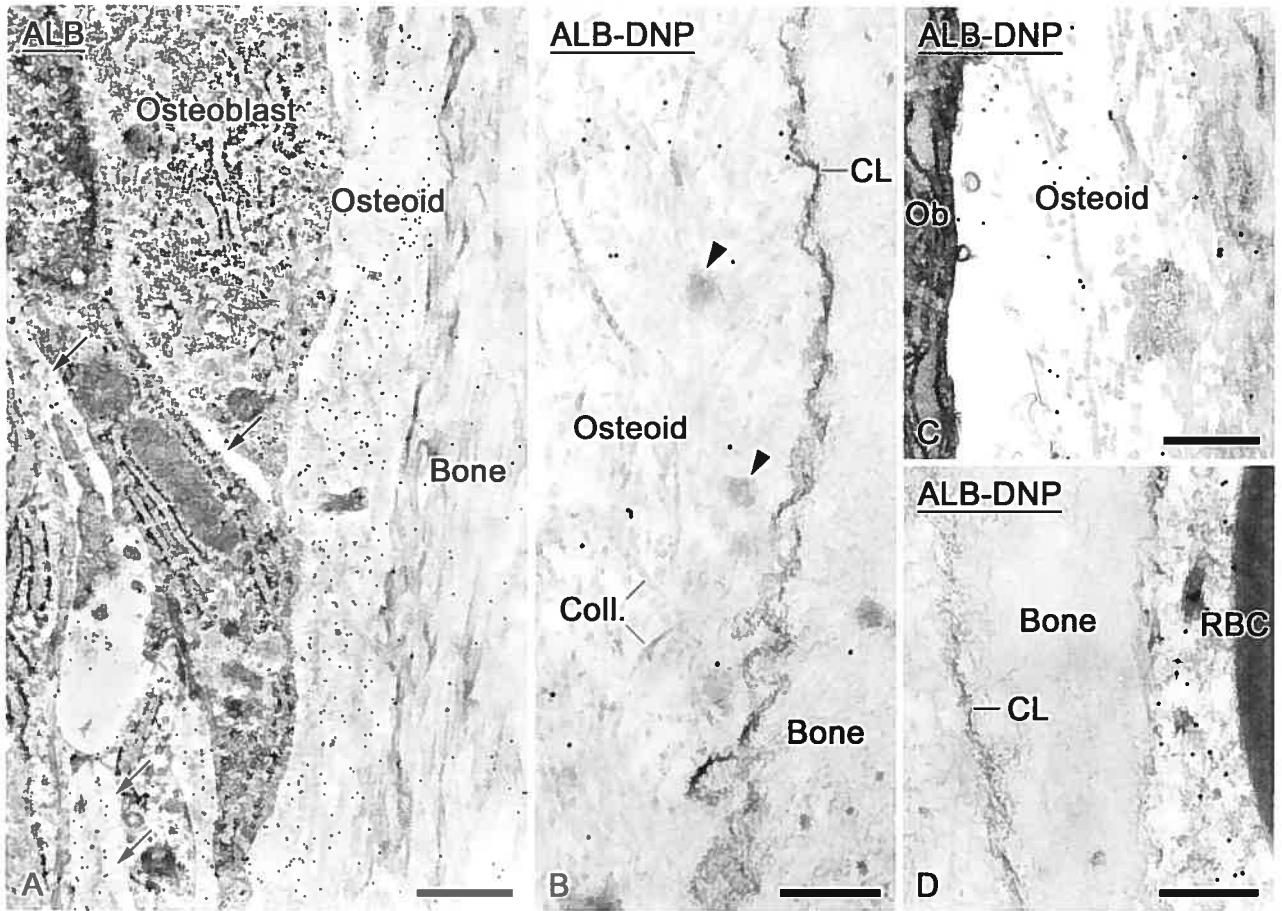


Figure 2

© Wazen et al. 2006

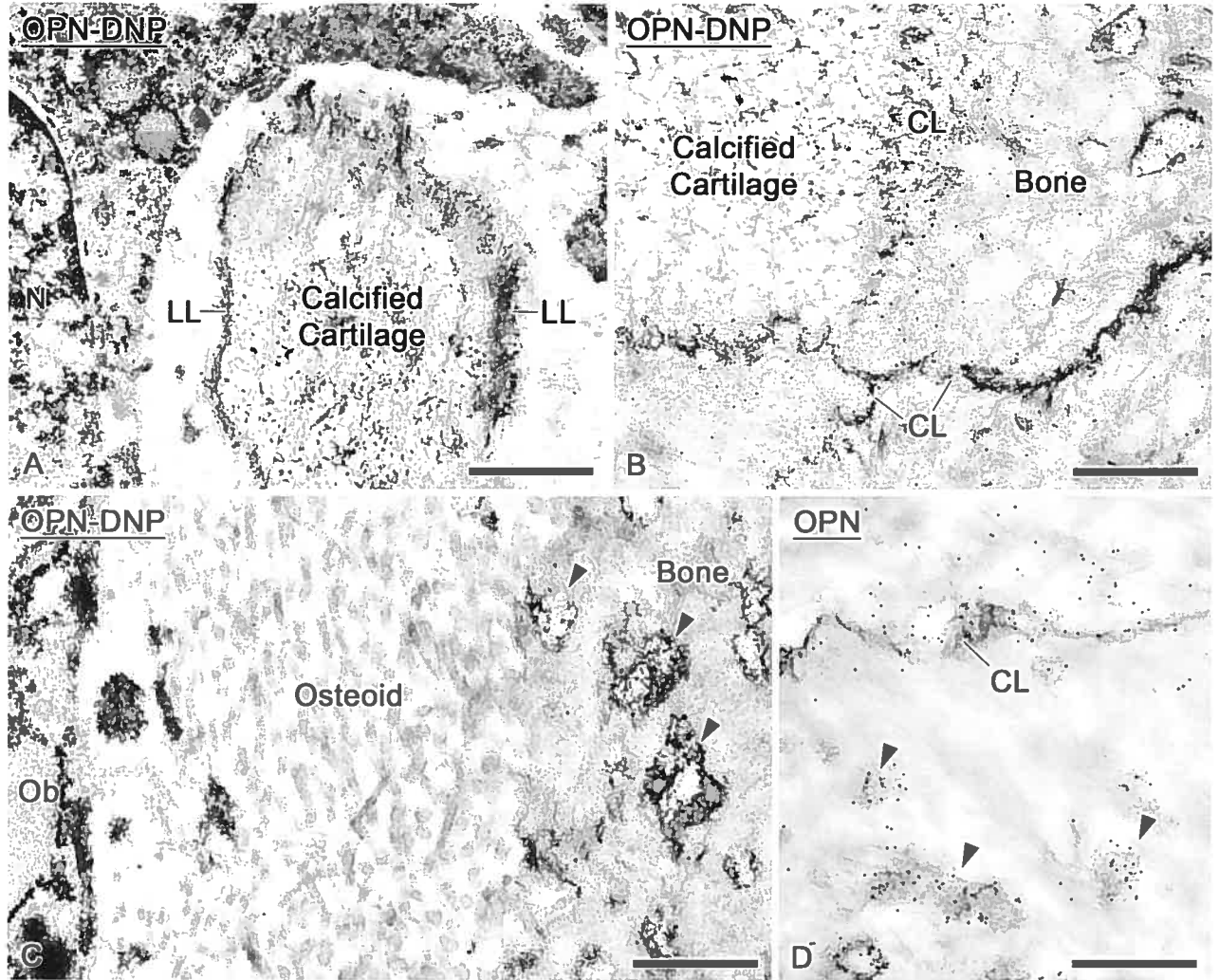


Figure 3

© Wazen et al. 2006

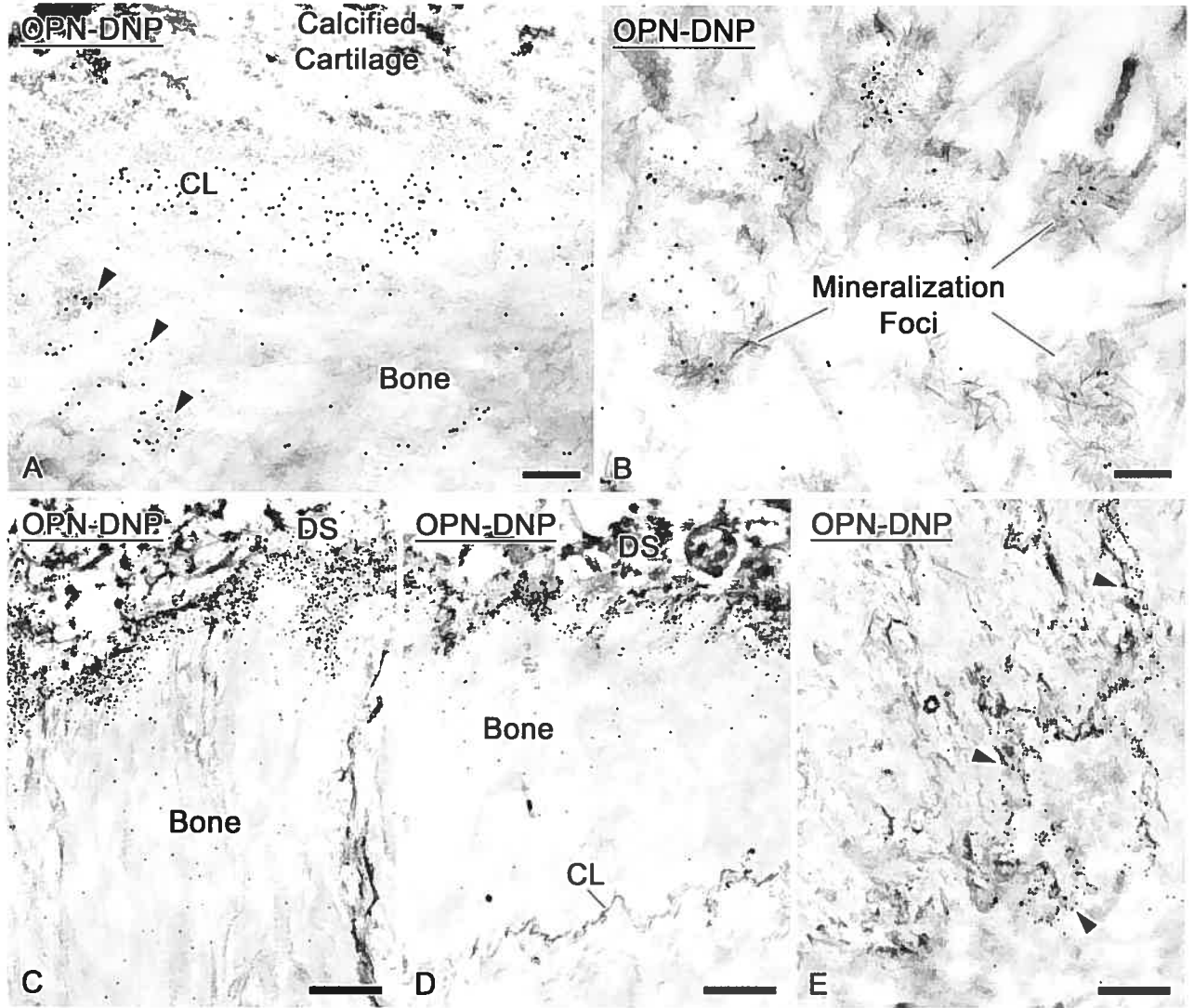
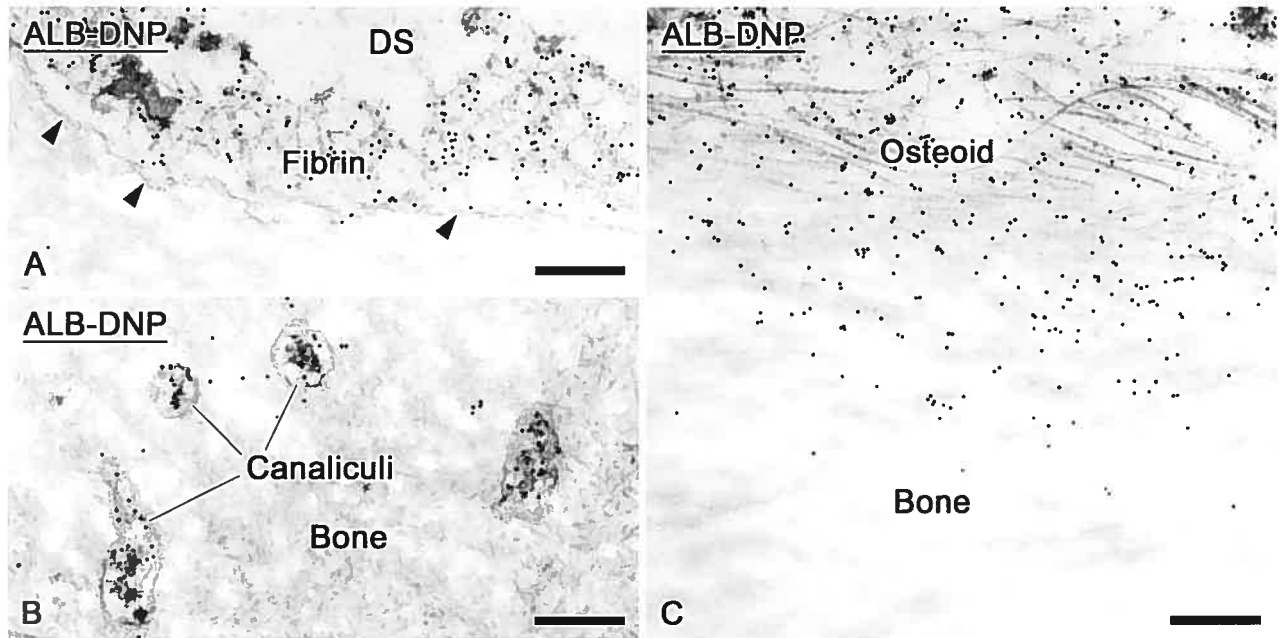


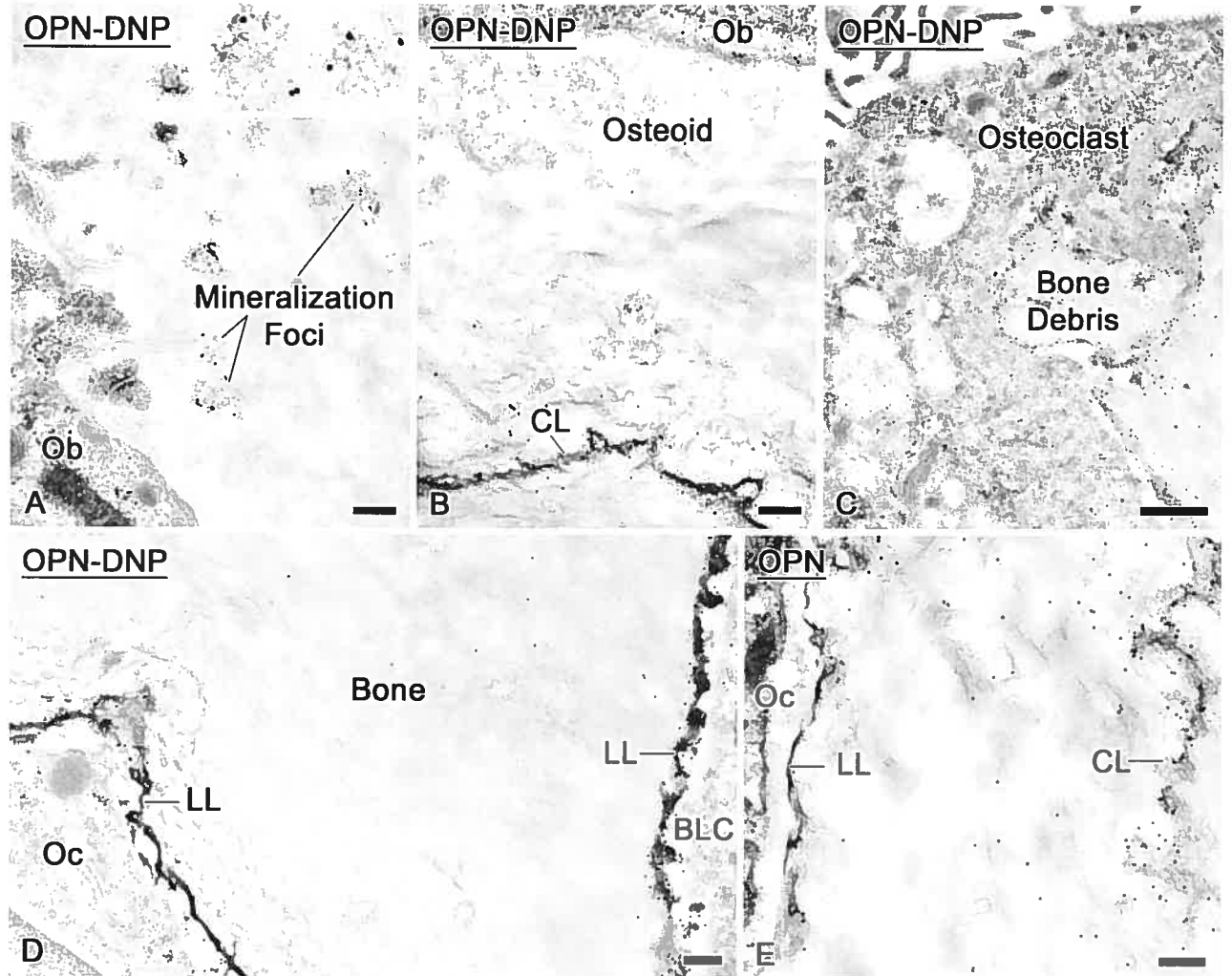
Figure 4

© Wazen et al. 2006



*Figure 5*

© Wazen *et al.* 2006



*Figure 6*

© Wazen *et al.* 2006

## *Chapitre 3*

# **In Vivo Functional Analysis of Polyglutamic Acid Domains in Recombinant Bone Sialoprotein**

Reproduced, with permission, from *Rima M. Wazen, Coralee E. Tye, Harvey A. Goldberg,*

*Graeme K. Hunter, Charles E. Smith and Antonio Nanci*

*Journal of Histochemistry & Cytochemistry 55. 1: 35-42 (2007)*

## Sommaire

La sialoprotéine osseuse (BSP) est présente dans les tissus minéralisés où elle peut s'associer aux cristaux d'hydroxyapatite (HA). *In vitro*, il a été suggéré que cette protéine non-collagénique (PNC) régulerait la formation des HA par la présence de deux séquences poly [E]. Puisque les effets *in vitro* ne reflètent pas toujours ce qui se passe dans le corps, nous avons évalué *in vivo* la contribution de ces deux domaines aux propriétés de liaison de la BSP recombinante produite par des cellules procaryotiques. Une forme native (prBSP<sub>E</sub>) et une mutante (prBSP<sub>A</sub>), dont les domaines riches en acides glutamiques ont été remplacés par des séquences de polyalanine (poly [A]), ont été conjuguées au dinitrophénol (DNP). Les deux préparations, incluant la protéine intacte et quelques produits de dégradation, ont été administrées dans une fenêtre chirurgicale grâce au système de la mini-pompe osmotique. L'immunomarquage de ces deux protéines a été réalisé à l'aide d'anticorps dirigés contre le DNP. La prBSP<sub>E</sub>-DNP a été retrouvé aux surfaces minéralisées exposées durant la chirurgie ainsi que dans certains canalicules d'ostéocytes. Très peu de particules d'or ont été détectées lors de l'infusion de la prBSP<sub>A</sub>-DNP. Les études quantitatives ont permis de déterminer que la différence de marquage entre les deux préparations protéiques était statistiquement significative (prBSP<sub>E</sub>-DNP :  $5.04 \pm 0.73$  particules/ $\mu\text{m}^2$ , prBSP<sub>A</sub>-DNP :  $1.37 \pm 0.35$  particules/ $\mu\text{m}^2$ ). Ces résultats démontrent, pour la première fois, que ces domaines de poly [E] influencent la capacité de liaison de la prBSP<sub>E</sub> aux surfaces présentant une matrice minéralisée constituée d'un mélange de protéines et de minéraux et pourraient donc aussi médier l'interaction de la BSP native à l'os.

In Vivo Functional Analysis of Polyglutamic Acid Domains in Recombinant Bone Sialoprotein

Rima M. Wazen<sup>1</sup>, Coralee E. Tye<sup>2</sup>, Harvey A. Goldberg<sup>2</sup>, Graeme K. Hunter<sup>2</sup>, Charles E. Smith<sup>1</sup> and Antonio Nanci<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada <sup>2</sup>CIHR Group in Skeletal Development and Remodeling, School of Dentistry, University of Western Ontario, London, ON, Canada

Address correspondence to:

Antonio Nanci

Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials

Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal

P.O. Box. 6128, Station Centre-Ville

Montreal, QC, Canada

H3C 3J7

Phone: (514) 343-5846

Fax: (514) 343-2233

Email: 



## Abstract

Bone sialoprotein (BSP) is an anionic phosphoprotein expressed in mineralizing connective tissues that binds to hydroxyapatite and nucleates its formation *in vitro*. Two polyglutamic acid regions (poly [E]) are believed to participate in these activities. The aim of this study was to evaluate the contribution of these acidic regions to the binding of prokaryote recombinant BSP (prBSP<sub>E</sub>) within an actual *in vivo* environment. Full-length prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>E</sub> in which the poly [E] domains were replaced by polyalanine (prBSP<sub>A</sub>) were tagged with dinitrophenol (DNP). Tagged preparations comprised intact molecules and some fragmented forms. They were infused through a surgically created hole in the bone of rat hemimandibles and detected using immunogold labeling with anti-DNP antibodies. prBSP<sub>E</sub>-DNP was consistently immunodetected along exposed mineralized bone surfaces and osteocyte canaliculi at the surgical site. Few gold particles were observed on these surfaces when prBSP<sub>A</sub>-DNP was infused. Quantitative analyses showed significant differences in labeling between prBSP<sub>E</sub>-DNP ( $5.04 \pm 0.73$  particles/ $\mu\text{m}^2$ ) and prBSP<sub>A</sub>-DNP ( $1.37 \pm 0.35$  particles/ $\mu\text{m}^2$ ). These results indicate that poly [E] domains influence binding of prBSP<sub>E</sub> to surfaces presenting a mixture of mineral and proteins bathed by tissue fluids, and suggest that they may similarly mediate the interaction of native BSP in the bone environment.

KEYWORDS: Bone sialoprotein, Polyglutamic acid, Mineralized matrix, Binding capacity, Immunocytochemistry

## Introduction

In vertebrates, the majority of calcified tissues have a collagen type I framework which accommodates a mineral phase consisting of carbonated apatite. Non-collagenous proteins (NCPs) are dispersed throughout this framework (reviewed in Nanci 1999) and although they represent minor constituents, they exert major regulatory influences on the deposition of mineral and the activity of the cells responsible for the formation of the tissue (Robey 2002; Boskey 2003).

Bone sialoprotein (BSP) is a NCP member of the Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein (SIBLING) family of proteins (Fisher et al. 2001) whose pattern of expression is temporally and spatially associated with initial mineralization events (Chen et al. 1991a, 1991b). Like other members of this family, it contains an integrin binding site and numerous posttranslational modifications, including N- and O-linked glycosylation, tyrosine sulfation, and serine and threonine phosphorylation (Ganss et al. 1999). These posttranslational additions are believed to mediate matrix-matrix and cell-matrix events, for example, phosphorylation influences crystal growth while glycosylation can affect cell attachment (reviewed in Qin et al. 2004).

Structural characterizations of BSP and in vitro assays have revealed two glutamic acid rich regions (poly [E]) in the N-terminal half of the molecule (Hunter and Goldberg 1993, 1994;

Harris et al. 2000; Tye et al. 2003). These domains are believed to be partially responsible for the nucleating activity of BSP and could also be involved in the binding capacity of BSP to hydroxyapatite (HA) (Oldberg et al. 1988; Stubbs, III et al. 1997; Goldberg et al. 2001).

Our current understanding of the properties, activities, and molecular structure of BSP derives mainly from in vitro assays and in silico predictions. The objective of this study was to test, in the biological environment of the body, the hypothesis that poly [E] domains contribute to the binding capacity of BSP to mineral. These poly [E] domains were mutated for polyalanine (poly [A]) in BSP because L-alanine has been shown to have no affinity for mineral (Moreno et al. 1984). Dinitrophenol-tagged molecules were infused through a hole in the mandibular bone (Nanci et al. 2004), and their presence along surgically exposed bone surfaces that present a mixture of organic matrix and apatite mineral, was revealed using quantitative colloidal gold immunolabeling.

## Materials and Methods

### Site-directed Mutagenesis

Full-length recombinant rat BSP (prBSP<sub>E</sub>) and a mutated form referred to herein as prBSP<sub>A</sub> were both prokaryotically expressed and purified as described in Tye et al. (2003). For prBSP<sub>A</sub>, the two poly [E] domains on prBSP<sub>E</sub> were replaced by poly [A] groups by site-directed mutagenesis (Figure 1). For both recombinant molecules, the signal sequence at the N-terminal was removed and replaced by two vector-derived amino acids. A thrombin-cleavable pentahistidine site was added to the carboxyl-terminus of the cDNA for purification purposes.

### Dinitrophenylation

Full-length prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> were tagged with dinitrophenol (DNP) on lysine groups (Figure 1) using the method of Little and Eisen (1967). Labeling efficiency was estimated at 38% or 5 of the 13 lysine groups available in prBSP<sub>E</sub> or prBSP<sub>A</sub> based on yields obtained when preparing albumin-DNP (Nanci et al. 2004). At maximum labeling, 5 DNP groups would increase the base molecular mass of prBSP<sub>E</sub> or prBSP<sub>A</sub> by no more than 835 daltons.

## **SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Western Blotting**

prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> (with and without DNP tag) were solubilized into sample preparation buffer containing 62.5 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 15% glycerol, 40 mM dithiothreitol, and 0.005% bromophenol blue (final concentrations). Approximately 5 µg of protein was applied to individual lanes of mini-gel format (8.6 cm x 6.8 cm x 1 mm) 12% polyacrylamide slab gels. Broad range molecular mass proteins (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) were also loaded. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS was carried out under discontinuous conditions as described by Laemmli (1970). Silver staining of some gels was done using the Blum method described by Rabilloud et al. (1994). For other gels, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (BA-85; Schleicher & Schuell, distributed by Mandel Scientific Company Inc., Guelph, ON, Canada) and probed with anti-DNP antibody (1:10,000; Dako Corp, Carpinteria, CA) or anti-BSP antibody (1:500; LF-100; courtesy of Dr. L.W. Fisher, NIDCR, NIH, Bethesda, MD) as described previously (Chen et al. 1995). Detection was performed with a secondary goat anti-rabbit antibody IgG-peroxidase conjugate (1:30,000; Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) and using the ECL plus™ Western blotting detection system (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) as recommended by the manufacturer. Molecular mass markers were visualized by staining with Ponceau S (Sigma-Aldrich Canada Ltd).

## **Surgical Procedure**

Holes were surgically created in the bone on the buccal aspect of the right hemimandible of male Wistar rats weighing  $100 \pm 10$  g (Charles Rivers Canada; St-Constant, QC, Canada), as previously described (Vu et al. 1999). Alzet osmotic minipumps (model 2001D, 200  $\mu$ L, 8.0  $\mu$ L/h; Alza Corporation, Palo Alto, CA) filled with prBSP<sub>E</sub>-DNP or prBSP<sub>A</sub>-DNP were slipped under the skin of the back of the animal. Estimated delivery rate was 0.6  $\mu$ g/h over 1 day, for a total of 14  $\mu$ g of protein infused into each rat. Three-day Alzet osmotic minipumps (model 1003D, 100  $\mu$ L, 1.0  $\mu$ L/h; Alza Corporation) filled with prBSP<sub>E</sub>-DNP were also placed in some animals. Estimated delivery rate was 0.35  $\mu$ g/h, for a total of 25  $\mu$ g of protein delivered. Negative control rats were sham-operated or infused with 0.9% sodium chloride (JT Baker, Phillipsburg, NJ). Each experimental group contained 3 animals. The rats received an injection of Temgesic<sup>®</sup> (Buprenorphine hydrochloride, Reckitt and Colman, Hull, UK) and following surgery, they were fed with soft food containing Temgesic<sup>®</sup>. X-rays were taken to verify the positioning and the stability of catheters. All experimental protocols and animal handling described above were done in accordance with guidelines followed by the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of Université de Montréal.

## **Tissue Processing**

Animals were anesthetized with chloral hydrate (0.4 mg/g body weight; Sigma-Aldrich Canada Ltd) and fixed by intracardiac perfusion with 4% paraformaldehyde (BDH, Inc,

Toronto, ON, Canada) and 0.1% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) buffered with 0.08M sodium cacodylate (Electron Microscopy Sciences) containing 0.05% calcium chloride (Sigma-Aldrich Canada Ltd), pH 7.2, for 20 min. Treated and control contralateral hemimandibles, as well as knees, were dissected and further fixed by immersion in the same fixative overnight at 4°C. Tissues were decalcified for 14 days at 4°C in 4.13% disodium ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA; Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) (Warshawsky and Moore 1967). Decalcified tissues were washed for 24h in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated in graded ethanol, embedded in LR White resin (London Resin Company; Berkshire, UK), and polymerized for 48h at 58°C.

### **Immunocytochemistry**

Light microscopic observations were done with 1 µm semi-thin sections cut with glass knives on a Reichert Jung Ultracut E ultramicrotome (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany) and stained with toluidine blue. Ultrathin sections 80-100 nm in thickness were cut with a diamond knife and transferred onto Formvar<sup>®</sup>-coated (polyvinyl formate) (Meca Ltée, Montréal, QC, Canada) 200-mesh nickel grids. Immunolocalizations of proteins were done as previously described (Nanci et al. 1996) using the postembedding colloidal gold method (review by Bendayan 1995). Anti-DNP antibody (1:200, 3 hours; Dako Corp) was used to reveal the DNP-protein complexes and anti-BSP antibody (1:500, 3 hours; LF-100; courtesy of Dr. L.W. Fisher) to detect both endogenous and tagged molecules. All grids



were stained with 4% aqueous uranyl acetate for 8 min and with lead citrate for 2 min, and examined in a transmission electron microscope (80 kV, JEM-2010, JEOL, Tokyo, Japan).

### **Quantification of Immunolabeling**

Random fields of exposed bone surfaces at the periphery of surgical areas were photographed at x15,000 magnification in the transmission electron microscope. A rectangular grid representing 1  $\mu\text{m}$  height x 2  $\mu\text{m}$  width (2  $\mu\text{m}^2$ ) were superimposed over appropriately scaled printed micrographs, and the number of gold particles falling within the rectangle was scored. Seventy-two rectangular areas were counted for prBSP<sub>E</sub>-DNP, 51 for prBSP<sub>A</sub>-DNP, and 14 for sham-operated animals. Subsequent analyses of data were done using Version 7.1 of Statistica for Windows (Statsoft Inc., Tulsa, OK) and results expressed as means  $\pm$  standard deviations. Particle counts for each group did not follow normal distributions and the nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA and median test followed by multiple comparisons of mean ranks for all groups were used to define levels of significance;  $p < 0.05$  were considered significant.

### **Molecular Modeling**

Molecular modeling (Figure 1) was done using Version 2.05 of Alchemy 2000 for Windows (a simplified version of the SYBYL software package supplied by Tripos Inc., St. Louis, MO; SYBYL is still sold commercially but the Windows based program is not). Full length sequences for prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub>, both 314 amino acid residues in length, were

entered into the protein sequence editor and modeled as random coils using program defaults (filled valences and hydrogen atoms present in each model). These random coil models reflected possible folding arrangements in solution based on the inherent physicochemical properties of the amino acids that comprise prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> (Figure 1), and are consistent with existing NMR data indicating that BSP is unstructured in solution (Fisher et al. 2001). We chose to represent prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> in an extended, rather than a compact, random coil arrangement to facilitate illustration of the location of certain amino acid groups like lysine across the length of the protein molecule (Figure 1).

## Results

Schematic random coil models of prBSP<sub>E</sub> and its alanine-substituted mutant form (prBSP<sub>A</sub>) are shown in Figure 1. Both prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> contain 13 lysine groups in identical positions (numbered 1-13 in Figure 1A) any one or more of which can react with DNP during the dinitrophenylation procedure. Eleven (85%) of the lysines are located in the N-terminal half of the molecule (Figure 1A), and five of these (45%) are within the same globular domain where the two polyglutamic acid motifs were replaced by polyalanine motifs in prBSP<sub>A</sub> (Figures 1B, 1C). As expected, substitution of 17 glutamic acid residues by an equal number of alanine residues alters both the isotopic molecular mass (from 34,854 to 33,868 daltons) and electronegativity (pI rises from 4.20 to 4.38) of the protein. At pH 7.4, prBSP<sub>E</sub> is estimated to carry a charge of -55.7 whereas prBSP<sub>A</sub> would have a charge of -38.2. The models shown in panels B and C of Figure 1 suggest that these differences in residue type and charge do not, however, cause major changes in the conformation of the protein in solution at least in terms of extended random coil models.

Silver stained SDS-PAGE gels showed that uncomplexed prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> exhibit a major bands near 66 kDa (Figure 2), a finding consistent with the previously reported apparent molecular mass of these recombinant proteins (Tye et al. 2003). Some very faintly stained bands, that likely represent degradation products, were also detected at lower molecular mass. Consistent with the small differential in deduced molecular mass and

electronegativity, the main prBSP<sub>A</sub> band migrated slightly lower than the one for prBSP<sub>E</sub> (Figure 2). The silver-staining pattern was similar after dinitrophenylation, indicating that the addition of DNP residues did not substantially alter the electrophoretic mobility of these proteins. On immunoblots, anti-BSP antibody reacted with both DNP-complexed and uncomplexed versions of prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> (Figure 2). The major staining was observed near 66 kDa. Noteworthy, most of the lower molecular mass bands reacted with the anti-BSP antibody indicating that they represent fragments of the recombinant proteins and not unrelated contaminants (Figure 2). Except for the presence of a few, faintly reactive higher molecular mass bands which likely result from aggregation during dinitrophenylation and some other lower molecular mass bands around 31 kDa, the staining patterns before and after tagging were similar, indicating no effect on the antigenicity (Figure 2). Immunoblots with anti-DNP revealed that the most intense staining was also associated with the major bands near 66 kDa (Figure 2). The higher and lower molecular mass bands were also reactive, indicating they also contain dinitrophenol residues.

To investigate binding potential, mineralized bone surfaces at the surgical site were continuously exposed to either prBSP<sub>E</sub>-DNP or prBSP<sub>A</sub>-DNP by infusion for 24 hours. The reason for tagging the two forms of prBSP with DNP was to be able to discriminate infused prBSP from endogenous BSP. Tagged molecules were immunodetected mainly over the surface layer of bone surrounding the drill site (Figure 3A). Dinitrophenylated proteins were occasionally found in deeper regions along the surface of microfractures created during the surgical procedure. On the other hand, fewer gold particles were associated with

the bone matrix when prBSP<sub>A</sub>-DNP was infused (Figure 3B). Incubation with anti-BSP showed labeling along exposed bone surfaces as well as at sites where endogenous molecules normally concentrate, such as cement lines and interfibrillar matrix accumulations (Figure 3C). In animals infused for 3 days with prBSP<sub>E</sub>-DNP, some gold particles were also found over matrix accumulations in newly formed bone near the drill site (Figure 4). Hardly any gold particles were observed over tissue sections from sham-operated animals when incubated with anti-DNP antibody (Figure 3D). No significant immunolabeling was seen over bone in contralateral hemimandibles or in the tibiae of animals infused with prBSP<sub>E</sub>-DNP or prBSP<sub>A</sub>-DNP (data not shown).

Quantitative analyses following 1-day infusions indicated labeling indices of  $5.04 \pm 0.73$  gold particles/ $\mu\text{m}^2$  of exposed bone surface for prBSP<sub>E</sub>-DNP and  $1.37 \pm 0.35$  gold particles/ $\mu\text{m}^2$  of exposed bone surface for prBSP<sub>A</sub>-DNP. The background level was evaluated by incubating sham-operated animals with anti-DNP and resulted in a labeling index of  $0.14 \pm 0.23$  gold particles/ $\mu\text{m}^2$  of exposed bone surface. The difference in labeling between prBSP<sub>E</sub>-DNP and prBSP<sub>A</sub>-DNP as well as between both these proteins and background was statistically significant ( $p < 0.05$ ) (Figure 5).

## Discussion

Pertinent functional information can be derived from in vitro assays but, ultimately, results must be validated in vivo where the physiological environment is complex. In this context, a recent study on the binding of salivary proteins to HA has questioned the biological relevance of adsorption data obtained from in vitro studies using single proteins (Yin et al. 2005). To our knowledge, our investigation is the first study attempting to evaluate in a multifactorial animal model the effects of altering functional domains on the binding capacity of a prokaryote recombinant form of BSP to a mineralized substrate. The results show that substitution of poly [E] domains by poly [A] has a major impact and reduces by 73 % its binding to mineralized bone. Our results do not allow distinguishing whether the effect is on binding to the mineral or to the organic phase because the tissues were decalcified for histological processing. However, retention of tagged molecules in such preparations can only occur if they are in close proximity to bulk endogenous organic matrix constituents to which they are cross-linked by the fixative. In addition, BSP has been shown to interact with collagen (Fujisawa and Kuboki 1992; Tye et al. 2005). Organic constituents are very closely associated to the mineral and can therefore influence any interaction with it. These possibilities must be taken into consideration when investigating the function and mineral binding capacity of proteins within the biological environment of the organism.

There have been *in vitro* studies investigating the role of poly [E] domains in the nucleating activity and mineral binding capacity of BSP (Hunter and Goldberg 1994; Stubbs, III et al. 1997; Goldberg et al. 2001; Tye et al. 2003). In a recent report, it was demonstrated that the replacement of both contiguous poly [E] domains with poly [A] resulted in a significant reduction, but not complete loss, of the nucleation capacity of prBSP<sub>E</sub> (Tye et al. 2003). Similarly, synthetic homopolymers of poly [E] do not completely inhibit the binding of native BSP to HA (Goldberg et al. 2001). It was therefore suggested that additional domains or specific conformational motifs on BSP are involved in HA binding and nucleation (Tye et al. 2003). The fact that prBSP<sub>A</sub> still exhibits some binding to mineralized bone matrix (Figure 5) is consistent with an implication of other molecular determinants on the protein backbone in the interaction of BSP with HA.

Immunoblotting indicates that both tagged protein preparations comprised the intact molecules (major band near 66 kDa) but also some smaller and higher molecular mass proteins. However, these must clearly represent minor constituents because they are barely visible on silver stained gels. This is consistent with a previous report that similar prokaryote recombinant BSP preparations had an apparent 99%+ purity based on amino analysis and mass spectrometry (see Tye et al. 2003). Furthermore, it is doubtful that any of them represent contaminating bacterial products since most of the bands are recognized by the anti-BSP antibody. Therefore, the low molecular mass protein bands most likely correspond to degradation products, present in very low amounts in the original recombinant protein preparations and/or that formed during handling of the purified protein

for biochemical analyses and dinitrophenylation. In the case of the high molecular mass ones, they probably represent aggregates that formed during the dinitrophenylation process since these are not present in the uncomplexed proteins. Noteworthy, the anti-DNP immunoblots show that both prBSP<sub>E</sub>-DNP and prBSP<sub>A</sub>-DNP have very similar banding patterns, suggesting that both preparations have been similarly affected. The presence of more than one labeled form in infusates complicates interpretation of the results since it is not possible to unequivocally attribute the observed difference in binding solely to the substitution of poly [E] by poly [A] domains. However, together the data strongly suggests that the differential binding observed has a limited contribution from these other minor dinitrophenylated BSP products and is likely due to the basic difference between the two proteins, that is, substitution of poly [E] domains by poly [A] which interestingly does not seem to affect significantly breakdown. Irrespectively, the data unequivocally demonstrates that the two preparations behave differently in an in vivo environment.

Based on the equal number of lysine residues present in prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> and the suggestion from random coil modeling that both proteins share similar inherent conformations in solution, there is little reason to suspect that the differential binding observed would be due to differences in degree of dinitrophenylation, especially considering that the disparity in binding between prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> was almost 80%. Another possible cause would be the charge differential between prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub>. At physiological pH, the estimated charge ratio of prBSP<sub>E</sub>/prBSP<sub>A</sub> is about 1.45, whereas the prBSP<sub>E</sub>/prBSP<sub>A</sub> binding ratio determined in this study was 3.69. If the observed difference



in binding were due solely to charge, then both the binding ratios and charge ratios should be identical. Since the ratios actually differ by over 2.5 X, it must include other components such as the nature of the amino acid residues that make up the binding sites.

As previously demonstrated with osteopontin-DNP, NCPs infused through a minipump effectively integrate into bone compartments where endogenous proteins are normally found (Nanci et al. 2004). Detection of tagged prBSP<sub>E</sub> in the interfibrillar matrix accumulations following a 3-day infusion shows that recombinant BSP can also integrate into newly formed bone. The abundant immunodetection of endogenous BSP along exposed surfaces demonstrates that the observed binding of tagged molecules onto these surfaces is a normal event and is not induced by dinitrophenylation or by the infusion process itself. The body seems to respond to bone damage by quickly sequestering and accumulating NCPs, such as BSP and osteopontin (Nanci et al. 2000, 2004), on exposed mineralized surfaces. Absence of osteoblasts on these surfaces, paucity of inflammatory cells such as macrophages (McKee and Nanci 1996) in their immediate vicinity, and incorporation of tagged molecules administered at a distance indicate that circulating molecules, from blood or the tissue fluid microenvironment, are likely sources for these proteins. Indeed, it has been proposed that circulating NCPs also contribute to the formation of cement lines at natural bone interfaces (Nanci et al. 2000, 2004). The abundance of endogenous BSP also suggests that the native, posttranslationally modified molecule may have a higher affinity for exposed bone matrix than either version of the recombinant proteins used in this study. In this context, it has been shown that although

posttranslational modifications are not necessary for the nucleating activity of BSP, they increase the potency of the molecule (Tye et al. 2003).

No binding of either prBSP<sub>E</sub> or prBSP<sub>A</sub> was observed at a distance away from the infusion site. This may reflect the possibility that (1) no naturally exposed bone surfaces were available and (2) concentrations may be high near the site of infusion but reach levels below the detection limit as the molecules diffuse away. Alternatively, molecules may bind to complement Factor H and thus be sequestered to limit their functional ranges (Fedarko et al. 2000). Our results suggest that if prBSP binds to Factor H, this must occur over a time frame which allows the molecules to also interact with the exposed mineralized matrix or that the protein prefers a calcified matrix (Nanci et al. 2004). Interestingly, Factor H is known to bind sialic acid-containing proteins (Meri and Pangburn 1994; Fedarko et al. 2000; Pangburn et al. 2000). The potential sequestration of prBSP by Factor H would therefore imply that sialic acid or other post-translational modifications may not be necessary for this interaction.

Infusion of DNP-tagged molecules through surgically created holes in bones permits experiments to be carried out at near physiological concentrations, to distinguish the administered molecules from endogenous ones, and to follow them over time (Nanci et al. 2004). This approach can be applied to a number of functional studies such as determining the behavior of different isoforms and evaluating the activity of predicted functional groups and bioactive peptides.

In conclusion, the results of this study show that substitution of poly [E] by poly [A] domains reduces the ability of a preparation of prBSP comprising intact molecules and fragments to bind and accumulate at exposed surfaces of mineral/organic matrix bone composite in the real tissue microenvironment. It should be noted that in vivo the behavior of a protein will not only depend on its physicochemical properties (e.g. affinity for HA) but will also reflect the modulation of these properties by the various tissue components it is exposed to. For example, the effect of proteins on mineralization can vary depending on whether they are in solution or bound to collagen (Saito et al. 1998, 2000). Also, affinity of a protein for HA can be enhanced through interactions with other proteins (Yin et al. 2005), as would be found in the organic matrix generally associated with HA and in tissue fluids. In addition, it has recently been shown that adsorption of bovine serum albumin to HA is influenced by the degree of complexing of calcium ions to the protein (Kandori et al. 2005), a factor which is surely pertinent in vivo. Indeed, regional interactions may be one way by which proteins exert multiple behaviors. The approach we have used here offers a simple system in which amino acid motifs, posttranslational modifications and derived peptides can be tested for function and therapeutic potential in an environment that reflects the complex nature of the body.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to Dr. Pierre Moffatt and Dr. Henry C. Margolis for critical reading of the manuscript, Ms Micheline Fortin for assistance with sectioning, and Ms Sylvia Francis Zalzal for preparing the protein A-gold complexes. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

## Literature Cited

Bendayan M (1995) Colloidal gold post-embedding immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 29:1-159

Boskey AL (2003) Biomineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 44:5-9

Chen J, Shapiro HS, Wrana JL, Reimers S, Heersche JNM, Sodek J (1991a) Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by *in situ* hybridization. *Matrix* 11:133-143

Chen J, Zhang Q, McCulloch CAG, Sodek J (1991b) Immunohistochemical localization of bone sialoprotein in foetal porcine bone tissues: Comparisons with secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) and SPARC (osteonectin). *Histochem J* 23:281-289

Chen W-Y, Nanci A, Smith CE (1995) Immunoblotting studies on artifactual contamination of enamel homogenates by albumin and other proteins. *Calcif Tissue Int* 57:145-151

Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young MF, Fisher LW (2000) Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem* 275:16666-16672

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS (2001) Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280:460-465

Fujisawa R, Kuboki Y (1992) Affinity of bone sialoprotein and several other bone and dentin acidic proteins to collagen fibrils. *Calcif Tissue Int* 51:438-442

Ganss B, Kim RH, Sodek J (1999) Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:79-98

Goldberg HA, Warner KJ, Li MC, Hunter GK (2001) Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect Tissue Res* 42:25-37

Harris NL, Rattray KR, Tye CE, Underhill TM, Somerman MJ, D'Errico JA, Chambers AF, Hunter GK, Goldberg HA (2000) Functional analysis of bone sialoprotein: identification of the hydroxyapatite-nucleating and cell-binding domains by recombinant peptide expression and site-directed mutagenesis. *Bone* 27:795-802

Hunter GK, Goldberg HA (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8562-8565

Hunter GK, Goldberg HA (1994) Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: Role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem Pharmacol* 302:175-179

Kandori K, Masunari A, Ishikawa T (2005) Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements. *Calcif Tissue Int* 76:194-206

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227:680-685

Little JR & Eisen HN (1967) Preparation of immunogenic 2,4-dinitrophenyl and 2,4,6-trinitrophenyl proteins. In C. A. Williams & M. W. Chase, eds. *Methods in Immunology and Immunocytochemistry*, Vol. 1., Academic Press, Inc., New York, 128-133

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

Meri S, Pangburn MK (1994) Regulation of alternative pathway complement activation by glycosaminoglycans: specificity of the polyanion binding site on factor H. *Biochem Biophys Res Commun* 198:52-59

Moreno EC, Kresak M, Hay DI (1984) Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int* 36:48-59

Nanci A (1999) Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: Relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol* 126:256-269

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

Nanci A, Wazen RM, Zalzal S, Fortin M, Goldberg HA, Hunter GK, Ghitescu DL (2004) A tracer study with systemically and locally administered dinitrophenylated osteopontin. *J Histochem Cytochem* 52:1591-1600

Nanci A, Zalzal S, Fortin M, Mangano C, & Goldberg HA (2000) Incorporation of circulating bone matrix proteins by implanted hydroxyapatite and at bone surfaces: Implications for cement line formation and structuring of biomaterials. In J. E. Davies, ed. *Bone Engineering*, em<sup>2</sup>, Toronto, 305-311

Oldberg Å, Franzen A, Heinegard D (1988) The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem* 263(36):19430-19432

Pangburn MK, Pangburn KL, Koistinen V, Meri S, Sharma AK (2000) Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: interactions among factor H,



C3b, and target in the alternative pathway of human complement. *J Immunol* 164:4742-4751

Qin C, Baba O, Butler WT (2004) Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:126-136

Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence J-J (1994) Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: A general overview. *Cell Mol Biol* 40:57-75

Robey PG (2002) Bone Matrix Proteoglycans & Glycoproteins. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & Rodan G.A, eds. *Principles of Bone Biology*. Second edn, Academic Press,

Saito T, Yamauchi M, Abiko Y, Matsuda K, Crenshaw MA (2000) In vitro apatite induction by phosphophoryn immobilized on modified collagen fibrils. *J Bone Miner Res* 15:1615-1619

Saito T, Yamauchi M, Crenshaw MA (1998) Apatite induction by insoluble dentin collagen. *J Bone Miner Res* 13:265-270

Stubbs JT, III, Mintz KP, Eanes ED, Torchia DA, Fisher LW (1997) Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain. *J Bone Miner Res* 12:1210-1222

Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JAR, Sodek J, Hunter GK, Goldberg HA (2003) Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem* 278:7949-7955

Tye CE, Hunter GK, Goldberg HA (2005) Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J Biol Chem* 280:13487-13492

Vu D-D, Daniel NG, Nanci A (1999) In vivo model for the experimental manipulation of calcified tissues: A surgical approach for accessing the odontogenic organ and associated tissues in the rat incisor. *J Histochem Cytochem* 47:1-14

Warshawsky H, Moore G (1967) A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 15:542-549

Yin A, Margolis HC, Yao Y, Grogan J, Oppenheim FG (2005) Multi-component adsorption model for pellicle formation: The influence of salivary proteins and non-salivary phospho proteins on the binding of histatin 5 onto hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 51:102-110

## Figure Legends

**Figure 1.** Schematic models of (A,B) rat recombinant BSP (prBSP<sub>E</sub>) and (C) its alanine-substituted mutant form (prBSP<sub>A</sub>) in extended random coil orientation. The backbone of BSP is represented as a meandering ribbon and amino acid groups of particular interest are shown in different colors (RED - polyglutamic acid motif regions; BLUE - polyalanine substituted motif regions; GREEN, lysine residues; MAUVE, polyhistidine motif in His-tag region; CYAN - single glycine residue present in polyglutamic acid and polyalanine motif regions).

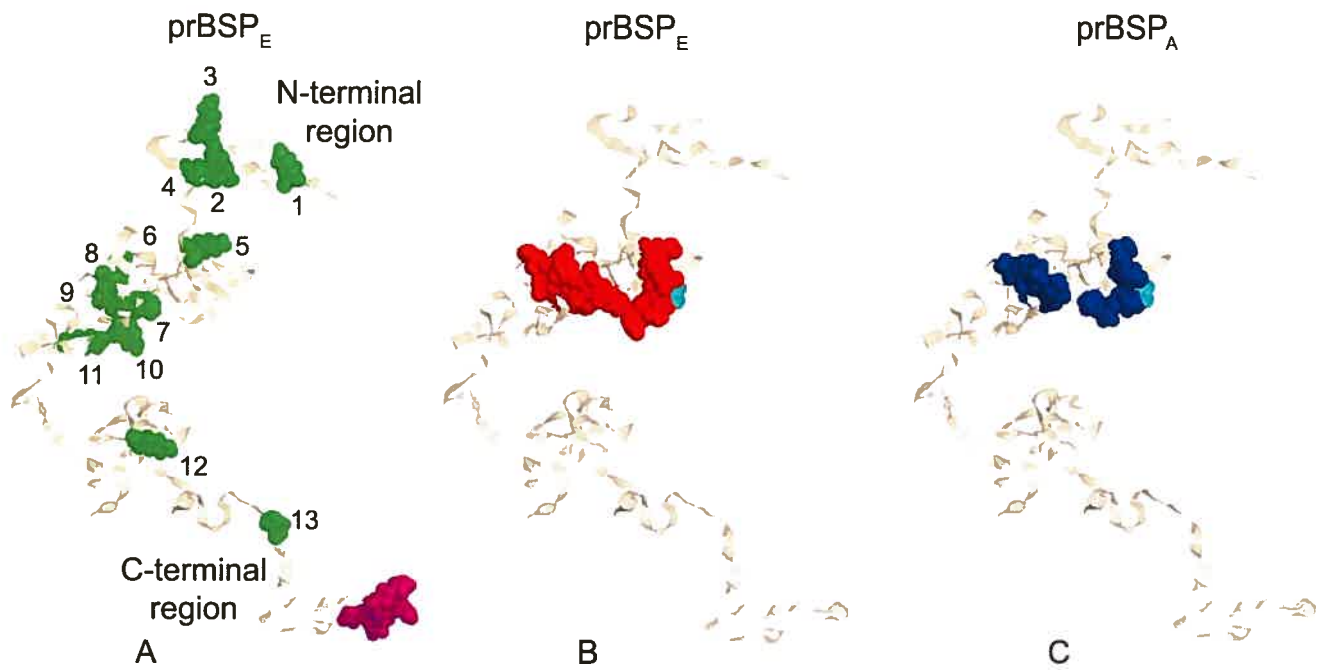
**Figure 2.** Characterization of the prokaryote recombinant BSP preparations. The first lane contains standard broad-range molecular mass markers (in kDa) stained with Ponceau S. Protein profile of prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> with or without DNP as revealed by silver staining (Lanes 2-5). Immunoblots of prBSP<sub>E</sub> and prBSP<sub>A</sub> with or without DNP probed with antibodies for BSP (Lanes 6-9) and DNP (Lanes 10-13). Lanes 2,6,10: prBSP<sub>E</sub>, Lanes 3,7,11: prBSP<sub>E</sub>-DNP, Lanes 4,8,12: prBSP<sub>A</sub>, Lanes 5,9,13: prBSP<sub>A</sub>-DNP.

**Figure 3.** Transmission electron micrographs illustrating the mandibular bone at the drilling site (DS). Dinitrophenylated prBSP<sub>E</sub> (prBSP<sub>E</sub>-DNP) (A, arrowheads) and prBSP<sub>A</sub>-DNP (B, arrowheads) were observed on bone surfaces surrounding the DS where

endogenous BSP (C) is also found. Tissue sections from sham-operated animals were used as negative controls to evaluate the background level (D). Bar = 100 nm.

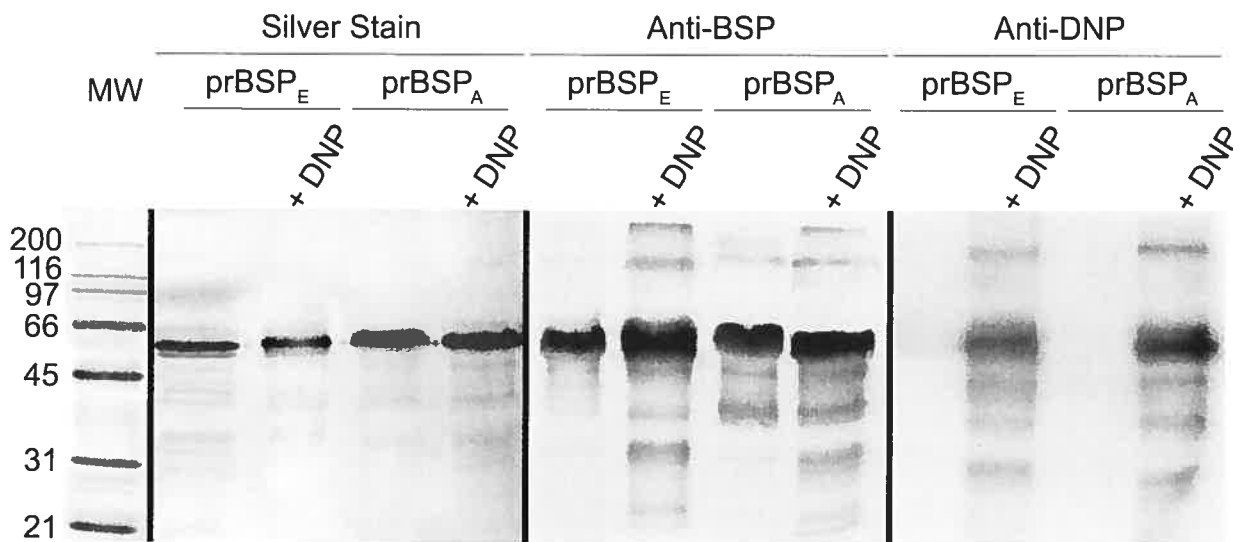
**Figure 4.** Transmission electron micrographs of mandibular bone following a 3-day infusion with prBSP<sub>E</sub>-DNP. Tagged molecules were observed incorporated into newly-formed bone matrix (arrowheads). Bar = 100 nm.

**Figure 5.** Quantitative analysis of the differential binding between prBSP<sub>E</sub>-DNP, prBSP<sub>A</sub>-DNP and sham-operated animals after a 24-hour infusion period (expressed as mean  $\pm$  standard deviation). Differences between the 3 groups are significant ( $p < 0.05$ ).



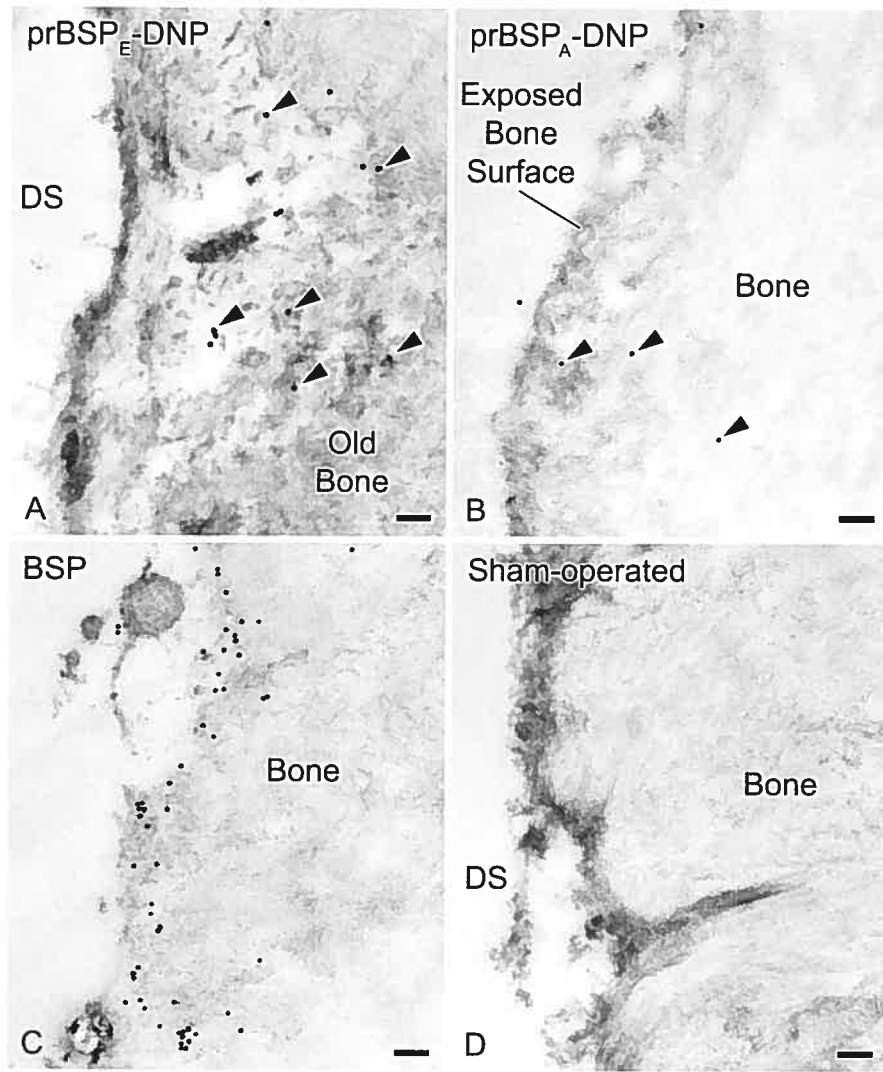
**Figure 1**

© Wazen *et al.* 2006



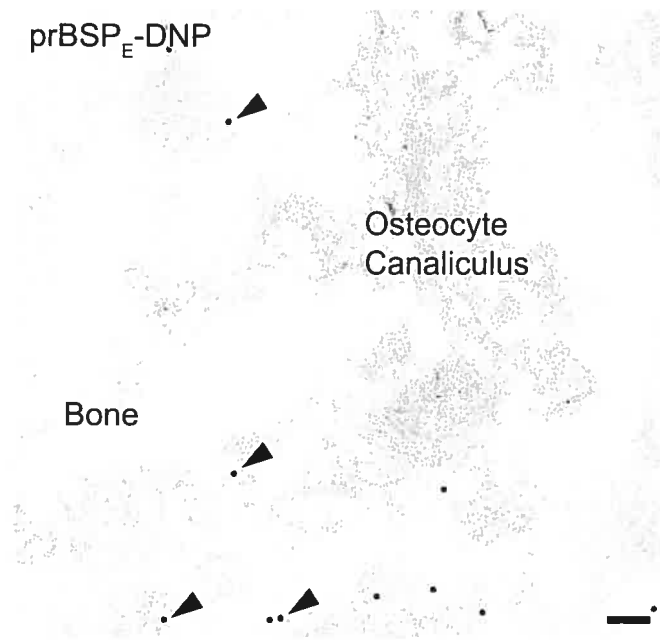
**Figure 2**

© Wazen *et al.* 2006



**Figure 3**

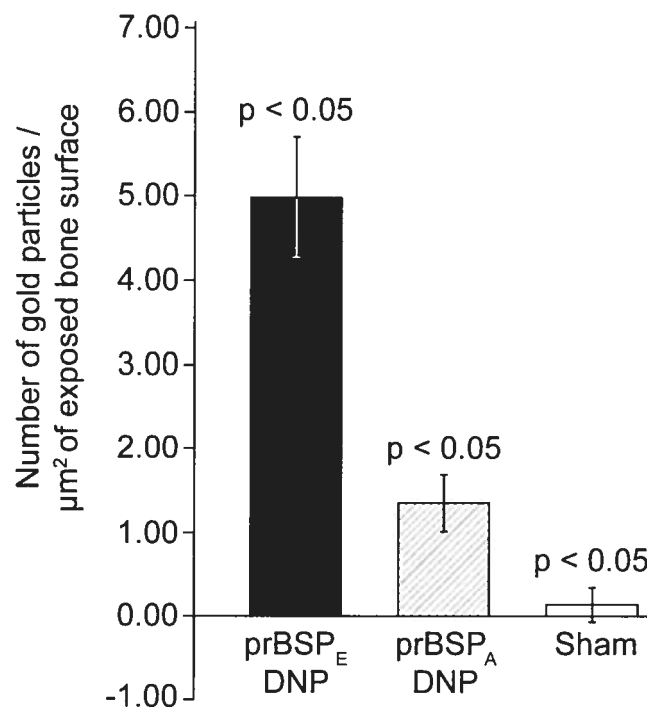
© Wazen *et al.* 2006



*Figure 4*

© Wazen *et al.* 2006





**Figure 5**

© Wazen *et al.* 2006

## *Chapitre 4*

### **Local Gene Transfer to Calcified Tissue Cells Using Prolonged Infusion of a Lentiviral Vector**

Reproduced, with permission, from *Rima M. Wazen, Pierre Moffatt, Sylvia  
Francis Zalzal, Nach G. Daniel, Karen A. Westerman and Antonio Nanci*

*Gene Therapy 13. 22: 1595-1602 (2006)*

## Sommaire

Le transfert de gène à l'aide de vecteurs viraux permet d'exprimer une protéine de façon soutenue dans un tissu cible. Cependant, l'injection de vecteurs viraux dans les tissus calcifiés demeure encore problématique en raison de leur accès restreint. Dans cette étude, nous avons tout d'abord évalué l'efficacité de lentivirus à infecter des cellules ostéogéniques *in vitro*, puis nous avons exploré la possibilité d'infecter directement des cellules osseuses *in vivo*. Deux lentivirus (LV) encodant pour la protéine fluorescente verte (GFP) ou l'améloblastine (AMBN) ont été produits. Cette protéine est associée à la minéralisation mais n'est pas présente dans l'os postnatal. L'efficacité des construits viraux a été examinée suivant la transfection de cellules osseuses de souris de la lignée MC3T3 et de cellules ostéogéniques primaires provenant de calvaria de rats nouveau-nés. Les lentivirus ont été infusés, à l'aide d'une mini-pompe osmotique, dans une fenêtre chirurgicale créée dans l'os alvéolaire de l'hémimandibule du rat ou dans l'os cortical du tibia. L'expression *in vitro* et *in vivo* de ces deux protéines a été détectée par immunohistochimie et observée au microscope optique et à fluorescence. Les résultats montrent que dans les modèles de cultures de cellules osseuses, les transgènes sont exprimés de façon stables. *In vivo*, l'expression du GFP est détectée au site d'infusion, de la même manière, l'AMBN est exprimée par des cellules fibroblastiques, ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes. Nos analyses démontrent que les lentivirus peuvent infecter avec une grande efficacité les cellules ostéogéniques en culture, et que l'infusion du lentivirus permet la transfection du tissu osseux. La capacité d'exprimer un transgène localement

dans l'os illustre donc la faisabilité de notre approche expérimentale et ouvre la porte à des études fonctionnelles et à l'évaluation d'applications thérapeutiques d'une protéine d'intérêt exprimée par un transgène.

Local Gene Transfer to Calcified Tissue Cells Using Prolonged Infusion of a Lentiviral Vector

Rima M. Wazen<sup>1</sup>, Pierre Moffatt<sup>1</sup>, Sylvia Francis Zalzal<sup>1</sup>, Nach G. Daniel<sup>2</sup>, Karen A. Westerman<sup>3</sup>, and Antonio Nanci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada. <sup>2</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Hospital Centre/Hôpital de l'Enfant-Jésus, Université Laval, Sainte-Foy, QC, Canada. <sup>3</sup>Department of Anesthesia Research, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Boston, MA.

Running Title: Gene transfer to calcified tissue

Corresponding author:

Antonio Nanci

Laboratory for the Study of Calcified Tissues and Biomaterials

Department of Stomatology, Faculty of Dentistry

Université de Montréal

P.O. Box. 6128, Station Centre-Ville

Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

Phone: (514) 343-5846

Fax: (514) 343-2233

Email: [REDACTED]

## Abstract

Gene transfer using viral vectors offers the potential for the sustained expression of proteins in specific target tissues. However, in the case of calcified tissues, *in vivo* delivery remains problematic because of limited accessibility. The aim of this study was to test the efficiency of lentiviral vectors (LVs) on osteogenic cells *in vitro*, and determine the feasibility of directly transducing resident bone cells *in vivo*. LVs encoding for green fluorescent protein (GFP) and ameloblastin (AMBN), a protein associated with mineralization not reported in bone, were generated. The transduction efficiency of the LVs was evaluated using the MC3T3 cell line and primary calvaria-derived osteogenic cells. For *in vivo* delivery, the LVs were infused using osmotic minipumps through holes created in the bone of the rat hemimandible and tibia. The production of GFP and AMBN *in vitro* and *in vivo* was monitored using fluorescence microscopy. Both transgenes were expressed in MC3T3 and primary osteogenic cells. *In vivo*, GFP was detected at the infusion site and fibroblast-like cells, osteoblasts, osteocytes and osteoclasts expressed AMBN. Our data demonstrate, for the first time, that primary osteogenic cells are efficiently transduced with LVs and that their infusion is advantageous for locally delivering DNA to bone cells.

**KEYWORDS:** Ameloblastin, Bone, Osteogenic cell culture, Gene transfer, Green fluorescent protein, Lentiviral vector.

## Introduction

Gene transfer is particularly advantageous for sustained delivery of proteins and offers an exciting avenue for the treatment of a variety of musculoskeletal problems. Expected clinical applications include treatment of orthopedic and periodontal diseases, healing of cartilage and bone defects, and ligament and tendon repair.<sup>(1-3)</sup> So far, the most efficient and commonly-used vectors for gene delivery have been viruses.<sup>(4)</sup> Viral vectors have been administered to skeletal sites in animals mainly by local injections in vasculature trunks,<sup>(5)</sup> muscle,<sup>(6-9)</sup> natural cavities (e.g. joints and synovial spaces)<sup>(10-14)</sup> and in post-surgical, traumatic or congenital areas of bone defects.<sup>(7,15-18)</sup> Systemic delivery via the portal vein has also been tested to reverse osteopenia in ovariectomized mice.<sup>(19)</sup> An alternative treatment strategy has been to transduce cells in vitro, expand and implant them at the desired site.<sup>(20-23)</sup>

Most gene transfer studies conducted to date have used so-called “first generation” adenoviruses.<sup>(2,24,25)</sup> Their application has been limited by the inflammatory response they elicit in vivo.<sup>(6,16,26,27)</sup> Lentiviruses, derived from feline (FIV) and the human immunodeficiency virus (HIV), have been developed as alternative vectors since they are capable of stably transducing both dividing and quiescent cells, and integrate into the host genome for prolonged transgene expression.<sup>(26)</sup> In addition, they are less likely to induce an inflammatory reaction.<sup>(28)</sup> Efficient lentivirus-mediated gene transfer has been

demonstrated in several cells and tissues including skeletal muscle,<sup>(29)</sup> salivary glands,<sup>(30)</sup> liver,<sup>(29)</sup> neural tissues<sup>(31,32)</sup> and keratinocytes.<sup>(33)</sup> There are only few studies on the administration of lentiviral vectors (LVs) at calcified tissue sites and these dealt with the periosteous implantation of cells infected *ex vivo*<sup>(21,34)</sup> and local injection of the vector into the synovium.<sup>(10,35)</sup>

Local delivery of viral vectors into bone remains problematic because it has so far been limited to readily accessible anatomical sites such as the synovial cavity and bone defects, and relatively large amounts of vector and its local persistence are required to successfully infect a sufficient number of cells.<sup>(36)</sup> The latter issues are particularly problematic for small animal models where size greatly limits the amount of virus that can be administered locally. The laboratory has been using “bony windows” coupled to osmotic minipumps to continuously deliver to calcified tissues bioactive agents.<sup>(37-39)</sup> Whereas this approach allows administration of small quantities that respect the local tissue physiology, it also permits to locally attain relatively high concentrations and, most importantly, to continuously replenish any material that would be rapidly cleared away.

The objective of the present study was to first demonstrate that LVs can efficiently transduce osteogenic cells *in vitro* and then determine the feasibility of directly targeting cells constituting bone tissue. For *in vitro* analyses, we have used both the mouse MC3T3 transformed cell line and primary rat calvaria-derived cells, both of which are well-established models of *in vitro* osteogenesis. The “bony window” approach was applied to



continuously infuse LVs in the rat hemimandible and tibia. Two vectors were tested, one encoding for the cytoplasmic green fluorescent protein (GFP) reporter molecule and the other for ameloblastin (AMBN), a matrix protein secreted by the epithelial tooth ameloblasts.<sup>(40)</sup> AMBN was selected as it is implicated in biological mineralization but has not been found in bone, and thus could easily be distinguished from other products manufactured by osteoblasts. The results demonstrate that LVs efficiently transduce both transformed and primary osteogenic cells in vitro, and that their continuous infusion is an advantageous strategy to locally transfer DNA to bone cells.

## Results

### Construction of LVs and in vitro transduction efficiency in osteogenic cells

The lentiviral maps of the vectors encoding for GFP (GFP-LV) and for AMBN (AMBN-LV) are illustrated in Figure 1. Each LV was pseudotyped with vesicular stomatitis virus G glycoprotein, packaged, concentrated by ultracentrifugation, and then titered in HEK293 cells. Titers were estimated in the range between  $7.5 \times 10^8$  –  $1 \times 10^9$  infectious units (IU)/ml. The relative efficiency of the generated lentiviruses was evaluated in vitro on osteogenic cells from the mouse MC3T3 cell line and primary cultures (Figure 2). GFP was distributed throughout the cell (Figure 2a and 2b), including the nucleus, while AMBN was immunolocalized to a perinuclear region where the Golgi apparatus is found (Figure 2d and 2e). The percentage of infected MC3T3 cells showed little variation (almost all cells were infected) as the number of IU/well increased (data not shown). However, the intensity of the fluorescence signals, at seventy-two hours post-infection, increased dramatically with the number of IU/well (Figure 2c and 2f). Overall, there was no significant difference in the transduction efficiency between MC3T3 and primary calvaria-derived cells (Figure 2c and 2f).

In primary osteogenic cells, immunoblotting revealed no major difference in the expression of bone sialoprotein (BSP) and, osteopontin (OPN) between cells expressing the AMBN

transgene and control, uninfected cells at 96 hours post-infection (Figure 3a). Double immunofluorescence labeling confirmed the coexpression of AMBN and OPN in infected cells (Figure 3b and 3c). Transgene expression persisted for almost 2 weeks without any apparent change in intensity (Figure 3c). Measurements of the intensity of fluorescence signals after passage (Figures 4a and 4b), however, indicated that the level of GFP expression was not diminished, however, it was reduced by about half for AMBN (Figure 4c). Subculturing the cells did not significantly affect the percentage of infected cells for both the GFP and AMBN transgenes (Figure 4d). Uninfected cell cultures, and infected cultures under control immunolabeling conditions exhibited only background fluorescence (data not shown).

#### In vivo expression of lentiviruses delivered with an osmotic minipump

Having demonstrated that lentiviruses can effectively transduce osteogenic cells in vitro, we evaluated their capacity to infect bone cells in the hemimandible and tibia (Figures 5 and 6). GFP was used to assess vector delivery by minipumps ( $\sim 30 \times 10^6$  IU over 5 hours) and the resultant macroscopic distribution of infected cells. Observation under epifluorescent light revealed GFP expression mainly at the site of infusion and its immediate periphery (Figures 5b and 6b). It was estimated that about 3 - 8% of cells on a tissue section, within a radius of 200  $\mu\text{m}$  from the drilling site, were positive for GFP (Figure 5b). However, some infected cells were detected several millimeters away along the incisor tooth (Figures 5c and 5d). Occasionally, the GFP signal extended outward of the

'bony window' along the surface of the hemimandible and tibia (data not shown), suggesting that some of the vector may have leaked out during infusion.

At 4 days following the infusion of AMBN-LV in the hemimandible, the protein was detected in mononuclear cells, including some osteoblasts, and multinucleated cells bordering the "bony window" (Figure 5e). In the tibia, there was an accumulation of mesenchymal cells in relation to the surgical site and cells with a rounded profile and others with a fibroblast-like appearance expressed AMBN (Figure 6c and 6d). After 7 days at both infusion sites, osteoblasts and osteocytes in newly formed bone were seen to express the transgene (Figures 5f, 5g and 6e). In the tibia, disturbance of the periosteum by drilling frequently caused focal areas of endochondral ossification on the nearby bone surface (Figure 7a). Chondrocytes forming the cartilage callus expressed AMBN (Figure 7b), whereas distant chondrocytes within the epiphyseal growth plate were unlabeled (Figure 7c).

No obvious side effects as well as no significant difference in bone formation between animals receiving GFP-LV or AMBN-LV were apparent from routine histological observation.

## Discussion

Gene transfer has been applied successfully in various animal models to locally express growth factors and stimulate bone repair.<sup>(2,41)</sup> The majority of these studies have used adenoviral vectors to infect cells either *ex vivo* or *in vivo*. These vectors, however, elicit an immune response and have a limited duration of expression.<sup>(4,26)</sup> New generations of vectors have been generated to address these limitations. Among these, adeno-associated viruses appear promising as they do not encode for inflammatory viral proteins<sup>(26,42-44)</sup> and have successfully been applied to stimulate osteogenesis *in vivo*.<sup>(8,9)</sup> However, they do not integrate the host genome and are difficult to generate at high titers.<sup>(42,43)</sup> We have opted to use an HIV-derived vector because of the following well-established characteristics of lentiviruses: (1) they are capable of infecting both dividing and nondividing cells, (2) they are less immunogenic because no viral proteins are produced, (3) they have a wide tropism, (4) can be concentrated to high titers and (5) they incorporate into the host genome.<sup>(28,45)</sup>

Results from the present study show that LVs can efficiently be used to drive expression of exogenous proteins in osteogenic cells, both *in vitro* and *in vivo*. The transduction efficiency of our vectors was evaluated *in vitro* on both MC3T3 and primary osteogenic cells. With both the GFP-LV and AMBN-LV, it was possible to achieve 100% infectivity even at the lowest viral concentration used. Expression of the transgenes was sustained for almost 2 weeks and, in the case of primary osteogenic cells, it was maintained after

passage. Taken together, the persistence of expression and its retention after subculturing suggest that the viral DNA integrated the host cell genome, allowing constitutive expression of the exogenous proteins. To our knowledge, this is the first demonstration of the use of lentiviruses to overexpress a desired protein in primary calvaria-derived osteogenic cells. Although it is difficult to extrapolate the *in vitro* behavior to the *in vivo* situation, clearly the vectors are highly infectious and have a high propensity to infect cells of the osteogenic lineage. It should also be pointed out that expression of AMBN did not significantly alter the production of two representative endogenous matrix proteins (BSP, OPN), suggesting that it has no short term detrimental effect on the cells.

While there is abundant literature on the experimental use of various gene therapy vectors for skeletal applications, these studies essentially aimed at releasing mediators in proximity to the site of administration that would diffuse locally to influence repair and regeneration of cartilage/bone. Our objective was to directly target the cells that constitute bone tissue. At the two anatomical sites tested, that is the hemimandible and tibia, osteoblasts, osteocytes, osteoclasts and fibroblast-like cells that could represent osteoprogenitor cells were infected and expressed AMBN. These cells were generally found in proximity to the site of infusion; however, transduced cells were sometimes also present some distance away. In the hemimandible, GFP-expressing cells were detected along the periphery of the incisor, suggesting diffusion of the vector. However, the complexity of the mineralized tissues of the tooth would make such diffusion unlikely. An alternative explanation is that cells in the apical portion of the tooth which is situated nearby the “bony window”<sup>(37)</sup> were

infected. As these cells differentiated, they passively migrated away with the incisor which continuously erupts at a rate of  $\sim 650 \mu\text{m}/\text{day}$ .<sup>(46)</sup> In the tibia, cells expressing AMBN were found in a cartilage callus near the surgical site. It is known that disturbing the periosteum of long bones stimulates the formation of cartilage.<sup>(47)</sup> Some vector may have leaked out of the “bony window” during infusion and transduced some precursor cells in the periosteum. Noteworthy, these cells retained the transgene throughout the differentiation sequence into chondrocytes. As the callus results from several cell divisions, the presence of chondrocytes expressing AMBN in them suggests that the viral DNA integrates the host cell genome also *in vivo*.

A major limitation associated with injection of viral vectors is the fact that large amounts are required because of local dispersion, clearance out of the injection site, and immune inactivation.<sup>(36)</sup> Precision of the injection may also be an issue; for instance, in the case of bone defects, vector lost to surrounding muscle has been reported to influence the outcome of treatment.<sup>(48)</sup> Infusion through a “bony window” can circumvent these problems by continuously delivering small quantities of vector over time directly into the bone tissue at well-defined locations. Cells at the infusion site and its immediate surroundings are bathed for several hours with the viruses, a situation with similarities to what occurs *in vitro* where it is possible to achieve high levels of infectivity with even very small amounts of vector. Such a sustained exposure may also facilitate incorporation in cells of multiple copies of the transgene thereby potentially increasing the amount of protein produced.

In conclusion, our study shows that osteogenic cells can be transduced with LVs to express cytoplasmic and secreted proteins, and establishes the feasibility of directly infecting cells in bone tissue using continuous infusion. This proof of principle represents a mandatory first step towards local gene transfer studies in models of bone formation, repair and pathological loss. Expression of matrix proteins, such as AMBN, offers the possibility to study their function and possible application in the development of novel strategies for bone regeneration. In addition, because lentiviruses can sustain expression of a transgene over periods of several months,<sup>(29,30,34,49)</sup> they can be advantageously exploited for rescue experiments in knockout mice with canonical and mutated proteins.



## **Materials and Methods**

### **Lentiviral Vector Production and Titer Determination**

Lentivirus encoding for GFP (GFP-LV) or AMBN (AMBN-LV), under the transcriptional control of the EF1-alpha promoter, were produced in human embryonic kidney cell line (HEK293). The cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen). HEK293 cells were plated, at a cellular density of  $6 \times 10^6$ , in 175 cm<sup>2</sup> flasks. The following day, the cells were transfected using Fugene 6 (Roche Diagnostics, Quebec, Canada) with 13 µg HPV275, 1.3 µg P633, 1.3 µg HPV17, 1.3 µg VSVG and 11.7 µg of either GFP-LV or AMBN-LV. The lentiviruses were collected after 48h and 60h, filtered through 0.45 µm filters and concentrated by ultracentrifugation at 4°C, 2h, 24000 rpm. The titers of the lentiviruses were determined on HEK293 cells by immunofluorescence detection.

### **SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Western Blotting**

Primary-derived osteogenic cells and enamel organ cells prepared from freeze-dried rat incisors as describe previously by Smith and Nanci<sup>(50)</sup> were solubilized into sample preparation buffer and applied to 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis as described by Laemmli.<sup>(51)</sup> Proteins were subsequently transferred onto 0.45µm nitrocellulose membranes (Mandel, Ontario, Canada) and probed with anti-AMBN

antibody (1:1000; courtesy of Dr. P.H. Krebsbach<sup>(52)</sup>), anti-bone sialoprotein antibody (1:500; LF-100; courtesy of Dr. L.W. Fisher, NIDCR, NIH, Bethesda, MD) and anti-osteopontin (OPN) antibody (1:500; LF-123; courtesy of Dr. L.W. Fisher) as described previously.<sup>(53)</sup> Antibody binding was revealed with a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to alkaline phosphatase (1:1,000; Sigma, Oakville, Ontario, Canada) using p-nitro blue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate as substrates (Amersham Biosciences, Quebec, Canada).

### **Cell Culture Studies with MC3T3 Cells**

The mineralizing subclone #4 of the MC3T3 cell line (ATCC, Manassas, VA, USA) that has been previously described<sup>(54)</sup> was used in this study. Cells were maintained in  $\alpha$ -minimal essential medium (alpha-MEM) (Invitrogen) with 10% FBS and media changed every 3 days. For infection with lentiviruses, cells were seeded in 6-well plates (60 000 cells/well) on glass coverslips.

### **Cell Isolation of Primary Calvaria-Derived Osteogenic Cells**

All animal procedures were in accordance with guidelines of the Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux of Université de Montréal. Osteogenic cells were isolated by sequential trypsin/collagenase digestion of calvarial bone from newborn (2–4 days) Wistar rats (Charles River Canada, St-Constant, QC, Canada), as previously described.<sup>(55,56)</sup> Cells were seeded in 6-well plates (70 000 cells/well) and 24-well plates (20

000 cells/well) on glass coverslips. Cells were grown for 3 days in minimum essential medium with Earle's salts (MEM Earle's) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin (Invitrogen).

### **Transduction of MC3T3 and Primary Calvaria-Derived Cells with Lentivirus**

At confluency (day 3), MC3T3 cells and primary calvaria-derived osteogenic cells were infected with either lentivirus at different doses ( $1.5 \times 10^6$  and  $4.5 \times 10^6$  IU/ml) in the presence of 8  $\mu\text{g/ml}$  polybrene (Sigma). After 24h, the medium was replaced with fresh alpha-MEM and MEM Earle's respectively, supplemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin. After 48h, the efficiency of transduction was assessed by immunofluorescence. To monitor expression of the transgenes on a longer basis, primary osteogenic cells were passage and subcultured 7-days after infection. They were seeded in 24-well plates (20 000 cells/well) on glass coverslips and processed after 48h later for immunofluorescence detection.

### **Detection of Transgene Expression in Cells by Immunofluorescence**

Cells were fixed and processed for immunofluorescence labeling with a primary antibody against recombinant rat AMBN (1:300 / 1 h; courtesy of Dr. P.H. Krebsbach<sup>(52)</sup>) followed by a Alexa fluor 594 (red fluorescence)-conjugated goat secondary antibody (1:500 / 1h;

Molecular Probes, Eugene, OR) as described previously.<sup>(57)</sup> Incubation with primary antibody against anti-OPN (1:600; LF-123) followed by a Alexa fluor 488 (green fluorescence)-conjugated goat secondary antibody (1:500 / 1h; Molecular Probes, Eugene, OR) was also carried out. The nucleus was stained with Hoescht 33342 (10 µg/ml) (Invitrogen). The cells were examined by epifluorescence under a fluorescence microscope (Axiophot; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Gene transfer efficiency and intensity of labeling was measured using Version 5.1.2.59 of Image-Pro<sup>®</sup> Plus software (Media Cybernetics Inc, Silver Spring, MD, USA). Data described in text and in Figures 2 and 4 are expressed as means ± standard deviations of 5 randomly selected fields from 2 representative experiments.

### **Surgical Procedure**

A 'surgical window' was created in the bone of the hemimandible as described by Vu et al.<sup>(37)</sup> and Nanci et al.<sup>(39)</sup> and in the cortical bone of tibia of male Wistar rats weighting  $100 \pm 10$ g (Charles River Canada, St-Constant, Quebec, Canada). The lateral aspect of hind limb was shaved and cleaned with 70% ethanol. A 5-10 mm skin incision was made just proximal to the tibial tuberosity over the lateral aspect of the bone. The periosteum at the drilling site was exposed and gently scraped from the bone with a dental spoon excavator over an area of approximately 3 mm<sup>2</sup>. A transcortical hole was then drilled using a dental drill size 010 with carbide round burr (Brassler, Montreal, Quebec, Canada), followed by a size 014 (Brassler). One-day Alzet osmotic minipump (model 2001D, 200 µl, 8.0 µl/h; Alza

Corporation, Palo Alto, CA) filled with PBS were slipped under the skin of the back of the animal. The vinyl tubing (Scientific Commodities Inc, Lake Havasu City, AZ), connecting the osmotic minipump to the catheter, was filled with 40  $\mu$ l lentivirus ( $30 \times 10^6$  IU; GFP-LV and AMBN-LV). The animals received an injection of Temgesic<sup>®</sup> (Buprenorphine hydrochloride, Reckitt and Colman, Hull, UK) after surgery, and were fed with soft food containing Temgesic<sup>®</sup>. The animals were killed after 4 and 7 days.

### **Tissue Processing and Detection of Transgene Expression**

The animals were anesthetized and perfusion-fixed as described.<sup>(39)</sup> Treated and control contralateral hemimandibles, as well as knees were dissected and further fixed by immersion in the same fixative for 3h at 4°C. The tissues were decalcified for 14 days at 4°C in 4.13% disodium ethylenediamine tetra-acetic acid.<sup>(58)</sup> Decalcified tissues were washed for 24 hours in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, and processed for paraffin embedding. Seven to 10  $\mu$ m thick sections were mounted on Superfrost<sup>®</sup>/Plus (Fisher Scientific, Whitby, ON, Canada) slides for histology, and stained with hematoxyline and eosin. Briefly, deparafinized sections were first blocked for 20 min, with a solution consisting of 0.01M PBS, pH 7.2, containing 0.05% Tween 20 (0.01M PBS – Tween 20) and 5 % skim milk. They were then incubated with a primary antibody against recombinant rat AMBN (1:300 / 3h). Sections were then washed with 0.01M PBS - Tween 20 for 30 min, followed the DakoEnvision<sup>™</sup>+ System, HRP kit (Dako Corporation, Carpinteria, CA) was used as recommended by the manufacturer. Revelation was performed with DAB and

sections were counterstained with methyl green (Dako Corporation). Gene transfer efficiency and intensity of labeling was measured using Image-Pro<sup>®</sup> Plus software.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). We are grateful to Olivier Bécharad (Université de Montréal) and Giovanna Orsini (University of Chieti) for their help in initial studies, with immunoblotting and surgical procedures, respectively. The authors are thankful to Dr. Charles E. Smith for his advices regarding image analysis and Mrs Micheline Fortin for technical assistance.

## References

- (1) Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2003; 74: 202-13.
- (2) Kofron MD, Laurencin CT. Orthopaedic applications of gene therapy. *Curr Gene Ther* 2005; 5: 37-61.
- (3) Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. The 2003 Nicolas Andry Award. Orthopaedic gene therapy. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 316-29.
- (4) Partridge KA, Oreffo ROC. Gene delivery in bone tissue engineering: Progress and prospects using viral and nonviral strategies. *Tissue Engineering* 2004; 10: 295-307.
- (5) Katsube K, Bishop AT, Simari RD, Yla-Herttuala S, Friedrich PF. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. *J Orthop Res* 2005; 23: 469-74.
- (6) Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, Robbins PD, Evans CH, Huard J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone* 1999; 24: 541-7.
- (7) Alden TD, Beres EJ, Laurent JS, Engh JA, Das S, London SD, et al. The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. *J Craniofac Surg* 2000; 11: 24-30.



- (8) Luk KD, Chen Y, Cheung KM, Kung HF, Lu WW, Leong JC. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-4 gene therapy for in vivo bone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 636-45.
- (9) Chen Y, Luk KD, Cheung KM, Xu R, Lin MC, Lu WW, et al. Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. *Gene Ther* 2003; 10: 1345-53.
- (10) Gouze E, Pawliuk R, Pilapil C, Gouze JN, Fleet C, Palmer GD, et al. In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol Ther* 2002; 5: 397-404.
- (11) Hiltunen MO, Ruuskanen M, Huuskonen J, Mahonen AJ, Ahonen M, Rutanen J, et al. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. *FASEB J* 2003; 17: 1147-9.
- (12) Robbins PD, Evans CH, Chernajovsky Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Ther* 2003; 10: 902-11.
- (13) Kuboki T, Nakanishi T, Kanyama M, Sonoyama W, Fujisawa T, Kobayashi K, et al. Direct adenovirus-mediated gene delivery to the temporomandibular joint in guinea-pigs. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 701-9.
- (14) Watanabe S, Imagawa T, Boivin GP, Gao GP, Wilson JM, Hirsch R. Adeno-associated virus mediates long-term gene transfer and delivery of chondroprotective IL-4 to murine synovium. *Mol Ther* 2000; 2: 147-52.
- (15) Ashinoff RL, Cetrulo CL, Jr., Galiano RD, Dobryansky M, Bhatt KA, Ceradini DJ, et al. Bone morphogenetic protein-2 gene therapy for mandibular distraction osteogenesis. *Ann Plast Surg* 2004; 52: 585-90.

- (16) Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Wooley P, Weiss K, Grimm M, et al. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther* 2000; 7: 734-9.
- (17) Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, Ghivizzani S, Wooley P, Krauspe R, et al. Potential role of direct adenoviral gene transfer in enhancing fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 379: S120-S125.
- (18) Helm GA, Alden TD, Beres EJ, Hudson SB, Das S, Engh JA, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. *J Neurosurg* 2000; 92: 191-6.
- (19) Kostenuik PJ, Bolon B, Morony S, Daris M, Geng ZO, Carter C, et al. Gene therapy with human recombinant osteoprotegerin reverses established osteopenia in ovariectomized mice. *Bone* 2004; 34: 656-64.
- (20) Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, Breitbart AS. Expression of human bone morphogenetic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Ther* 1998; 5: 1098-104.
- (21) Gouze E, Pawliuk R, Gouze JN, Pilapil C, Fleet C, Palmer GD, et al. Lentiviral-mediated gene delivery to synovium: potent intra-articular expression with amplification by inflammation. *Mol Ther* 2003; 7: 460-6.
- (22) Lieberman JR, Daluiski A, Stevenson S, Wu L, McAllister P, Lee YP, et al. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg [Am ]* 1999; 81A: 905-17.

- (23) Krebsbach PH, Gu K, Franceschi RT, Rutherford RB. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone in vivo. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1201-10.
- (24) Yla-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000; 355: 213-22.
- (25) Kanerva A, Hemminki A. Adenoviruses for treatment of cancer. *Ann Med* 2005; 37: 33-43.
- (26) Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Ann Rev Biochem* 2005; 74: 711-38.
- (27) Newman KD, Dunn PF, Owens JW, Schulick AH, Virmani R, Sukhova G, et al. Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1995; 96: 2955-65.
- (28) Federico M. Lentivirus gene engineering protocols. New Jersey: Humana Press; 2003.
- (29) Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* 1997; 17: 314-7.
- (30) Shai E, Palmon A, Panet A, Marmary Y, Sherman Y, Curran MA, et al. Prolonged transgene expression in murine salivary glands following non-primate lentiviral vector transduction. *Mol Ther* 2005; 12: 137-43.
- (31) Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11382-8.

- (32) Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272: 263-7.
- (33) Ghazizadeh S, Katz AB, Harrington R, Taichman LB. Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004; 9: 269-75.
- (34) Sugiyama O, An DS, Kung SP, Feeley BT, Gamradt S, Liu NQ, et al. Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. *Mol Ther* 2005; 11: 390-8.
- (35) Kyrkanides S, Kambylafkas P, Miller JH, Tallents RH. Non-primate lentiviral vector administration in the TMJ. *J Dent Res* 2004; 83: 65-70.
- (36) Franceschi RT. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J Dent Res* 2005; 84: 1093-103.
- (37) Vu D-D, Daniel NG, Nanci A. In vivo model for the experimental manipulation of calcified tissues: A surgical approach for accessing the odontogenic organ and associated tissues in the rat incisor. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1-14.
- (38) Orsini G, Zalzal S, Nanci A. Localized infusion of tunicamycin in rat hemimandibles: alteration of the basal lamina associated with maturation stage ameloblasts. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 165-76.
- (39) Nanci A, Wazen RM, Zalzal S, Fortin M, Goldberg HA, Hunter GK, et al. A tracer study with systemically and locally administered dinitrophenylated osteopontin. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 1591-600.

- (40) Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 1999; 126: 270-99.
- (41) Luo J, Sun MH, Kang Q, Peng Y, Jiang W, Luu HH, et al. Gene therapy for bone regeneration. *Curr Gene Ther* 2005; 5: 167-79.
- (42) Schwarz EM. The adeno-associated virus vector for orthopaedic gene therapy. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 379: S31-S39.
- (43) Dai J, Rabie AB, Hagg U, Xu R. Alternative gene therapy strategies for the repair of craniofacial bone defects. *Curr Gene Ther* 2004; 4: 469-85.
- (44) Ulrich-Vinther M, Carmody EE, Goater JJ, Soballe K, O'Keefe RJ, Schwarz EM. Recombinant adeno-associated virus-mediated osteoprotegerin gene therapy inhibits wear debris-induced osteolysis. *J Bone Joint Surg [Am ]* 2002; 84A: 1405-12.
- (45) Kootstra NA, Verma IM. Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 413-39.
- (46) Smith CE, Warshawsky H. Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using <sup>3</sup>H-thymidine. *Anat Rec* 1975; 183: 523-62.
- (47) Li M, Amizuka N, Oda K, Tokunaga K, Ito T, Takeuchi K, et al. Histochemical evidence of the initial chondrogenesis and osteogenesis in the periosteum of a rib fractured model: implications of osteocyte involvement in periosteal chondrogenesis. *Microsc Res Tech* 2004; 64: 330-42.

- (48) Rundle CH, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Chen ST, Sheng MH, Wergedal JE, et al. In vivo bone formation in fracture repair induced by direct retroviral-based gene therapy with bone morphogenetic protein-4. *Bone* 2003; 32: 591-601.
- (49) Zhang XY, La Russa VF, Bao L, Kolls J, Schwarzenberger P, Reiser J. Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. *Mol Ther* 2002; 5: 555-65.
- (50) Smith CE, Nanci A. A method for sampling the stages of amelogenesis on mandibular rat incisors using the molars as a reference for dissection. *Anat Rec* 1989; 225: 257-66.
- (51) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- (52) Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin: a novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 4431-5.
- (53) Chen W-Y, Nanci A, Smith CE. Immunoblotting studies on artifactual contamination of enamel homogenates by albumin and other proteins. *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 145-51.
- (54) Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 893-903.
- (55) Nanci A, Zalzal S, Gotoh Y, McKee MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc Res Tech* 1996; 33: 214-31.

- (56) Irie K, Zalzal S, Ozawa H, McKee MD, Nanci A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec* 1998; 252: 554-67.
- (57) Tambasco De Oliveira P, Zalzal S, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 633-41.
- (58) Warshawsky H, Moore G. A technique for the fixation and decalcification of rat incisors for electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1967; 15: 542-9.

## **Titles and Legends to Figures**

**Figure 1** Plasmid maps for GFP-LV and AMBN-LV vectors under the control of the EF-1 alpha promoter. AMBN, ameloblastin; GAG, viral helper gene; GFP, green fluorescent protein; LTR, long-term repeats; PSI, packaging signal; cPPT, central polypurine tract; RRE, Rev-responsive element.

**Figure 2** Transduction efficiency of GFP-LV and AMBN-LV in MC3T3 cells (a,d) and in primary, rat calvaria-derived osteogenic cells (b,e), at 72h after infection, with an infectious unit of  $4.5 \times 10^6$  IU/ml. Expression of GFP is revealed by direct epifluorescence imaging and of AMBN by immunofluorescence labeling. Note the diffuse cytoplasmic distribution of GFP (a,b) and the perinuclear localization of AMBN (d,e). The intensity of expression of the transgene increases with viral dosage (c, f). Nuclei (blue) in b,d,e are stained with Hoechst.

**Figure 3** (a) Western blot analysis of AMBN expression in rat incisor enamel organ sample from the secretory stage (EO) and uninfected (Ctl) and AMBN-LV infected (Virus) rat calvaria-derived osteogenic cells. The osteogenic cells were also probed for the production of bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN). Expression of the AMBN transgene by osteogenic cells does not significantly alter that of these two representative bone matrix proteins. The first lane contains standard broad-range molecular weight markers (MW in



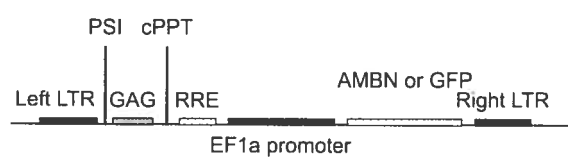
kDa) stained with Ponceau red. (b, c) Double labeled immunofluorescence preparations for OPN (green) and AMBN (red) in osteogenic cells at day 3 (b) and day 13 (c) postinfection with AMBN-LV. In cells expressing both proteins, the green and red fluorescence signals overlap generating a yellowish-orange color over the Golgi apparatus.

**Figure 4** Lentivirus infected rat calvaria osteogenic cells. As seen at 48h after subculturing, second generation cells maintain expression of GFP (a) and AMBN (b). When comparing before and after passage, the intensity of GFP labeling was not significantly reduced, while AMBN expression decreased (c). However, the proportion of infected cells was maintained after passage (d). Nuclei are stained blue with Hoechst.

**Figure 5** Infusion of LVs through a ‘bony window’ in the rat hemimandible. (a) Computed tomography scan image illustrating the position of the metal catheter linking the vinyl tubing of the osmotic minipump to a hole on the buccal aspect of the hemimandible. (b) Low magnification epifluorescence micrograph from a section passing through the ‘bony window’ illustrating expression of GFP by cells near the site of infusion. (c, d) Whole-mount cross-sectional profiles at position of the red lines in (a). The viral vector can diffuse for several millimetres along the periodontal space surrounding the incisor tooth. (e) Immunolabeling showing expression of AMBN by mononuclear (arrowhead) and multinucleated (arrows) cells at 4 days following infusion of AMBN-LV. (f, g) At 7 days postinfusion, numerous osteoblasts (Ob) and osteocytes (Oc) in bone near the drill site are immunoreactive. M1, 2, 3, molars.

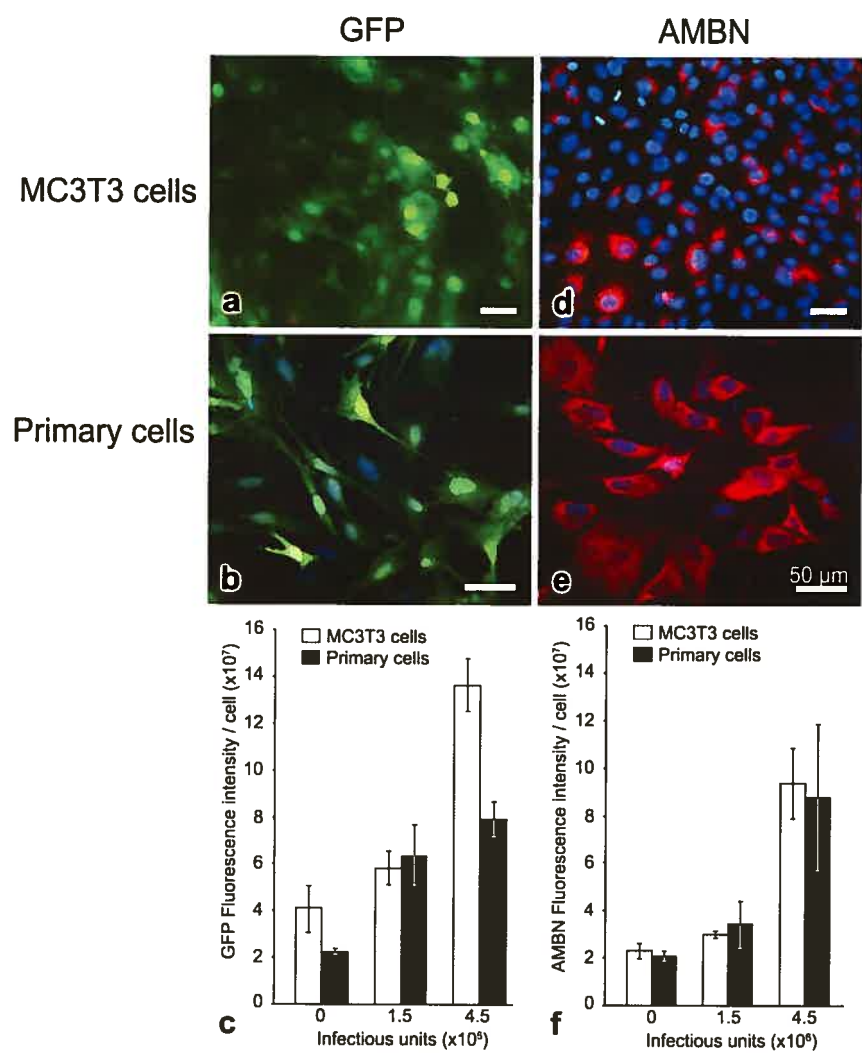
**Figure 6** Infusion of LVs through a ‘bony window’ in the rat tibia. (a) X-ray showing the insertion position of the minipump catheter into the cortical bone of the tibia. (b) Transgene expression, here illustrated following infection with GFP-LV, is generally restricted to the site of infusion. (c, d) At 4 days following infusion of AMBN-LV, AMBN was observed in some mononucleated (arrowheads), endothelial (BV) and fibroblast-like (arrows) cells within the mesenchymal condensation that occurred in neighboring marrow. (e) At seven days, some osteoblasts (Ob) and osteocytes (Oc) associated with newly-formed bone express the transgene. (c,d,e) Sections were counterstained with methyl green.

**Figure 7** Infusion of AMBN-LV in the tibia. (a) Disturbance of the periosteum during surgery can cause formation of a cartilaginous callus (boxed) which undergoes endochondral ossification. Section stained with hematoxylin and eosin. (b) Immunodetection performed on an adjacent section shows chondrocytes (arrowheads) constituting the callus (boxed area in a) at day 7 postinfusion express AMBN. (c) Growth plate chondrocytes on the same section are not immunoreactive for AMBN. Sections (b, c) were counterstained with methyl green.



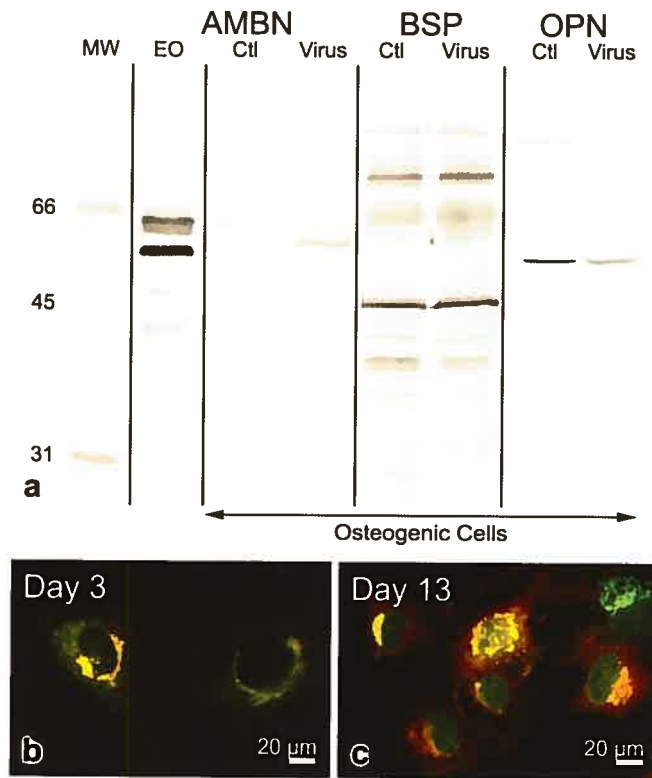
**Figure 1**

© Wazen *et al.* 2006



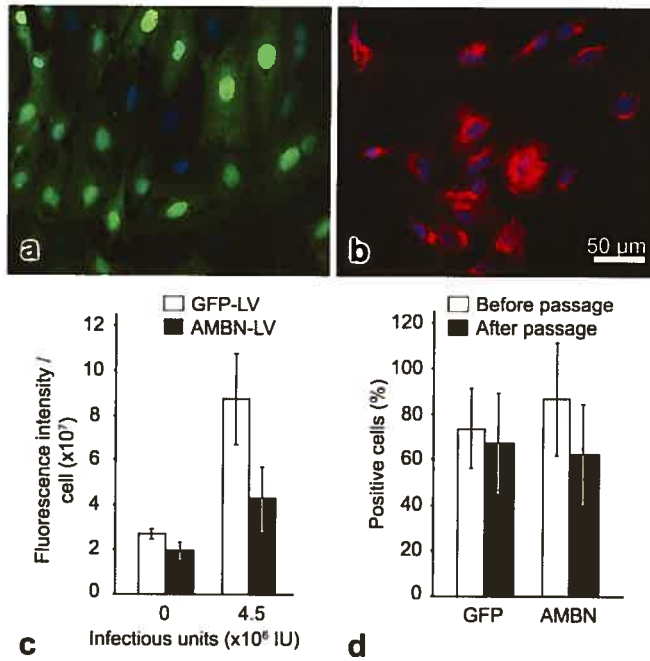
**Figure 2**

© Wazen *et al.* 2006



**Figure 3**

© Wazen *et al.* 2006



**Figure 4**

© Wazen *et al.* 2006

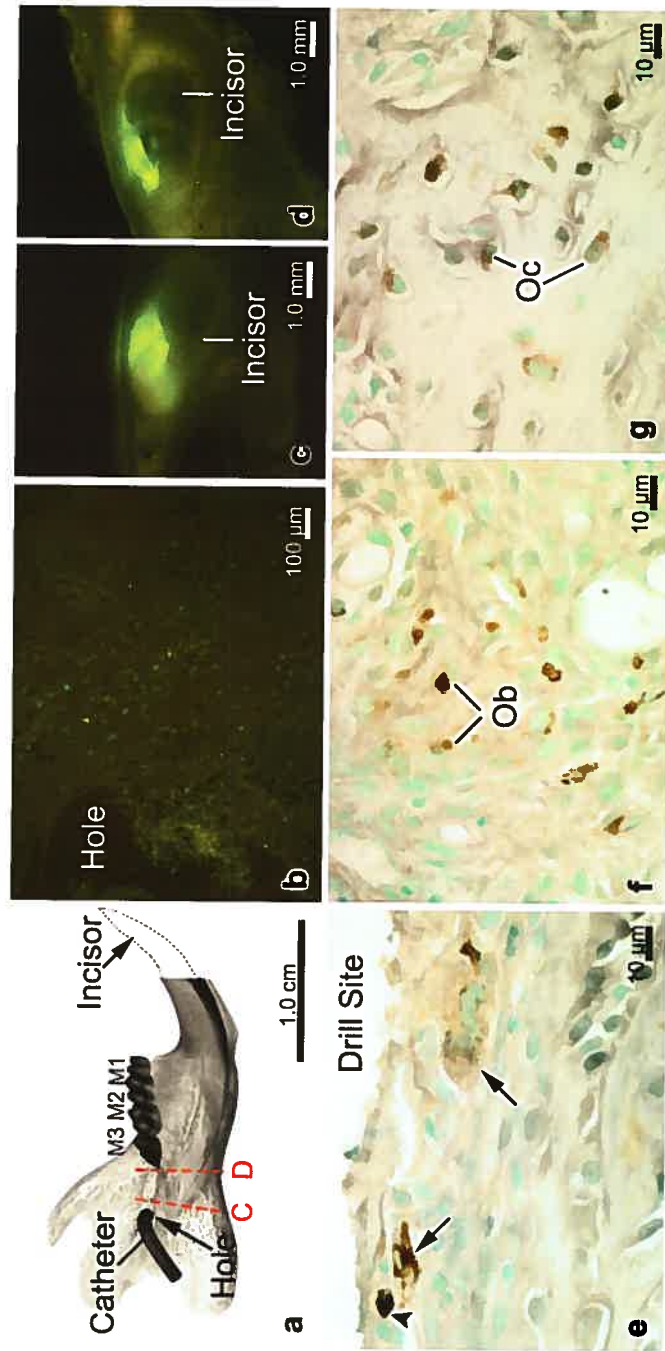


Figure 5

© Wazen *et al.* 2006

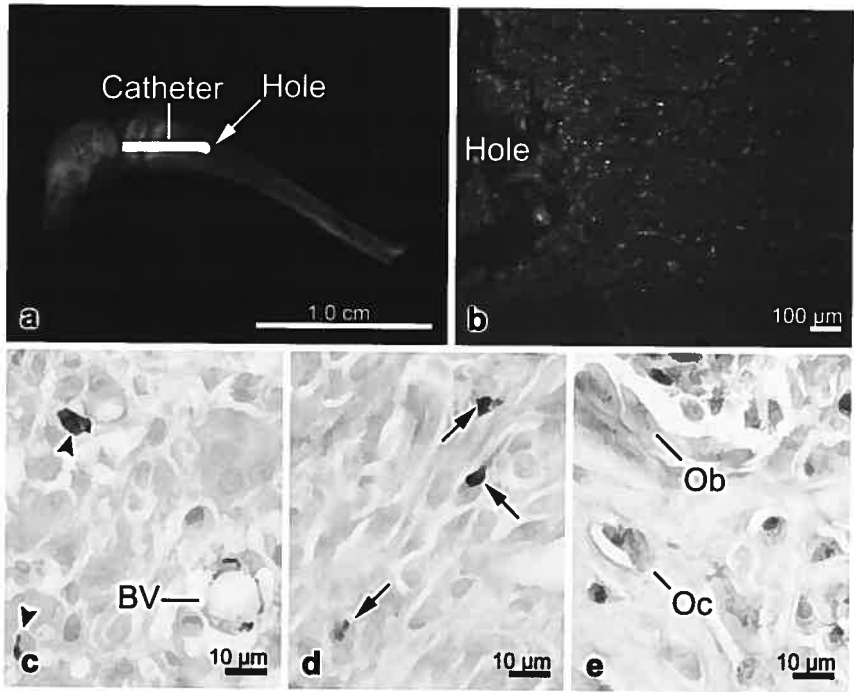
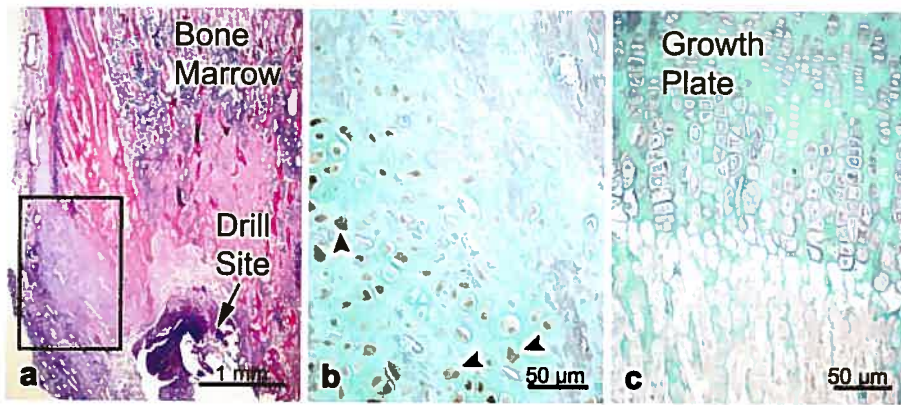


Figure 6

© Wazen et al. 2006





**Figure 7**

© Wazen *et al.* 2006

## Chapitre 5 - Discussion générale

Cette discussion intégrera les divers aspects méthodologiques, les résultats présentés dans les chapitres précédents et leurs points saillants en lien avec une revue critique de la littérature et rapportera leurs contributions par rapport aux travaux futurs.

### **La dynamique des protéines non-collagéniques circulantes : leurs localisations**

L'implication des PNCs lors de la régulation des événements cellulaires et matriciels de la calcification a été démontrée (revue de Nanci *et al.* 1999). La caractérisation de leur dynamique et leur localisation spécifique demeurent encore inconnues. Par exemple, il a été montré que les PNCs, tel que l'OPN, se retrouvent dans la circulation ainsi que dans les fluides corporels (revues de Sodek *et al.* 2000; Rittling *et al.* 2004). Toutefois, le rôle de ces protéines circulantes lors des événements ostéogéniques restent encore à déterminer. La présence de l'OPN dans les tissus calcifiés normaux et pathologiques a été expliquée par une production cellulaire locale de la protéine (Bellahcène *et al.* 1996). De plus, les diverses PNCs qui circulent sont généralement considérées comme des produits cataboliques de l'os en formation ou de la résorption osseuse sans aucune fonction à des sites distants. La seule autre étude *in vivo* traitant de la dynamique de l'OPN circulante a été faite par VandenBos *et al.* (1999). Même si l'injection systémique d'une grande dose d'OPN iodée a rendu difficile l'interprétation des résultats, cette étude laissait présager que l'OPN circulante pouvait contribuer à la formation des tissus calcifiés.

Dans le premier article, à l'aide de notre modèle expérimental, nous avons illustré que l'OPN, extraite de l'os de rat, conjuguée à un marqueur, peut être suivie dans le temps afin de localiser ses sites d'accumulation/action dans la matrice extracellulaire. Nous avons rapporté que lors de l'administration de l'OPN dans des conditions 'physiologiques', cette protéine non seulement adhère aux surfaces osseuses exposées mais, de façon inattendue, s'incorpore aussi dans l'os en formation. La grande affinité de l'OPN pour le minéral aurait pu nous laisser croire que les résultats de notre étude étaient prévisibles. Cependant, les protéines circulantes peuvent être séquestrées par les protéines du complément du Facteur H présentes dans la circulation sanguine ce qui les rendraient inaccessibles (Fedarko *et al.* 2000). Nos résultats suggèrent plutôt que la dynamique de liaison de l'OPN aux protéines du complément du Facteur H se fait graduellement ce qui permettrait à la molécule de se lier aux surfaces minéralisées et de s'y incorporer, ou alors, l'OPN possède une plus grande affinité pour la matrice minéralisée. Par conséquent, les PNCs circulantes auraient également un rôle actif et leurs fonctions ne se limitent pas à leur environnement local. En particulier, ces molécules circulantes pourraient être en mesure d'influencer les événements initiaux de calcification où seul un nombre limité de molécules serait nécessaire, le processus de remodelage osseux ou la formation des métastases osseuses. D'ailleurs, l'augmentation du taux sérique de l'OPN et de la BSP sont corrélées à une forte probabilité de développement de métastases (Seibel *et al.* 1996; Bellahcene *et al.* 1997; Fedarko *et al.* 2001). Les recherches dans ce domaine tentent même d'exploiter cet aspect pour le diagnostic précoce et l'évaluation de la progression de la tumeur (revue de Rittling *et al.* 2004).

L'OPN est une protéine impliquée dans l'inhibition de la formation des HA (Hunter *et al.* 1996). Cette propriété est largement attribuée aux groupements phosphates qui augmentent son caractère anionique et stabiliseraient la structure secondaire de la molécule. Les molécules d'OPN dérivées du lait, extraites de l'os et la protéine recombinante représentent différents isoformes de la protéine correspondant à des niveaux de phosphorylations variables (Prince *et al.* 1987; Sorensen *et al.* 1994; 1995). La protéine extraite du lait est la plus phosphorylée, alors que celle produite dans une cellule procaryote ne l'est pas. La forme hautement phosphorylée de l'OPN serait la plus propice à inhiber la formation des cristaux (revues de Sodek *et al.* 2000; Qin *et al.* 2004). En effet, des études *in vitro* ont démontré l'importance de cette modification post-traductionnelle sur l'activité de la protéine à inhiber la minéralisation en comparant ces divers isoformes d'OPN (Jono *et al.* 2000; Gericke *et al.* 2005). Le degré de phosphorylation affecte également la résorption osseuse par les ostéoclastes (Razzouk *et al.* 2002). Notre prochain objectif serait de définir l'importance de la phosphorylation sur la capacité de l'OPN à inhiber la formation des cristaux d'HA dans un contexte multifonctionnel *in vivo*, par exemple, la formation de foci de minéralisation au niveau des spicules mixtes de la plaque de croissance épiphysaire. Cette analyse nous permettrait de valider les résultats du chapitre 2 concernant l'incorporation de l'OPN à l'os en formation et son accumulation aux sites initiaux de minéralisation. De plus, elle nous informerait sur la contribution de la phosphorylation sur l'activité de l'OPN. Il serait aussi intéressant d'évaluer si le degré de phosphorylation influence le site d'accumulation de l'OPN dans le tissu osseux (*e.g.* lignes cémentantes vs espaces interfibrillaires).

L'infusion de l'OPN pourrait aussi se faire dans un modèle animal de formation *de novo* d'os comme celui de l'ablation de la moelle osseuse dont les étapes de formation de l'os sont bien caractérisées (Suva *et al.* 1993; Kuroda *et al.* 2005b). Cette approche est avantageuse puisqu'elle représente un modèle non pathologique du processus d'ossification de type membranaire localisé à un seul site anatomique. En effet, suite à l'ablation de la moelle, les cellules mésenchymateuses migrent et se différencient en ostéoblastes. La matrice osseuse est alors déposée sans former de cartilage. Il serait donc envisageable d'administrer l'OPN à différents temps de la réparation osseuse et ainsi déterminer le rôle de cette protéine lors de chaque étape.

### **La dynamique des protéines non-collagéniques circulantes : leurs fonctions**

Nos connaissances sur les propriétés et l'activité matricielle et cellulaire des PNCs ont largement été déduites de leur patron d'expression d'étude *in vitro* et de prédictions basées sur leur structure moléculaire. Les études *in silico* ont mis en évidence deux séquences poly [E] dans la région N-terminale de la BSP. Il a été établi que ces motifs participaient à l'activité de nucléation et, par conséquent, ils pourraient aussi influencer l'adhésion de la BSP aux HA (Hunter *et al.* 1996). Cependant, la démonstration *in vivo* de ces hypothèses n'a pas encore eu lieu. Dans le second article, nous avons utilisé une mini-pompe osmotique afin d'administrer et d'évaluer le rôle de variants moléculaires actifs sur le comportement de la BSP *in vivo*. Nos résultats ont démontré que la substitution des séquences poly [E] réduisait de façon significative la capacité de la protéine à interagir avec

la matrice extracellulaire minéralisée. De plus, ces données montrent, pour la première fois dans un contexte *in vivo* multifactoriel, que cette approche expérimentale peut être utilisée pour étudier l'aspect fonctionnel des protéines dans des conditions physiologiques.

L'analyse par Western blot des BSP utilisées dans cette étude indique que nos préparations protéiques contenaient des molécules intactes mais aussi des fragments de faible poids moléculaire. Ces derniers peuvent provenir de plusieurs sources. La production de la protéine recombinante de la BSP se fait généralement dans un système procaryotique, mais pour des raisons encore méconnues, ces vecteurs produisent en quantité minime des versions tronquées de la BSP (Stubbs, III 1996; 1997). Les conditions expérimentales pour la conjugaison au DNP pourraient être un autre facteur affectant la stabilité de la protéine et provoquant sa dégradation. Ceci complique et pourrait limiter l'interprétation de nos données. Néanmoins, nos résultats reflètent davantage la complexité du contexte biologique dans lequel les protéines se retrouvent. Yin *et al.* (2005) ont proposé que la capacité de liaison des protéines salivaires aux HA est grandement modifiée selon le nombre de protéines présentes dans le système d'étude *in vitro*. De plus, la fonction des protéines dépendrait des conditions expérimentales, de la concentration utilisée et même de leur structure secondaire (Stubbs, III *et al.* 1997; Tartaix *et al.* 2004; Gericke *et al.* 2005; Kandori *et al.* 2005). L'environnement biologique de même que le type cellulaire présent localement lors de l'ostéogenèse influencent aussi le rôle et les propriétés du BSP (Salih *et al.* 2002; Wang *et al.* 2006). Cependant, il serait important d'obtenir une fraction purifiée de la protéine pour déterminer sans équivoque son rôle, indépendamment des fragments. La

séparation des protéines par électrophorèse sur gel et l'immunobuvardage ne permettent pas de quantifier adéquatement le pourcentage relatif de chaque composante d'une préparation protéique. Il faudra donc recourir à la spectroscopie de masse pour évaluer de façon quantitative la pureté des préparations.

Les tissus calcifiés contiennent des enzymes qui clivent les PNCs en protéines de faible poids moléculaire afin de contrôler l'activité de ces molécules et ainsi réguler la formation des tissus (revues de Bartlett *et al.* 1999; Delaisse *et al.* 2003). Par exemple, la protéolyse de la DMP-1, génère une forme de 37 kDa et une de 57 kDa, et cette étape pourrait être cruciale durant l'ostéogenèse et la dentinogénèse (Qin *et al.* 2003). Il a initialement été suggéré que l'épissage alternatif de l'ARNm de la DSPP donnerait lieu à deux protéines majeures de la dentine, la sialoprotéine de la dentine (DSP) et la phosphoprotéine de la dentine (DPP) (MacDougall *et al.* 1997). Tout récemment, il a été démontré par Yamakoshi *et al.* (2006) que le « processing » enzymatique serait plutôt responsable de la production de 3 fragments de la DSPP qui auraient des activités différentes. Dans le cas des protéines amélaire AMEL et AMBN, celles-ci subissent également une dégradation enzymatique durant la formation de l'émail pour laisser place à la croissance des cristaux (Nanci *et al.* 1996; Smith *et al.* 1996). L'OPN figure aussi parmi les substrats des métalloprotéases matricielles et des protéases sériques et leurs actions modifieraient les propriétés d'adhésion cellulaire de la protéine (Smith *et al.* 1998; Agnihotri *et al.* 2001; Gao *et al.* 2004). La BSP n'est pas différente des autres PNCs et elle peut être aussi sujette à une dégradation extracellulaire par la métalloprotéinase matricielle 12 (Hou *et al.* 2004). Il a

même été rapporté que la BSP, suite à l'action de protéases endogènes, est présente sous forme de fragments d'environ 30-53 kDa qui seraient impliqués dans le contrôle du remodelage osseux (Kobayashi *et al.* 1996). Il semble donc que la fragmentation protéique soit un mécanisme commun pour plusieurs PNCs qui contribue à générer de multiples fonctions. L'infusion de formes fragmentées pourrait s'avérer une approche avantageuse pour déterminer la pertinence du clivage protéolytique dans la fonction des PNCs.

Les modifications post-traductionnelles de la BSP peuvent aussi contribuer aux fonctions de la protéine (Tye *et al.* 2003). Cette dernière étude *in vitro* avait démontré que la protéine extraite de l'os avait un pouvoir de nucléation des HA beaucoup plus grand que la forme recombinante de la BSP. La croissance des cristaux serait modulée par la phosphorylation, alors que la glycosylation affecte l'attachement des cellules (revue de Qin *et al.* 2004). L'importance de la glycosylation, de la phosphorylation ou des groupements de sulfate pourrait être évalué *in vivo*. Pour y arriver, nous devrions infuser au travers de la fenêtre chirurgicale, et comparer la capacité d'adhésion aux HA d'une BSP produite dans une cellule eucaryotique (avec ses modifications post-traductionnelles, 'BSP native') par rapport à une 'BSP native' dont les groupements poly [E] ont été mutés. Ce type de système cellulaire pour élaborer ces différentes protéines n'est disponible que dans certains laboratoires et les quantités produites sont encore limitées. Ces expériences apporteraient de précieuses informations quant à la contribution de ces groupements sur la capacité de la protéine à se lier aux HA.



Les propriétés de nucléation de la BSP sont en partie modulées par les motifs poly [E] (Hunter *et al.* 1993; Tye *et al.* 2003). Les études *in vitro* ont aussi démontré l'affinité de la BSP pour le collagène de type I (Chen *et al.* 1992c; Fujisawa *et al.* 1992; 1995; Tye *et al.* 2005). Cependant, les recherches à ce sujet sont limitées à des expériences *in vitro* qui ne représentent pas un environnement physiologique multifactoriel. Dans le but d'approfondir nos connaissances sur le rôle de la BSP lors de l'ostéogenèse, nous proposons de comparer l'activité de la BSP extraite de l'os, de la BSP recombinante native et mutante dans des modèles animaux de formation ou de réparation osseuse. Par exemple, ces protéines pourraient être infusées, pour une période d'au moins sept jours, dans des animaux ayant subi une ablation de la moelle osseuse. L'utilisation d'un animal BSP KO est favorisée puisque cela éliminerait la contribution de la BSP endogène et les effets observés seraient directement attribués à la protéine administrée. Les analyses histomorphométriques nous informeraient sur leur capacité à induire la formation de l'os. L'importance des sites de poly [E] et des modifications post-traductionnelles nous laisse croire que la forme native BSP extraite de l'os aurait une plus grande capacité de nucléation des HA et que l'ostéoïde formé contiendrait plus de foyers initiaux de minéralisation. Tel qu'il a été démontré par Wang *et al.* (2006), nous devrions observer une augmentation de la formation osseuse.

### **L'application du modèle de la fenêtre chirurgicale au transfert de gène**

Les recherches actuelles sur les pathologies permettent de mieux connaître leurs causes et les troubles engendrés par la maladie et d'identifier les processus importants afin d'établir

les stratégies thérapeutiques. Divers traitements 'classiques' à l'aide de protéines ou de molécules biologiques ont été développés mais les résultats sont souvent décevants. Cette 'protéothérapie' reste une approche lourde à mettre en application, nécessitant des productions importantes et coûteuses de protéines recombinantes hautement purifiées, ainsi que des injections répétées qui peuvent entraîner des effets secondaires indésirables. De plus, les protéines doivent atteindre leurs sites d'action et y rester suffisamment longtemps pour exprimer leurs activités. La thérapie génique consiste en l'insertion d'un gène dans une cellule et permet de surmonter ces inconvénients tout en permettant une sécrétion continue, stable et prolongée de la protéine dans un tissu cible. Dans le domaine des tissus calcifiés, son application est souvent limitée par l'accessibilité au tissu. Dans ce contexte, la combinaison du modèle de la fenêtre chirurgicale à une technique de transfert de gène s'avère un outil puissant pour transfecter directement les différents types cellulaires composant les tissus calcifiés. Dans le troisième article, nous avons utilisé un lentivirus encodant pour la protéine cytosolique GFP et la protéine amélaire sécrétée AMBN pour transfecter les tissus calcifiés. Nos résultats ont illustré la possibilité d'infecter efficacement les cellules ostéogéniques, l'organe de la dent ainsi que les tissus du parodonte. Cette voie d'administration associée à la thérapie génique permet d'obtenir des concentrations stables et éventuellement contrôlables de protéines dans un compartiment 'fermé'. De plus, cette infusion locale limite la diffusion, dans tout l'organisme, de la protéine thérapeutique, réduisant ainsi les effets secondaires liés à une injection systémique.

## **Les protéines amélares – une nouvelle catégorie d’agents thérapeutiques de l’os ?**

Récemment, des études ont mis en évidence l’origine évolutive commune des protéines amélares (AMEL, ENAM et AMBN), des protéines de la famille des SIBLINGs (DSPP, DMP-1, BSP, OPN, MEPE), des protéines salivaires ainsi que des caséines du lait (Kawasaki *et al.* 2003; 2004; 2005a; revue de Huq *et al.* 2005). D’ailleurs, les gènes de ces protéines, à l’exception de l’AMEL, se retrouvent toutes sur le même chromosome humain. Il a également été proposé que certaines PNCs amélares pourraient influencer le tissu osseux (Urist 1971; revue de Veis 2003) et le processus de cémentogénèse (Hammarstrom 1997). D’ailleurs, l’Emdogain<sup>®</sup>, un complexe de protéines amélares extrait de la dent de porc, est déjà approuvé pour le traitement de maladies parodontales (Hammarstrom 1997; revue de Venezia *et al.* 2004). Les succès de l’Emdogain<sup>®</sup> sont cependant controversés puisqu’il est composé entre autre, de protéines amélares et de leurs produits de dégradation et il contiendrait des traces de facteurs de croissance, compliquant ainsi l’attribution de l’activité biologique à une protéine spécifique (revues de Veis 2003; Venezia *et al.* 2004).

L’améloblastine pourrait représenter une nouvelle candidate ayant un potentiel pharmacologique. En effet, l’absence de cette protéine a un effet dramatique sur la formation de l’émail (Fukumoto *et al.* 2004). Elle a une origine commune avec les PNCs de l’os (Kawasaki *et al.* 2003) et, alors qu’on la croit exclusive à la dent, elle serait exprimée lors du développement de l’os craniofacial (Spahr *et al.* 2006) et de d’autres tissus mous (*e.g.* testicules, ovaires, poumon) (NCBI GEO Profiles). Elle a aussi été immunodéTECTÉE

dans les cellules mésenchymateuses de la pulpe durant les premiers stades de l'odontogénèse ainsi que dans les préodontoblastes et les odontoblastes avant la minéralisation de la dentine (Fong *et al.* 1996). De plus, les études *in vitro* ont suggéré qu'en présence de la protéine recombinante d'AMBN, l'adhésion et la prolifération des cellules du ligament parodontal sont augmentées (Zeichner-David *et al.* 2006). Enfin, l'application de la protéine purifiée d'AMBN dans un modèle animal de réparation dentinaire (Nakamura *et al.* 2006) et dans un modèle de régénération parodontale (Fukae *et al.* 2006; Kanazashi *et al.* 2006) témoignent de la possibilité de l'utiliser comme agent bioactif. Contrairement à l'AMEL contenue dans l'Emdogain<sup>®</sup>, ces effets observés peuvent être attribués directement à l'AMBN puisque les expériences ont été réalisées avec la protéine purifiée.

La culture cellulaire peut être utilisée comme système d'expression d'une protéine pour caractériser son rôle. Bien qu'il existe des modèles de cultures cellulaires pour étudier le développement et la différenciation des cellules ostéogéniques ou cartilagineuses, ceux pour l'organe de l'émail ne sont pas encore bien établis (Chen *et al.* 1992b; Kukita *et al.* 1992; Den Besten *et al.* 1998; Nakata *et al.* 2003). Ces derniers ne sont pas efficaces puisque certains marqueurs des améloblastes ne sont pas exprimés. La lignée de cellules osseuses de souris MC3T3 représente un modèle bien défini de culture cellulaire qui minéralise (Wang *et al.* 1999). De plus, il permettrait d'exprimer l'AMBN, indépendamment de la coexpression d'AMEL et d'ENAM, et ainsi évaluer son potentiel de minéralisation. Les expériences ultérieures serviront à déterminer si la surexpression de l'AMBN *in vitro* par

les ostéoblastes peut influencer l'activité cellulaire et le processus de minéralisation. Puisque l'AMBN est connue pour son rôle sur la promotion de la formation des cristaux de l'émail et sur leur élongation (Hu *et al.* 1997; Nanci *et al.* 1998), il serait souhaitable que cet effet se produise *in vitro*. Il reste que dans l'émail, l'AMBN subit une dégradation rapide par des enzymes (Bartlett *et al.* 1999). Les ostéoblastes sécrètent d'autres types de protéinases (Grant *et al.* 1999) qui pourraient eux aussi cliver l'AMBN. L'activité de la protéine sera probablement influencée par cette protéolyse, ce qui suggère que la fonction d'une protéine serait aussi déterminée par l'environnement dans laquelle elle se retrouve.

### **L'utilisation de la transgénèse dans les tissus calcifiés**

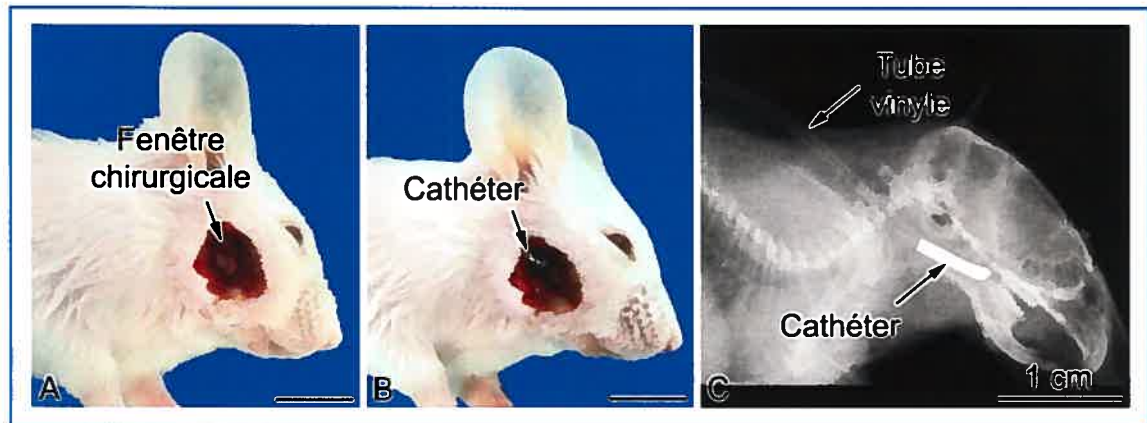
Nos travaux sur le transfert de gène montrent qu'il est possible de transférer les cellules de l'os et d'y exprimer de façon stable un transgène. Cette preuve de principe ouvre la porte à de nombreuses expériences exploitant le transfert de gènes pour étudier la fonction d'une protéine, ou pour déterminer son potentiel thérapeutique. Compte tenu de la relation évolutionnaire de certaines PNCs, il serait intéressant d'évaluer si une protéine pertinente à la minéralisation dans un tissu est susceptible d'affecter la formation d'un autre tissu. Les sections qui suivent décriront certaines de ces possibilités ainsi que les aspects techniques auxquels il faudra porter une attention particulière pour l'expression optimale et contrôlée des gènes :

1. Rétablir le phénotype d'un animal KO
2. Construire un vecteur viral dont le promoteur inductible et spécifique

3. Créer des animaux localement transgénique
4. Cibler des cellules souches pour une utilisation à des fins thérapeutiques

### **Le rétablissement d'un phénotype par une approche de transfert de gène**

Une des approches pour étudier la fonction d'un gène consiste à créer un animal KO. Plusieurs animaux KO pour les PNCs majeurs des tissus calcifiés telles que la BSP, l'OPN et l'ostéocalcine (OC) ne présentent aucun phénotype ou défaut apparent (Karsenty 1999; Fisher *et al.* 2003; Feng *et al.* 2003). Dans certains cas, l'effet n'apparaît qu'à l'âge adulte (Ye *et al.* 2004) ou lorsqu'un défaut osseux est créé (Liaw *et al.* 1998). L'absence de phénotype marqué s'expliquerait par le fait qu'il existe des mécanismes de compensation pour les processus fondamentaux régulés par ces PNCs qui s'enclenchent lorsque le profil génétique de l'animal est modifié. Le système de la mini-pompe s'avère flexible tant pour l'administration de protéines que pour le transfert de gène. Le phénotype d'un animal pourrait être réchappé localement (*knock-in*) en introduisant le gène d'intérêt. Notre approche a été adaptée à la souris, ouvrant ainsi la porte aux études chez les animaux présentant des maladies osseuses et dentaires ayant des profils génétiques bien définis (Figure 3, page 145). Néanmoins, il reste applicable à tous les autres animaux. Puisque l'infusion est locale, l'effet est restreint au site chirurgical n'engendrant pas d'effets secondaires ou de mécanismes compensatoires.



**Figure 3 : La fenêtre chirurgicale adaptée à la souris.** (A, B) Notre approche chirurgicale a récemment été développée chez la souris. L'administration d'agents pharmacologiques peut ainsi être faite chez les animaux présentant des troubles génétiques osseux ou dentaires. (C) Radiographie, latéro-latérale, d'une souris illustrant la position du cathéter de métal dans l'hémimandibule.

### **Le promoteur - un choix judicieux pour contrôler l'expression du transgène**

Un aspect inévitable lorsque l'on utilise le transfert de gène est de pouvoir contrôler la durée, le moment et le niveau d'expression du gène même s'il s'est intégré dans le génome. Évidemment, ceci augmente la complexité du construit viral mais demeure essentiel, compte tenu la diversité des applications. Par exemple, dans le cas de l'ostéoporose, l'expression du gène doit être stable à long terme, alors que dans un cas d'une réparation d'un défaut osseux, elle doit être présente jusqu'à ce que l'on obtienne l'effet physiologique escompté. Un point limitant de notre approche est que le gène transféré est sous le contrôle du promoteur constitutif EF1-alpha, c'est-à-dire que l'expression de la protéine d'intérêt est continue. Les recherches actuelles dans ce domaine ont apporté plusieurs modifications au

système régulable à la tétracycline développé initialement par Gossen et Bujard (1992; 1995). La présence de la tétracycline ou de son analogue, la doxycycline, (revues de Gossen *et al.* 2002; Wiznerowicz *et al.* 2006) inhibe (système TetOff) ou stimule (système TetOn) l'expression du gène cible.

D'autres systèmes sont basés sur les propriétés des molécules immunosuppressives comme la rapamycine (revue de Zoltick *et al.* 2001). Ce dernier procédé repose sur le contrôle de la dimérisation de deux protéines, inactives à l'état de monomère, et qui constituent un facteur de transcription en hétérodimère ayant la capacité d'activer le promoteur. Dans le cas des lentivirus, puisque le gène est intégré dans le génome, l'administration de l'antibiotique réactiverait ou inhiberait l'expression du gène, et ce, sans réinjecter de virus (Kafri *et al.* 2000; revue de Weber *et al.* 2004; Blesch *et al.* 2005; Barde *et al.* 2006; Szulc *et al.* 2006). Il serait également intéressant de créer un promoteur qui s'activerait en réponse à un stimulus local tel qu'une réaction inflammatoire dans le cas de l'arthrite rhumatoïde (Varley *et al.* 1998).

Le but ultime de la thérapie génique dans le domaine des tissus calcifiés est de développer un vecteur viral ayant la capacité d'infecter spécifiquement les cellules ostéogéniques, afin d'obtenir une réponse physiologique optimale. Une surexpression non contrôlée d'une protéine comporte de nombreux risques tels qu'un dysfonctionnement de la signalisation cellulaire ou une formation ectopique de tissus calcifiés. Cet aspect peut être comblé en plaçant le transgène sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux cellules cibles qui



s'activerait à un niveau et à un temps appropriés. Par exemple, afin de limiter l'expression aux ostéoblastes, on peut penser au promoteur de l'OC (revue de Lian *et al.* 2000; Kumar *et al.* 2005; Li *et al.* 2006) ou à celui du collagène de type I (Stover *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2005) qui ont déjà été testés. Contrairement aux promoteurs ubiquitaires (*e.g.* cytomégalo virus,  $\beta$ -actine, EF1-alpha), ces promoteurs permettent une expression génique spécifique aux cellules osseuses. Cependant, les niveaux d'expression qu'ils génèrent sont généralement plus faibles que ceux obtenus par des promoteurs ubiquitaires. L'insertion d'éléments de régulation post-traductionnels dans la cassette d'expression du transgène, tel que le *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (WPRE) peut remédier à cette situation (revue de Verma *et al.* 2005). Il serait possible d'infecter une population de cellules de la moelle osseuse et seules les cellules ayant un potentiel ostéogénique exprimeraient le transgène. Avant de poursuivre nos travaux sur le transfert de gène, il serait important de considérer, lors de la construction de vecteurs viraux, l'utilisation et l'évaluation de différents types de promoteurs. La recherche dans le domaine a fait beaucoup de progrès et donc nous n'envisageons aucune difficulté à créer un tel vecteur pour l'AMBN.

### **Application de lentivirus pour créer des animaux transgéniques**

La transgénèse animale est utilisée pour ajouter, inactiver ou remplacer spécifiquement un gène d'intérêt dans un animal afin d'étudier son fonctionnement et les mécanismes de régulation des fonctions biologiques. Leur production se fait essentiellement par la

microinjection d'ADN ou par le transfert de gène à l'aide de cellules souches embryonnaires (revue de Babinet 2000). La première méthode consiste en l'introduction d'un gène d'intérêt dans le pronucléus d'un ovocyte fécondé ce qui entraîne l'expression du gène. Ce principe est simple mais son faible rendement, l'intégration aléatoire du transgène et le nombre indéterminé de copies du gène inséré limitent son utilisation. L'autre approche repose sur l'insertion préalable d'une séquence d'ADN dans une culture *in vitro* de cellules souches embryonnaires avec ou sans recombinaison homologue. Ces cellules non-différenciées sont sélectionnées par différents marqueurs puis transplantées dans un embryon au stade de blastocyte. Ainsi, on peut choisir le site d'intégration du transgène ou le nombre de copies de gène insérés. Cette étape de pré-sélection peut s'avérer très longue. Plusieurs générations d'animaux sont ensuite produites pour obtenir une lignée de souris homozygotes. Puisque les lignées de cellules souches embryonnaires ont été établies chez la souris, cette approche n'est possible que chez cet animal.

Le développement des dernières années dans le domaine des lentivirus se dirige vers une application pour créer des animaux transgéniques (revue de Pfeifer 2004). Le vecteur viral, contenant le gène d'intérêt, transfecte aussi bien les cellules mitotiques que quiescentes (spermatogonie, embryon au stade d'une cellule, cellules souches embryonnaires) (Hamra *et al.* 2002; Lois *et al.* 2002; Pfeifer *et al.* 2002). Cette approche est simple, efficace et peu coûteuse. L'intégration du gène dans l'ADN de la cellule hôte assure une transmission homogène à sa progéniture (Lois *et al.* 2002; van den *et al.* 2004). De plus, son utilisation n'est pas limitée à la souris (Chapman *et al.* 2004; Dann *et al.* 2006).

Il est aussi maintenant concevable d'inactiver un gène d'intérêt, de façon spécifique, et ainsi évaluer son implication fonctionnelle dans des conditions physiologiques. Le processus d'ARN interférent (ARNi) correspond à un mécanisme de défense intracellulaire naturel face à une infection virale (revues de Brantl 2002; Agrawal *et al.* 2003). L'ARN infectieux s'associe à de petits fragments d'ARN (*small interfering RNA, siRNA*), crée une région double brin qui active le système de défense de la cellule et entraîne la dégradation de l'ARNm. L'absence, même partielle, de la protéine correspondante (*knock-down*) peut mimer l'inactivation du gène et servirait donc de 'phénotype KO' que l'on peut examiner (Tiscornia *et al.* 2003; revue de Ichim *et al.* 2004; Song *et al.* 2006; Szulc *et al.* 2006). Cette approche combinée à la thérapie génique par les lentivirus et au modèle de la fenêtre chirurgicale offrent des perspectives innovatrices pour la conception d'animaux 'localement' *knock-down* ou *knock-in* afin d'étudier la fonction d'une grande variété de PNCs, même ceux ayant plusieurs isoformes. Il ne serait donc plus nécessaire de créer un animal transgénique complet évitant ainsi d'enclencher les mécanismes de compensation pour les processus fondamentaux régulés par les PNCs.

### **Le ciblage des cellules souches et applications de la transgénèse locale à des fins thérapeutiques**

Le tissu osseux est une structure dynamique en perpétuel remaniement : il est continuellement produit par les ostéoblastes, modifié par les ostéocytes et détruit par les ostéoclastes (Nanci *et al.* 2003). Dans le cas des os longs comme le fémur ou le tibia, le périoste est hautement vascularisé et constitue l'enveloppe externe autour de l'os cortical.

Le périoste abrite des cellules mésenchymateuses, des cellules ostéoprogénitrices et des ostéoblastes. Si l'on infecte une cellule différenciée comme un ostéoblaste, le transgène sera exprimé seulement pour un temps limité, c'est-à-dire pour la durée de vie de la cellule. Il est clair que toute approche thérapeutique à long terme devra cibler un compartiment précurseur puisque ces cellules pluripotentes se différencient lorsqu'elles sont stimulées lors d'une réparation ou une régénération tissulaire. Dans ce contexte, les résultats décrits dans le chapitre 4 sur l'administration de lentivirus dans le tibia supportent cette idée. Le lentivirus ayant infecté des cellules précurseurs du périoste, celles-ci ont intégré le gène d'intérêt dans leur génome et se sont ensuite différenciées en chondrocytes. Au niveau de l'hémimandibule, la position de la fenêtre chirurgicale dans la partie apicale de l'incisive a également permis de cibler les cellules progénitrices de l'organe dentaire. L'administration de lentivirus à l'aide du modèle de la fenêtre chirurgicale s'avèrerait donc un procédé efficace pour transfecter les cellules souches.

Les résultats du chapitre 4 représentent une preuve de principe incontournable et essentielle de notre approche d'infusion locale pour la thérapie génique. L'étape suivante sera d'étudier le mécanisme d'action et d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'AMBN. Une expérience éventuelle serait d'administrer le lentivirus codant pour l'AMBN, à l'aide d'une mini-pompe osmotique, dans un animal ayant subi une ablation de la moelle osseuse (Suva *et al.* 1993; Kuroda *et al.* 2005b). Suite à la transduction de ces cellules par le lentivirus, la protéine s'incorporerait dans la matrice en formation et nous permettrait de déterminer,

sans équivoque, l'effet thérapeutique direct de l'AMBN sur la formation et la résorption osseuse.

Il est à noter que l'approche de transgénèse locale ne se limite pas seulement aux protéines matricielles, elle peut aussi être appliquée à des facteurs de transcription (*e.g.* SOX-9), à des molécules de signalisation et à des enzymes (*e.g.* phosphatase alcaline) impliqués dans le développement et la biologie de l'os. Par exemple, l'endopeptidase PHEX membranaire est fortement exprimée dans l'os, les dents et divers tissus mous (Kuroda *et al.* 2005a; revue de The Hyp Consortium 1995). En effet, cette enzyme régulerait la réabsorption rénale du phosphate en contrôlant l'activité de la molécule circulante phosphatonine (Rowe 1997; Ruchon *et al.* 1998b). La mutation de ce gène conduirait à une présence accrue de la phosphatonine dans la circulation et donc à une forme d'hypophosphatémie. Ces animaux ont un défaut de minéralisation qui résulte en une augmentation de l'ostéoïde (Ruchon *et al.* 1998a). Les études actuelles ont montré que l'introduction du gène PHEX dans un animal déficient pouvait mener au rétablissement partiel du phénotype osseux (Ruchon *et al.* 2000; Bai *et al.* 2002; Liu *et al.* 2002). Une forme soluble de PHEX a aussi été élaborée (Erben *et al.* 2005) et pourrait être un jour utilisée pour le traitement de cette maladie. L'emploi d'un lentivirus codant pour le gène de PHEX dans un animal hypophosphatémique serait une alternative pour l'expression locale et ciblée aux cellules ostéogéniques. Ces études permettraient des avancées majeures dans la compréhension de ses mécanismes d'action dans les tissus calcifiés.

## Conclusion

Une connaissance et une caractérisation approfondies des événements cellulaires et extracellulaires menant à la formation des tissus calcifiés sont essentielles afin de développer des agents bioactifs à action spécifique pour le traitement de leurs pathologies. Les PNCs représentent des composantes mineures des tissus minéralisés, mais elles y jouent un rôle essentiel. Malgré les nombreuses études dans ce domaine, leur dynamique et leur fonction précise durant ce processus restent encore obscures.

Le système de mini-pompe osmotique permet d'infuser des agents pharmacologiques dans une fenêtre chirurgicale afin de cibler aussi bien le tissu osseux que les tissus de l'organe dentaire. Ce travail nous a permis de démontrer i) l'implication de l'OPN circulante durant la formation osseuse, ii) l'importance de variants moléculaires de la BSP sur sa capacité à interagir avec les HA et iii) sa combinaison au transfert de gène permet de transférer efficacement les tissus calcifiés.

Notre modèle d'infusion locale n'est pas seulement limité aux PNCs des tissus calcifiés, il serait aussi approprié pour étudier le mécanisme d'action de diverses molécules, incluant les facteurs de transcription, les enzymes et les molécules de signalisation. L'administration locale de vecteurs viraux, créés à l'aide des outils disponibles dans le domaine de la biologie moléculaire (*e.g.* ARNi, système Cre-LoxP, promoteur spécifique), nous permettra d'obtenir diverses conditions transgéniques qui faciliteront le dépistage et l'analyse

fonctionnelle de plusieurs gènes. L'adaptation du modèle de la fenêtre chirurgicale à la souris offre maintenant la possibilité d'étudier la fonction des PNCs autant dans les animaux normaux que ceux présentant des défauts génétiques osseux ou dentaires.

Les maladies des tissus calcifiés ont un impact majeur sur la qualité de la vie d'une grande proportion de la population et entraînent des coûts élevés à la société. Les nouvelles perspectives pour examiner *in vivo* les aspects fonctionnels des PNCs et l'utilisation de la thérapie génique pour en moduler l'expression apporteront des informations utiles quant à la compréhension de la morphogenèse des tissus calcifiés et pourront un jour apporter des solutions thérapeutiques à ses diverses maladies telles que l'athérosclérose et les métastases osseuses.

## Bibliographie

Agnihotri, R., Crawford, H. C., Haro, H., Matrisian, L. M., Havrda, M. C. and Liaw, L.

Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 28261-28267.

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. and

Mukherjee, S. K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003, 67: 657-685.

Alden, T. D., Beres, E. J., Laurent, J. S., Engh, J. A., Das, S., London, S. D., Jane, J. A.,

Hudson, S. B. and Helm, G. A. The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. *J. Craniofac. Surg.*, 2000, 11: 24-30.

Alford, A. I. and Hankenson, K. D. Matricellular proteins: extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone*, 2006, 38: 749-757.

Ashinoff, R. L., Cetrulo, C. L., Jr., Galiano, R. D., Dobryansky, M., Bhatt, K. A., Ceradini,

D. J., Michaels, J., McCarthy, J. G. and Gurtner, G. C. Bone morphogenetic protein-2 gene therapy for mandibular distraction osteogenesis. *Ann. Plast. Surg.*, 2004, 52: 585-590.



Ashkar, S., Weber, G. F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M. E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Glimcher, M. J. and Cantor, H. Eta-1 (Osteopontin): An early component of type-1 (Cell-Mediated) Immunity. *Science*, 2000, 287: 860-864.

Aubin, J. E., Gupta, A., Zirngibl, R., and Rossant, J. Bone sialoprotein knockout mice have bone abnormalities. *Bone*. 1995, 17: 557-596.

Babinet, C. Transgenic mice: an irreplaceable tool for the study of mammalian development and biology. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2000, 11: S88-S94.

Bai, X., Miao, D., Panda, D., Grady, S., McKee, M. D., Goltzman, D. and Karaplis, A. C. Partial rescue of the Hyp phenotype by osteoblast-targeted PHEX (Phosphate-Regulating Gene with Homologies to Endopeptidases on the X-Chromosome) expression. *Mol. Endocrinol.*, 2002, 16: 2913-2925.

Baltzer, A. W., Lattermann, C., Whalen, J. D., Ghivizzani, S., Wooley, P., Krauspe, R., Robbins, P. D. and Evans, C. H. Potential role of direct adenoviral gene transfer in enhancing fracture repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2000a, S120-S125.

Baltzer, A. W., Lattermann, C., Whalen, J. D., Wooley, P., Weiss, K., Grimm, M., Ghivizzani, S. C., Robbins, P. D. and Evans, C. H. Genetic enhancement of fracture repair: healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther.*, 2000b, 7: 734-739.

Baltzer, A. W. and Lieberman, J. R. Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene Ther.*, 2004, 11: 344-350.

Barde, I., Zanta-Boussif, M. A., Paisant, S., Leboeuf, M., Rameau, P., Delenda, C. and Danos, O. Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. *Mol. Ther.*, 2006, 13: 382-390.

Bartlett, J. D. and Simmer, J. P. Proteinases in developing dental enamel. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1999, 10: 425-441.

Bautista, D. S., Saad, Z., Chambers, A. F., Tonkin, K. S., O'Malley, F. P., Singhal, H., Tokmakejian, S., Bramwell, V. and Harris, J. F. Quantification of osteopontin in human plasma with an ELISA: Basal levels in pre- and postmenopausal women. *Clin. Biochem.*, 1996, 29: 231-239.

Bellahcène, A., Albert, V., Pollina, L., Basolo, F., Fisher, L. W. and Castronovo, V. Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer. *Thyroid*, 1998, 8: 637-641.

Bellahcene, A., Bonjean, K., Fohr, B., Fedarko, N. S., Robey, F. A., Young, M. F., Fisher, L. W. and Castronovo, V. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ. Res.*, 2000, 86: 885-891.

Bellahcene, A. and Castronovo, V. Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. *Bull. Cancer*, 1997, 84: 17-24.

Bellahcène, A., Kroll, M., Liebens, F. and Castronovo, V. Bone sialoprotein expression in primary human breast cancer is associated with bone metastases development. *J. Bone Miner. Res.*, 1996, 11: 665-670.

Bellahcène, A., Maloujahnoum, N., Fisher, L. W., Pastorino, H., Tagliabue, E., Ménard, S. and Castronovo, V. Expression of bone sialoprotein in human lung cancer. *Calcif. Tissue Int.*, 1997, 61: 183-188.

Bellahcène, A., Merville, M.-P. and Castronovo, V. Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer. *Cancer Res.*, 1994, 54: 2823-2826.

Beniash, E., Simmer, J. P. and Margolis, H. C. The effect of recombinant mouse amelogenins on the formation and organization of hydroxyapatite crystals in vitro. *J. Struct. Biol.*, 2005, 149: 182-190.

Berkovitz, B. K. B. The effect of root transection and partial root resection on the unimpeded eruption rate of the rat incisor. *Arch. Oral Biol.*, 1971a, 16: 1033-1043.

Berkovitz, B. K. B. The healing process in the incisor tooth socket of the rat following root resection and exfoliation. *Arch. Oral Biol.*, 1971b, 16: 1045-1054.

Berkovitz, B. K. B. and Thomas, N. R. Unimpeded eruption in the root-resected lower incisor of the rat with a preliminary note on root transection. *Arch. Oral Biol.*, 1969, 14: 771-780.

Bianco, P., Fisher, L. W., Young, M. F., Termine, J. D. and Gehron Robey, P. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif. Tissue Int.*, 1991, 49: 421-426.

Bianco, P., Riminucci, M., Silvestrini, G., Bonucci, E., Termine, J. D., Fisher, L. W. and Gehron Robey, P. Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post- Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix. *J. Histochem. Cytochem.*, 1993, 41: 193-203.

Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A. and Anderson, W. F. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 1995, 270: 475-480.

Blesch, A., Conner, J., Pfeifer, A., Gasmi, M., Ramirez, A., Britton, W., Alfa, R., Verma, I. and Tuszynski, M. H. Regulated lentiviral NGF gene transfer controls rescue of medial septal cholinergic neurons. *Mol. Ther.*, 2005, 11: 916-925.

Boissier, M. C. and Bessis, N. Therapeutic gene transfer for rheumatoid arthritis. *Reumatismo.*, 2004, 56: 51-61.

Bornstein, P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J. Cell Biol.*, 1995, 130: 503-506.

Bornstein, P. and Sage, E. H. Matricellular proteins: Extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, 14: 608-616.

Boskey, A. L. Biomineralization: An overview. *Connect. Tissue Res.*, 2003, 44: 5-9.

Boskey, A. L., Spevak, L., Paschalis, E., Doty, S. B. and McKee, M. D. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif. Tissue Int.*, 2002, 71: 145-154.

Bosshardt, D. D. and Nanci, A. Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1998, 46: 135-142.

- Brantl, S. Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1575: 15-25.
- Breitbart, A. S., Grande, D. A., Mason, J. M., Barcia, M., James, T. and Grant, R. T. Gene-enhanced tissue engineering: applications for bone healing using cultured periosteal cells transduced retrovirally with the BMP-7 gene. *Ann. Plast. Surg.*, 1999, 42: 488-495.
- Brookes, S. J., Kirkham, J., Shore, R. C., Wood, S. R., Slaby, I. and Robinson, C. Amelin extracellular processing and aggregation during rat incisor amelogenesis. *Archs. Oral Biol.*, 2001, 46: 201-208.
- Bryer, L. W. An experimental evaluation of physiology on tooth eruption. *Int. Dent. J.*, 1957, 7: 432-478.
- Cerny, R., Slaby, I., Hammarström, L. and Wurtz, T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J. Bone Miner. Res.*, 1996, 11: 883-891.
- Chapman, S. C., Lawson, A., MacArthur, W. C., Wiese, R. J., Loechel, R. H., Burgos-Trinidad, M., Wakefield, J. K., Ramabhadran, R., Mauch, T. J. and Schoenwolf, G. C. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development*, 2004, 132: 935-940.

Chellaiah, M. A., Kizer, N., Biswas, R., Alvarez, U., Strauss-Schoenberger, J., Rifas, L., Rittling, S. R., Denhardt, D. T. and Hruska, K. A. Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol. Biol. Cell*, 2003, 14: 173-189.

Chen, J., Shapiro, H. S. and Sodek, J. Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J. Bone Miner. Res.*, 1992a, 7: 987-997.

Chen, J., Shapiro, H. S., Wrana, J. L., Reimers, S., Heersche, J. N. M. and Sodek, J. Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineralized tissue formation in fetal rat tissues by *in situ* hybridization. *Matrix*, 1991, 11: 133-143.

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

Chen, Y., Bal, B. S. and Gorski, J. P. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J. Biol. Chem.*, 1992c, 267: 24871-24878.

Chen, Y., Luk, K. D., Cheung, K. M., Xu, R., Lin, M. C., Lu, W. W., Leong, J. C. and Kung, H. F. Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors. *Gene Ther.*, 2003, 10: 1345-1353.

Crawford, H. C., Matrisian, L. M. and Liaw, L. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression *in vivo*. *Cancer Res.*, 1998, 58: 5206-5215.

Dai, J., Rabie, A. B., Hagg, U. and Xu, R. Alternative gene therapy strategies for the repair of craniofacial bone defects. *Curr. Gene Ther.*, 2004, 4: 469-485.

Dann, C. T., Alvarado, A. L., Hammer, R. E. and Garbers, D. L. Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, 103: 11246-11251.

Delaisse, J. M., Andersen, T. L., Engsig, M. T., Henriksen, K., Troen, T. and Blavier, L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc. Res. Tech.*, 2003, 61: 504-514.

Den Besten, P. K., Mathews, C. H. E., Gao, C. and Li, W. Primary culture and characterization of enamel organ epithelial cells. *Connect. Tissue Res.*, 1998, 39: 3-8.

Denhardt, D. T., Giachelli, C. M. and Rittling, S. R. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001a, 41: 723-749.

Denhardt, D. T. and Noda, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J. Cell. Biochem.*, 1998, Suppl.30-31: 92-102.



Denhardt, D. T., Noda, M., O'Regan, A. W., Pavlin, D. and Berman, J. S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J. Clin. Invest.*, 2001b, 107: 1055-1061.

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

Dhamija, S. and Krebsbach, P. H. Role of Cbfa1 in ameloblastin gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 35159-35164.

Diel, I. J., Solomayer, E. F., Seibel, M. J., Pfeilschifter, J., Maisenbacher, H., Gollan, C., Pecherstorfer, M., Conradi, R., Kehr, G., Boehm, E., Armbruster, F. P. and Bastert, G. Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastasis. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5: 3914-3919.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L. and Karsenty, G. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89: 747-754.

Ellis, J. and Bernstein, A. Gene targeting with retroviral vectors: recombination by gene conversion into regions of nonhomology. *Mol. Cell Biol.*, 1989, 9: 1621-1627.

Erben, R. G., Mayer, D., Weber, K., Jonsson, K., Juppner, H. and Lanske, B. Overexpression of human PHEX under the human beta-actin promoter does not fully rescue the Hyp mouse phenotype. *J. Bone Miner. Res.*, 2005, 20: 1149-1160.

Evans, C. H., Ghivizzani, S. C. and Robbins, P. D. The 2003 Nicolas Andry Award. Orthopaedic gene therapy. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2004, 316-329.

Fedarko, N. S., Fohr, B., Robey, P. G., Young, M. F. and Fisher, L. W. Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 16666-16672.

Fedarko, N. S., Jain, A., Karadag, A. and Fisher, L. W. Three small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs) bind and activate specific matrix metalloproteinases. *FASEB J.*, 2004, 18: 734-736.

Fedarko, N. S., Jain, A., Karadag, A., Van Eman, M. R. and Fisher, L. W. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2001, 7: 4060-4066.

Federico, M. *Lentivirus gene engineering protocols*. Humana Press, New Jersey, 2003, Volume 229

Feng, J. Q., Huang, H., Lu, Y., Ye, L., Xie, Y., Tsutsui, T. W., Kunieda, T., Castranio, T., Scott, G., Bonewald, L. B. and Mishina, Y. The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J. Dent. Res.*, 2003, 82: 776-780.

Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J., Diekwisch, T. G. H., Lyaruu, D. M., Wright, J. T., Bringas, P. Jr. and Slavkin, H. C. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J. Struct. Biol.*, 1995, 115: 50-59.

Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J. and Simmer, J. P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.*, 1999, 126: 270-299.

Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J., Simmer, J. P., Sarte, P., Lau, E. C., Diekwisch, T. and Slavkin, H. C. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J. Struct. Biol.*, 1994, 112: 103-109.

Fisher, L. W. and Fedarko, N. S. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect. Tissue Res.*, 2003, 44 Suppl 1: 33-40.

Fisher, L. W., Torchia, D. A., Fohr, B., Young, M. F. and Fedarko, N. S. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 280: 460-465.

Fisher, L. W., Whitson, S. W., Avioli, L. V. and Termine, J. D. Matrix sialoprotein of developing bone. *J. Biol. Chem.*, 1983, 258: 12723-12727.

Fong, C. D., Slaby, I. and Hammarström, L. Amelin: An enamel-related protein, transcribed in the cells of epithelial root sheath. *J. Bone Miner. Res.*, 1996, 11: 892-898.

Franceschi, R. T. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J. Dent. Res.*, 2005, 84: 1093-1103.

Fujisawa, R. and Kuboki, Y. Affinity of bone sialoprotein and several other bone and dentin acidic proteins to collagen fibrils. *Calcif. Tissue Int.*, 1992, 51: 438-442.

Fujisawa, R., Nodasaka, Y. and Kuboki, Y. Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen. *Calcif. Tissue Int.*, 1995, 56: 140-144.

Fukae, M., Kanazashi, M., Nagano, T., Tanabe, T., Oida, S. and Gomi, K. Porcine sheath proteins show periodontal ligament regeneration activity. *Eur. J. Oral Sci.*, 2006, 114: 212-218.

Fukumoto, S., Kiba, T., Hall, B., Iehara, N., Krebsbach, P. H., Nanci, A., Kulkarni, A. B. and Yamada, Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J. Cell Biol.*, 2004, 167: 973-983.

Ganss, B., Kim, R. H. and Sodek, J. Bone sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1999, 10: 79-98.

Gao, Y. A., Agnihotri, R., Vary, C. P. H. and Liaw, L. Expression and characterization of recombinant osteopontin peptides representing matrix metalloproteinase proteolytic fragments. *Matrix Biol.*, 2004, 23: 457-466.

Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W. T., Sorensen, E. S. and Boskey, A. L. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif. Tissue Int.*, 2005, 77: 45-54.

Ghazizadeh, S., Katz, A. B., Harrington, R. and Taichman, L. B. Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2004, 9: 269-275.

Giachelli, C. M., Bae, N., Almeida, M., Denhardt, D. T., Alpers, C. E. and Schwartz, S. M. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92: 1686-1696.

Giachelli, C. M. and Steitz, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*, 2000, 19: 615-622.

Gibson, C. W., Yuan, Z. A., Hall, B., Longenecker, G., Chen, E. H., Thyagarajan, T., Sreenath, T., Wright, J. T., Decker, S., Piddington, R., Harrison, G. and Kulkarni, A. B.

Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 31871-31875.

Goldberg, H. A., Warner, K. J., Li, M. C. and Hunter, G. K. Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connect. Tissue Res.*, 2001, 42: 25-37.

Goldberg, M., Lacerda-Pinheiro, S., Jegat, N., Six, N., Septier, D., Priam, F., Bonnefoix, M., Tompkins, K., Chardin, H., Denbesten, P., Veis, A. and Poliard, A. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent. Clin. North Am.*, 2006, 50: 277-98, x.

Gorski, J. P., Wang, A., Lovitch, D., Law, D., Powell, K. and Midura, R. J. Extracellular bone acidic glycoprotein-75 defines condensed mesenchyme regions to be mineralized and localizes with bone sialoprotein during intramembranous bone formation. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 25455-25463.

Gossen, M. and Bujard, H. Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu. Rev. Genet.*, 2002, 36: 153-173.

Gossen, M. and Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992, 89: 5547-5551.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W. and Bujard, H.

Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, 268: 1766-1769.

Gouze, E., Pawliuk, R., Gouze, J. N., Pilapil, C., Fleet, C., Palmer, G. D., Evans, C. H., Leboulch, P. and Ghivizzani, S. C. Lentiviral-mediated gene delivery to synovium: potent intra-articular expression with amplification by inflammation. *Mol. Ther.*, 2003, 7: 460-466.

Gouze, E., Pawliuk, R., Pilapil, C., Gouze, J. N., Fleet, C., Palmer, G. D., Evans, C. H., Leboulch, P. and Ghivizzani, S. C. In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, 2002, 5: 397-404.

Grant, G. M., Giambernardi, T. A., Grant, A. M. and Klebe, R. J. Overview of expression of matrix metalloproteinases (MMP-17, MMP-18, and MMP-20) in cultured human cells. *Matrix Biol.*, 1999, 18: 145-148.

Hammarstrom, L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 1997, 24: 658-668.

Hamra, F. K., Gatlin, J., Chapman, K. M., Grellhesl, D. M., Garcia, J. V., Hammer, R. E. and Garbers, D. L. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germline stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A*, 2002, 99: 14931-14936.

Helm, G. A., Alden, T. D., Beres, E. J., Hudson, S. B., Das, S., Engh, J. A., Pittman, D. D., Kerns, K. M. and Kallmes, D. F. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent. *J. Neurosurg.*, 2000, 92: 191-196.

Herzberg, F. and Schour, I. Effects of pulp removal and Hertwig's sheath on eruption of incisors in albino rat. *J. Dent. Res.*, 1941, 20: 264.

Hiltunen, M. O., Ruuskanen, M., Huuskonen, J., Mahonen, A. J., Ahonen, M., Rutanen, J., Kosma, V. M., Mahonen, A., Kroger, H. and Yla-Herttuala, S. Adenovirus-mediated VEGF-A gene transfer induces bone formation in vivo. *FASEB J.*, 2003, 17: 1147-1149.

Hirota, S., Imakita, M., Kohri, K., Ito, A., Morii, E., Adachi, S., Kim, H.-M., Kitamura, Y., Yutani, C. and Nomura, S. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques: A possible association with calcification. *Am. J. Pathol.*, 1993, 143: 1003-1008.

Hou, P., Troen, T., Ovejero, M. C., Kirkegaard, T., Andersen, T. L., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Sato, T., Shapiro, S. D., Foged, N. T. and Delaissé, J. M. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone*, 2004, 34: 37-47.

Hu, C.-C., Fukae, M., Uchida, T., Qian, Q., Zhang, C. H., Ryu, O. H., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Murakami, C., Dohi, N., Shimizu, M. and Simmer, J. P. Sheathlin:



Cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J. Dent. Res.*, 1997, 76: 648-657.

Hunter, G. K. and Goldberg, H. A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1993, 90: 8562-8565.

Hunter, G. K., Hauschka, P. V., Poole, A. R., Rosenberg, L. C. and Goldberg, H. A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem. J.*, 1996, 317: 59-64.

Huq, N. L., Cross, K. J., Ung, M. and Reynolds, E. C. A review of protein structure and gene organisation for proteins associated with mineralised tissue and calcium phosphate stabilisation encoded on human chromosome 4. *Arch. Oral Biol.*, 2005, 50: 599-609.

Ichim, T. E., Li, M., Qian, H., Popov, I. A., Rycerz, K., Zheng, X., White, D., Zhong, R. and Min, W. P. RNA interference: a potent tool for gene-specific therapeutics. *Am. J. Transplant*, 2004, 4: 1227-1236.

Ihara, H., Denhardt, D. T., Furuya, K., Yamashita, T., Muguruma, Y., Tsuji, K., Hruska, K. A., Higashio, K., Enomoto, S., Nifuji, A., Rittling, S. R. and Noda, M. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 13065-13071.

Ikeda, T., Nomura, S., Yamaguchi, A., Suda, T. and Yoshiki, S. In situ hybridization of bone matrix proteins in undecalcified adult rat bone sections. *J. Histochem. Cytochem.*, 1992, 40: 1079-1088.

Ikeda, T., Shirasawa, T., Esaki, Y., Yoshiki, S. and Hirokawa, K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle-derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J. Clin. Invest.*, 1993, 92: 2814-2820.

Ishijima, M., Rittling, S. R., Yamashita, T., Tsuji, K., Kurosawa, H., Nifuji, A., Denhardt, D. T. and Noda, M. Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J. Exp. Med.*, 2001, 193: 399-404.

Jernvall, J. and Thesleff, I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.*, 2000, 92: 19-29.

Jono, S., Peinado, C. and Giachelli, C. M. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 20197-20203.

Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H. and Verma, I. M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genet.*, 1997, 17: 314-317.

Kafri, T., Van Praag, H., Gage, F. H. and Verma, I. M. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol. Ther.*, 2000, 1: 516-521.

Kanazashi, M., Gomi, K., Nagano, T., Tanabe, T., Arai, T. and Fukae, M. The 17-kDa sheath protein in enamel proteins induces cementum regeneration in experimental cavities created in a buccal dehiscence model of dogs. *J. Periodontal Res.*, 2006, 41: 193-199.

Kandori, K., Masunari, A. and Ishikawa, T. Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements. *Calcif. Tissue Int.*, 2005, 76: 194-206.

Karadag, A., Ogbureke, K. U., Fedarko, N. S. and Fisher, L. W. Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004, 96: 956-965.

Karsenty, G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.*, 1999, 13: 3037-3051.

Kasugai, S., Zhang, Q., Overall, C. M., Wrana, J. L., Butler, W. T. and Sodek, J. Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Miner.*, 1991, 13: 235-250.

Katsube, K., Bishop, A. T., Simari, R. D., Yla-Herttuala, S. and Friedrich, P. F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transfer enhances surgical revascularization of necrotic bone. *J. Orthop. Res.*, 2005, 23: 469-474.

Kawasaki, K., Suzuki, T. and Weiss, K. M. Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101: 11356-11361.

Kawasaki, K., Suzuki, T. and Weiss, K. M. Phenogenetic drift in evolution: the changing genetic basis of vertebrate teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005a, 102: 18063-18068.

Kawasaki, K. and Weiss, K. M. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 100: 4060-4065.

Kawasaki, K. and Weiss, K. M. Evolutionary genetics of vertebrate tissue mineralization: the origin and evolution of the secretory calcium-binding phosphoprotein family. *J Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol.*, 2005b.

Kido, J., Kasahara, C., Ohishi, K., Nishikawa, S., Ishida, H., Yamashita, K., Kitamura, S., Kohri, K. and Nagata, T. Identification of osteopontin in human dental calculus matrix. *Arch. Oral Biol.*, 1995, 40: 967-972.

Kitahara, K., Ishijima, M., Rittling, S. R., Tsuji, K., Kurosawa, H., Nifuji, A., Denhardt, D. T. and Noda, M. Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology*, 2003, 144: 2132-2140.

Kobayashi, D., Takita, H., Mizuno, M., Totsuka, Y. and Kuboki, Y. Time-dependent expression of bone sialoprotein fragments in osteogenesis induced by bone morphogenetic protein. *J. Biochem.*, 1996, 119: 475-481.

Kofron, M. D. and Laurencin, C. T. Orthopaedic applications of gene therapy. *Curr. Gene Ther.*, 2005, 5: 37-61.

Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagatta, T., Toshioka, K., Iguchi, T., Yamate, T., Umekawa, Y., Suzuki, H., Sinohara, H. and Kurita, Y. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J. Biol. Chem.*, 1993, 258: 15180-15184.

Kostenuik, P. J., Bolon, B., Morony, S., Daris, M., Geng, Z. O., Carter, C. and Sheng, J. Gene therapy with human recombinant osteoprotegerin reverses established osteopenia in ovariectomized mice. *Bone*, 2004, 34: 656-664.

Krebsbach, P. H., Lee, S. K., Matsuki, Y., Kozak, C. A. and Yamada, K. M. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin: a novel tooth-specific gene. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271: 4431-4435.

Kuboki, T., Nakanishi, T., Kanyama, M., Sonoyama, W., Fujisawa, T., Kobayashi, K., Ikeda, T., Kubo, T., Yamashita, A. and Takigawa, M. Direct adenovirus-mediated gene delivery to the temporomandibular joint in guinea-pigs. *Arch. Oral Biol.*, 1999, 44: 701-709.

Kukita, A., Harada, H., Kukita, T., Inai, T., Matsushashi, S. and Kurisu, K. Primary and secondary culture of rat ameloblasts in serum- free medium. *Calcif. Tissue Int.*, 1992, 51: 393-398.

Kumar, S., Mahendra, G. and Ponnazhagan, S. Determination of osteoprogenitor-specific promoter activity in mouse mesenchymal stem cells by recombinant adeno-associated virus transduction. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1731: 95-103.

Kuroda, S., Viridi, A. S., Dai, Y., Shott, S. and Sumner, D. R. Patterns and localization of gene expression during intramembranous bone regeneration in the rat femoral marrow ablation model. *Calcif. Tissue Int.*, 2005b, 77: 212-225.

Kuroda, S., Viridi, A. S., Dai, Y., Shott, S. and Sumner, D. R. Patterns and localization of gene expression during intramembranous bone regeneration in the rat femoral marrow ablation model. *Calcif. Tissue Int.*, 2005a, 77: 212-225.

Kyrkanides, S., Kambylafkas, P., Miller, J. H. and Tallents, R. H. Non-primate lentiviral vector administration in the TMJ. *J. Dent. Res.*, 2004, 83: 65-70.

Laurencin, C. T., Attawia, M. A., Lu, L. Q., Borden, M. D., Lu, H. H., Gorum, W. J. and Lieberman, J. R. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration. *Biomaterials*, 2001, 22: 1271-1277.

Lavoie, P. Caractérisation immunochimique comparative des protéines de l'émail au cours de l'amélogénèse. Université de Montréal. M.Sc. Biologie Moléculaire. 2001.

Lee, S. K., Kim, S. M., Lee, Y. J., Yamada, K. M., Yamada, Y. and Chi, J. G. The structure of the rat ameloblastin gene and its expression in amelogenesis. *Mol. Cells*, 2003, 15: 216-225.

Li, X., Jung, C., Liu, Y. H., Bae, K. H., Zhang, Y. P., Zhang, H. J., Vanderputten, D., Jeng, M. H., Gardner, T. A. and Kao, C. Anti-tumor efficacy of a transcriptional replication-competent adenovirus, Ad-OC-E1a, for osteosarcoma pulmonary metastasis. *J. Gene Med.*, 2006, 8: 679-689.

Lian, J. B., Stein, G. S., Stein, J. L. and Van Wijnen, A. J. Marrow transplantation and targeted gene therapy to the skeleton. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2000, S146-S155.

Liaw, L., Birk, D. E., Ballas, C. B., Whitsitt, J. S., Davidson, J. M. and Hogan, B. L. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J. Clin. Invest.*, 1998, 101: 1468-1478.

Liu, S., Guo, R., Tu, Q. and Quarles, L. D. Overexpression of Phex in osteoblasts fails to rescue the Hyp mouse phenotype. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 3686-3697.

Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. and Baltimore, D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 2002, 295: 868-872.

Luk, K. D., Chen, Y., Cheung, K. M., Kung, H. F., Lu, W. W. and Leong, J. C. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-4 gene therapy for in vivo bone formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 308: 636-645.

Luo, J., Sun, M. H., Kang, Q., Peng, Y., Jiang, W., Luu, H. H., Luo, Q., Park, J. Y., Li, Y., Haydon, R. C. and He, T. C. Gene therapy for bone regeneration. *Curr. Gene Ther.*, 2005, 5: 167-179.

MacDougall, M., Simmons, D., Luan, X. H., Nydegger, J., Feng, J. and Gu, T. T. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4 - Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 835-842.

McKee, M. D. Effects of CO<sub>2</sub> laser irradiation *in vivo* on rat alveolar bone and incisor enamel, dentin, and pulp. *J. Dent. Res.*, 1993, 72: 1406-1417.



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

McKee, M. D. and Nanci, A. Osteopontin: An interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect. Tissue Res.*, 1996b, 35: 197-205.

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

McKee, M. D., Nanci, A. and Khan, S. R. Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J. Bone Miner. Res.*, 1995, 10: 1913-1929.

Midura, R. J., Wang, A., Lovitch, D., Law, D., Powell, K. and Gorski, J. P. Bone acidic glycoprotein-75 delineates the extracellular sites of future bone sialoprotein accumulation and apatite nucleation in osteoblastic cultures. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 25464-25473.

Moradian-Oldak, J., Simmer, J. P., Lau, E. C., Sarte, P. E., Slavkin, H. C. and Fincham, A. G. Detection of monodisperse aggregates of a recombinant amelogenin by dynamic light scattering. *Biopolymers*, 1994, 34: 1339-1347.

- Morimoto, I., Sasaki, Y., Ishida, S., Imai, K. and Tokino, T. Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes Chromosomes. Cancer*, 2002, 33: 270-278.
- Murry, C. E., Giachelli, C. M., Schwartz, S. M. and Vracko, R. Macrophages express osteopontin during repair of myocardial necrosis. *Am. J. Pathol.*, 1994, 145: 1450-1462.
- Musgrave, D. S., Bosch, P., Ghivizzani, S., Robbins, P. D., Evans, C. H. and Huard, J. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone*, 1999, 24: 541-547.
- Nakamura, Y., Slaby, I., Spahr, A., Pezeshki, G., Matsumoto, K. and Lyngstadaas, S. P. Ameloblastin fusion protein enhances pulpal healing and dentin formation in porcine teeth. *Calcif. Tissue Int.*, 2006, 78: 278-284.
- Nakata, A., Kameda, T., Nagai, H., Ikegami, K., Duan, Y. Q., Terada, K. and Sugiyama, T. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 308: 834-839.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D. and Verma, I. M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 1996a, 93: 11382-11388.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. and Trono, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996b, 272: 263-267.

Nam, J. S., Suchar, A. M., Kang, M. J., Stuelten, C. H., Tang, B., Michalowska, A. M., Fisher, L. W., Fedarko, N. S., Jain, A., Pinkas, J., Lonning, S. and Wakefield, L. M. Bone sialoprotein mediates the tumor cell-targeted prometastatic activity of transforming growth factor beta in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.*, 2006, 66: 6327-6335.

Nanci, A. Enamel formation and structure. In: A. Nanci (Ed) *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Harcourt Health Sciences, St.Louis, 2003: (Chapter 7).

Nanci, A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: Relationship to speed of formation and collagen packing density. *J. Struct. Biol.*, 1999, 126: 256-269.

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

Nanci, A. and Smith, C. E. Matrix-mediated mineralization in enamel and the collagen-based hard tissues. In: M. Goldberg, A. Boskey and C. Robinson (Eds) *Chemistry and*

*Biology of Mineralized Tissues*. J.Am.Acad.Orthop.Surg., Rosemont, 1999: (Chapter 35) 217-224.

Nanci, A., Whitson, S. W. and Bianco, P. Bone. In: A. Nanci (Ed) *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function*. Harcourt Health Sciences, St.Louis, 2003: (Chapter 6).

Nanci, A., Zalzal, S., Lavoie, P., Kunikata, M., Chen, W.-Y., Krebsbach, P. H., Yamada, Y., Hammarström, L., Simmer, J. P., Fincham, A. G., Snead, M. L. and Smith, C. E. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J. Histochem. Cytochem.*, 1998, 46: 911-934.

Nemoto, H., Rittling, S. R., Yoshitake, H., Furuya, K., Amagasa, T., Tsuji, K., Nifuji, A., Denhardt, D. T. and Noda, M. Osteopontin deficiency reduces experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues. *J. Bone Miner. Res.*, 2001, 16: 652-659.

Newman, K. D., Dunn, P. F., Owens, J. W., Schulick, A. H., Virmani, R., Sukhova, G., Libby, P. and Dichek, D. A. Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J. Clin. Invest*, 1995, 96: 2955-2965.

Niyibizi, C., Baltzer, A., Lattermann, C., Oyama, M., Whalen, J. D., Robbins, P. D. and Evans, C. H. Potential role for gene therapy in the enhancement of fracture healing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1998, 355: S148-S153.

O'Brien, K. D., Kuusisto, J., Reichenbach, D. D., Ferguson, M., Giachelli, C., Alpers, C. E. and Otto, C. M. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circ. Res.*, 1995, 92: 2163-2168.

Ohri, R., Tung, E., Rajachar, R. and Giachelli, C. M. Mitigation of ectopic calcification in osteopontin-deficient mice by exogenous osteopontin. *Calcif. Tissue Int.*, 2005, 76: 307-315.

Oldberg, Å., Franzen, A. and Heinegard, D. The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.*, 1988, 263(36): 19430-19432.

Ophascharoensuk, V., Giachelli, C. M., Gordon, K., Hughes, J., Pichler, R., Brown, P., Liaw, L., Schmidt, R., Shankland, S. J., Alpers, C. E., Couser, W. G. and Johnson, R. J. Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int.*, 1999, 56: 571-580.

Oreffo, R. O. C., Viridi, A. S. and Triffitt, J. T. Retroviral marking of human bone marrow fibroblasts: in vivo expansion and localization in calvarial sites after subcutaneous transplantation in vivo. *J. Cell. Physiol.*, 2001, 186: 201-209.

Orsini, G., Zalzal, S. and Nanci, A. Localized infusion of tunicamycin in rat hemimandibles: alteration of the basal lamina associated with maturation stage ameloblasts. *J. Histochem. Cytochem.*, 2001, 49: 165-176.

Paine, M. L. and Snead, M. L. Tooth developmental biology: disruptions to enamel-matrix assembly and its impact on biomineralization. *Orthod. Craniofac. Res.*, 2005, 8: 239-251.

Paine, M. L. and Snead, M. L. Protein interactions during assembly of the enamel organic extracellular matrix. *J. Bone Miner. Res.*, 1997, 12: 221-227.

Paine, M. L., Wang, H. J., Luo, W., Krebsbach, P. H. and Snead, M. L. A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 19447-19452.

Partridge, K. A. and Oreffo, R. O. C. Gene delivery in bone tissue engineering: Progress and prospects using viral and nonviral strategies. *Tissue Engineering*, 2004, 10: 295-307.

Persy, V. P., Verhulst, A., Ysebaert, D. K., De Greef, K. E. and De Broe, M. E. Reduced postischemic macrophage infiltration and interstitial fibrosis in osteopontin knockout mice. *Kidney Int*, 2003, 63: 543-553.

Pfeifer, A. Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res.*, 2004, 13: 513-522.

Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y. and Verma, I. M. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, 99: 2140-2145.

Prince, C. W., Oosawa, T., Butler, W. T., Tomana, M., Bhowan, A. S., Bhowan, M. and Schrohenloher, R. E. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262: 2900-2907.

Qin, C., Baba, O. and Butler, W. T. Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2004, 15: 126-136.

Qin, C., Brunn, J. C., Cook, R. G., Orkiszewski, R. S., Malone, J. P., Veis, A. and Butler, W. T. Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 34700-34708.

Rangaswami, H., Bulbule, A. and Kundu, G. C. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.*, 2006, 16: 79-87.

Razzouk, S., Brunn, J. C., Qin, C., Tye, C. E., Goldberg, H. A. and Butler, W. T. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone*, 2002, 30: 40-47.

Redondo, L. M., Cantera, J. M. G., Hernandez, A. V. and Puerta, C. V. Effect of particulate porous hydroxyapatite on osteoinduction of demineralized bone autografts in experimental reconstruction of the rat mandible. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 1995, 24: 445-448.

Rittling, S. R. and Chambers, A. F. Role of osteopontin in tumour progression. *Br. J. Cancer*, 2004, 90: 1877-1881.

Rittling, S. R., Matsumoto, H. N., McKee, M. D., Nanci, A., An, X., Novick, K. E., Kowalski, A. J., Noda, M. and Denhardt, D. T. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.*, 1998, 13: 1101-1111.

Robbins, P. D., Evans, C. H. and Chernajovsky, Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Ther.*, 2003, 10: 902-911.

Rollo, E. E., Laskin, D. L. and Denhardt, D. T. Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J. Leukocyte Biol.*, 1996, 60: 397-404.

Rowe, P. S. N. The PEXGene: Its role in X-linked rickets, osteomalacia, and bone mineral metabolism. *Exp. Nephrol.*, 1997, 5: 355-363.



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

Ruch, J.-V. Determinisms of odontogenesis. *RBC (Cell Biology Reviews)*, 1987, 14: 1-112.

Ruchon, A. F., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Tenenhouse, H. S., Desgroseillers, L., Crine, P. and Boileau, G. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J. Histochem. Cytochem.*, 1998a, 46: 459-468.

Ruchon, A. F., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Tenenhouse, H. S., Desgroseillers, L., Crine, P. and Boileau, G. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J. Histochem. Cytochem.*, 1998b, 46: 459-468.

Ruchon, A. F., Tenenhouse, H. S., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Aubi, J. E., Desgroseillers, L. and Crine, P. Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers. *J. Bone Miner. Res.*, 2000, 15: 1440-1450.

Salih, E., Wang, J., Mah, J. and Fluckiger, R. Natural variation in the extent of phosphorylation by bone phosphoproteins as a function of in vivo new bone formation induced by demineralized bone matrix in soft tissue and bony environments. *Biochem. J.*, 2002, 364: 465-474.

Schmitz, J. P. and Hollinger, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1986, 205: 299-308.

Schwarz, E. M. The adeno-associated virus vector for orthopaedic gene therapy. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2000, S31-S39.

Seibel, M. J., Woitge, H. W., Pecherstorfer, M., Karmatschek, M., Horn, E., Ludwig, H., Armbruster, F. P. and Ziegler, R. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1996, 81: 3289-3294.

Shai, E., Palmon, A., Panet, A., Marmary, Y., Sherman, Y., Curran, M. A., Galun, E. and Condiotti, R. Prolonged transgene expression in murine salivary glands following non-primate lentiviral vector transduction. *Mol. Ther.*, 2005, 12: 137-143.

Simmer, J. P. Alternative splicing of amelogenins. *Connect. Tissue Res.*, 1995, 32: 131-136.

Simmer, J. P. and Fincham, A. G. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1995, 6: 84-108.

Simmons, D., Gu, T. T., Krebsbach, P. H., Yamada, Y. and MacDougall, M. Identification and characterization of a cDNA for mouse ameloblastin. *Connect. Tissue Res.*, 1998, 39: 307-316.

Singhal, H., Bautista, D. S., Tonkin, K. S., O'Malley, F. P., Tuck, A. B., Chambers, A. F. and Harris, J. F. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin. Cancer Res.*, 1997, 3: 605-611.

Sire, J. Y., Delgado, S., Fromentin, D. and Girondot, M. Amelogenin: lessons from evolution. *Arch. Oral Biol.*, 2005, 50: 205-212.

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

Smith, C. E. Histological and three dimensional organization of the odontogenic organ in the upper incisor of 100 gm rats: Comparison with the lower incisor. *Am. J. Anat.*, 1975, 142: 431-456.

Smith, C. E. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1998, 9: 128-161.

Smith, C. E. and Nanci, A. The protein dynamics of amelogenesis. *Anat. Rec.*, 1996, 245: 186-207.

Smith, L. L. and Giachelli, C. M. Structural requirements for alpha 9 beta 1-mediated adhesion and migration to thrombin-cleaved osteopontin. *Exp. Cell Res.*, 1998, 242: 351-360.

Sodek, J., Batista Da Silva, A. P. and Zohar, R. Osteopontin and mucosal protection. *J. Dent. Res.*, 2006, 85: 404-415.

Sodek, J., Ganss, B. and McKee, M. D. Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2000, 11: 279-303.

Sodek, J., Zhu, B., Huynh, M. H., Brown, T. J. and Ringuette, M. Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect. Tissue Res.*, 2002, 43: 308-319.

Song, Y., Zhang, Z., Yu, X., Yan, M., Zhang, X., Gu, S., Stuart, T., Liu, C., Reiser, J., Zhang, Y. and Chen, Y. Application of lentivirus-mediated RNAi in studying gene function in mammalian tooth development. *Dev. Dyn.*, 2006, 235: 1334-1344.

Sorensen, E. S., Hojrup, P. and Petersen, T. E. Posttranslational modifications of bovine osteopontin: identification of twenty-eight phosphorylation and three *O*-glycosylation sites. *Proteins Science*, 1995, 4: 2040-2049.

- Sorensen, E. S. and Petersen, T. E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 198: 200-205.
- Spahr, A., Lyngstadaas, S. P., Slaby, I. and Pezeshki, G. Ameloblastin protein and mRNA expression during bone development in rats. *Eur. J. Oral Sci.*, 2006, 114: 504-511.
- Speer, M. Y. and Giachelli, C. M. Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc. Pathol.*, 2004, 13: 63-70.
- Speer, M. Y., McKee, M. D., Guldgerb, R. E., Liaw, L., Yang, H. Y., Tung, E., Karsenty, G. and Giachelli, C. M. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J. Exp. Med.*, 2002, 196: 1047-1055.
- Steitz, S. A., Speer, M. Y., McKee, M. D., Liaw, L., Almeida, M., Yang, H. and Giachelli, C. M. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am. J. Pathol.*, 2002, 161: 2035-2046.
- Stover, M. L., Wang, C. K., McKinstry, M. B., Kalajzic, I., Gronowicz, G., Clark, S. H., Rowe, D. W. and Lichtler, A. C. Bone-directed expression of Col1a1 promoter-driven self-inactivating retroviral vector in bone marrow cells and transgenic mice. *Mol. Ther.*, 2001, 3: 543-550.

Stubbs, J. T., III Generation and use of recombinant human bone sialoprotein and osteopontin for hydroxyapatite studies. *Connect. Tissue Res.*, 1996, 34-5: 447-453.

Stubbs, J. T., III, Mintz, K. P., Eanes, E. D., Torchia, D. A. and Fisher, L. W. Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain. *J. Bone Miner. Res.*, 1997, 12: 1210-1222.

Sugiyama, O., An, D. S., Kung, S. P., Feeley, B. T., Gamradt, S., Liu, N. Q., Chen, I. S. and Lieberman, J. R. Lentivirus-mediated gene transfer induces long-term transgene expression of BMP-2 in vitro and new bone formation in vivo. *Mol. Ther.*, 2005, 11: 390-398.

Sung, V., Stubbs, J. T., III, Fisher, L., Aaron, A. D. and Thompson, E. W. Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  integrins. *J. Cell. Physiol.*, 1998, 176: 482-494.

Suva, L. J., Seedor, J. G., Endo, N., Quartuccio, H. A., Thompson, D. D., Bab, I. and Rodan, G. A. Pattern of gene expression following rat tibial marrow ablation. *J. Bone Miner. Res.*, 1993, 8: 379-388.

Suzuki, K., Zhu, B., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., Goldberg, H. A., McCulloch, C. A. and Sodek, J. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with

migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, 2002, 17: 1486-1497.

Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M. O., Trono, D. and Aebischer, P. A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat. Methods*, 2006, 3: 109-116.

Tartaix, P. H., Doulaverakis, M., George, A., Fisher, L. W., Butler, W. T., Qin, C. L., Salih, E., Tan, M. L., Fujimoto, Y., Spevak, L. and Boskey, A. L. In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 18115-18120.

The Hyp Consortium A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat. Genet.*, 1995, 11: 130-136.

Thesleff, I. and Hurmerinta, K. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation*, 1981, 18: 75-88.

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

Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M. and Verma, I. M. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, 100: 1844-1848.

Trueblood, N. A., Xie, Z. L., Communal, C., Sam, F., Ngoy, S., Liaw, L., Jenkins, A. W., Wang, J., Sawyer, D. B., Bing, O. H. L., Apstein, C. S., Colucci, W. S. and Singh, K. Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circ. Res.*, 2001, 88: 1080-1087.

Tye, C. E., Hunter, G. K. and Goldberg, H. A. Identification of the type I collagen-binding domain of bone sialoprotein and characterization of the mechanism of interaction. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 13487-13492.

Tye, C. E., Rattray, K. R., Warner, K. J., Gordon, J. A. R., Sodek, J., Hunter, G. K. and Goldberg, H. A. Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 7949-7955.

Uchida, T., Murakami, C., Wakida, K., Dohi, N., Iwai, Y., Simmer, J. P., Fukae, M., Satoda, T. and Takahashi, O. Sheath proteins: Synthesis, secretion, degradation and fate in forming enamel. *Eur. J. Oral Sci.*, 1998, 106: 308-314.

Ulrich-Vinther, M., Carmody, E. E., Goater, J. J., Soballe, K., O'Keefe, R. J. and Schwarz, E. M. Recombinant adeno-associated virus-mediated osteoprotegerin gene therapy inhibits wear debris-induced osteolysis. *J. Bone Joint Surg. [Am. ]*, 2002, 84A: 1405-1412.

Urist, M. R. Bone histogenesis and morphogenesis in implants of demineralized enamel and dentin. *J. Oral Surg.*, 1971, 29: 88-102.



Van den Bos, T., Bronckers, A. L. J. J., Goldberg, H. A. and Beertsen, W. Blood circulation as a source of osteopontin in acellular extrinsic fiber cementum and other mineralizing tissues. *J. Dent. Res.*, 1999, 78: 1688-1695.

van den, B. J., Wang, D., Kwon, S. H., Heinkelein, M. and Reichardt, H. M. Lentivirally generated eGFP-transgenic rats allow efficient cell tracking in vivo. *Genesis.*, 2004, 39: 94-99.

Varley, A. W. and Munford, R. S. Physiologically responsive gene therapy. *Mol. Med. Today*, 1998, 4: 445-451.

Veis, A. Amelogenin gene splice products: potential molecules. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2003, 60: 38-55.

Venezia, E., Goldstein, M., Boyan, B. D. and Schwartz, Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2004, 15: 382-402.

Verma, I. M. and Weitzman, M. D. Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Ann. Rev. Biochem.*, 2005, 74: 711-738.

Vu, D.-D., Daniel, N. G. and Nanci, A. In vivo model for the experimental manipulation of calcified tissues: A surgical approach for accessing the odontogenic organ and associated tissues in the rat incisor. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, 47: 1-14.

Wada, T., McKee, M. D., Steitz, S. and Giachelli, C. M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibition by osteopontin. *Circ. Res.*, 1999, 84: 166-178.

Waltregny, D., Bellahcène, A., Van Riet, I., Fisher, L. W., Young, M., Fernandez, P., Dewé, W., De Leval, J. and Castronovo, V. Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1998, 90: 1000-1008.

Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H. and Franceschi, R. T. Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J. Bone Miner. Res.*, 1999, 14: 893-903.

Wang, J., Zhou, H. Y., Salih, E., Xu, L., Wunderlich, L., Gu, X., Hofstaetter, J. G., Torres, M. and Glimcher, M. J. Site-specific in vivo calcification and osteogenesis stimulated by bone sialoprotein. *Calcif. Tissue Int.*, 2006.

Warshawsky, H. Ultrastructural studies on amelogenesis. In: W. T. Butler (Ed) *The chemistry and biology of mineralized tissues*. Ebsco Media, Inc., Birmingham, 1985: 33-44.

Watanabe, S., Imagawa, T., Boivin, G. P., Gao, G. P., Wilson, J. M. and Hirsch, R. Adeno-associated virus mediates long-term gene transfer and delivery of chondroprotective IL-4 to murine synovium. *Mol. Ther.*, 2000, 2: 147-152.

Weber, G. F. The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy.

*Biochim. Biophys. Acta*, 2001, 1552: 61-85.

Weber, W. and Fussenegger, M. Approaches for trigger-inducible viral transgene regulation in gene-based tissue engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2004, 15: 383-391.

Wesson, J. A., Johnson, R. J., Mazzali, M., Beshensky, A. M., Stietz, S., Giachelli, C., Liaw, L., Alpers, C. E., Couser, W. G., Kleinman, J. G. and Hughes, J. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am. Soc. Nephrol.*, 2003, 14: 139-147.

Wiznerowicz, M., Szulc, J. and Trono, D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat. Methods*, 2006, 3: 682-688.

Wu, Y., Denhardt, D. T. and Rittling, S. R. Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene. *Br. J. Cancer*, 2000, 83: 156-163.

Yamakoshi, Y., Hu, J. C., Iwata, T., Kobayashi, K., Fukae, M. and Simmer, J. P. Dentin Sialophosphoprotein Is Processed by MMP-2 and MMP-20 in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem*, 2006, 281: 38235-38243.

Ye, L., MacDougall, M., Zhang, S., Xie, Y., Zhang, J., Li, Z., Lu, Y., Mishina, Y. and Feng, J. Q. Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 19141-19148.

Yin, A., Margolis, H. C., Yao, Y., Grogan, J. and Oppenheim, F. G. Multi-component adsorption model for pellicle formation: The influence of salivary proteins and non-salivary phospho proteins on the binding of histatin 5 onto hydroxyapatite. *Arch. Oral Biol.*, 2005, 51: 102-110.

Yla-Herttuala, S. and Martin, J. F. Cardiovascular gene therapy. *Lancet*, 2000, 355: 213-222.

Yoshitake, H., Rittling, S. R., Denhardt, D. T. and Noda, M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 1999, 96: 8156-8160.

Yumoto, K., Ishijima, M., Rittling, S. R., Tsuji, K., Tsuchiya, Y., Kon, S., Nifuji, A., Uede, T., Denhardt, D. T. and Noda, M. Osteopontin deficiency protects joints against destruction

in anti-type II collagen antibody-induced arthritis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, 99: 4556-4561.

Zeichner-David, M., Chen, L. S., Hsu, Z., Reyna, J., Caton, J. and Bringas, P. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *Eur. J. Oral Sci.*, 2006, 114: 244-253.

Zhang, X. Y., La Russa, V. F., Bao, L., Kolls, J., Schwarzenberger, P. and Reiser, J. Lentiviral vectors for sustained transgene expression in human bone marrow-derived stromal cells. *Mol. Ther.*, 2002, 5: 555-565.

Zohar, R., Cheifetz, S., McCulloch, C. A. G. and Sodek, J. Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur. J. Oral Sci.*, 1998, 106: 401-407.

Zohar, R., Lee, W., Arora, P., Cheifetz, S., McCulloch, C. and Sodek, J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *J. Cell. Physiol.*, 1997, 170: 88-100.

Zohar, R., Suzuki, N., Suzuki, K., Arora, P., Glogauer, M., McCulloch, C. A. and Sodek, J. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J. Cell. Physiol.*, 2000, 184: 118-130.

Zohar, R., Zhu, B., Liu, P., Sodek, J. and McCulloch, C. A. Increased cell death in osteopontin-deficient cardiac fibroblasts occurs by a caspase-3-independent pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004, 287: H1730-H1739.

Zoltick, P. W. and Wilson, J. M. Regulated gene expression in gene therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2001, 953: 53-63.