



ANNEE: 2017

THESE N° 02/17 CSVS

**THESE DE DOCTORAT**

Formation doctorale : Sciences odontologiques

Equipe de recherche en Epidémiologie et Santé Oro-faciale (ERESOF)

Présentée par :

**Mr. SAMIR LAOUINA**

**Etude clinique et moléculaire des  
amélogénèses imparfaites chez des  
familles marocaines**

Soutenue le 30 Mai 2017, devant le jury composé de :

<b>Pr CHALA Sanaa</b>	Faculté de médecine dentaire Rabat	<b>Président</b>
<b>Pr BENZAZZA Driss</b>	Faculté de médecine dentaire Rabat	} <b>Rapporteurs</b>
<b>Pr AMEZIAN Rachida</b>	Faculté internationale de médecine dentaire Rabat	
<b>Pr DEHBI Hind</b>	Faculté de médecine et de pharmacie Casablanca	
<b>Pr. BAHJE Loubna</b>	Faculté de médecine dentaire Rabat	<b>Examineur</b>
<b>Pr CHBICHEB Saliha</b>	Faculté de médecine dentaire Rabat	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Pr EL ALLOUSSI Mustapha</b>	Faculté de médecine dentaire Rabat	} <b>Co- Directeur de thèse</b>
<b>Pr BLOCH-ZUPAN Agnès</b>	Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg	

# *Dédicace*

Je dédie cette thèse à mon défunt père **Mohamed LAOUINA** que Dieu bénisse son âme et lui pardonne et la paix éternelle. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis pour mon éducation et mon bien être.

J'ai voulu mener ce travail à terme pour que tu sois fier de moi.

Merci pour tout mon père.

A ma mère ; Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A mon frère SAID et mes sœurs (LAILA, FATIMA et WAFAE); En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que ALLAH, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A toute ma famille;

Et a tout mes amies sans exception, pour leur solidarité et les bons moments

**SAMIR.**



## Remerciements

Je remercie, **Monsieur Mohamed ADNAOUI** Doyen de la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

Je remercie, **Madame Sana RIDA** Doyen de la faculté de Médecine Dentaire de Rabat. Qu'elle trouve ici l'expression de ma haute considération.

Je remercie, **Monsieur Jamal TAOUFIK**, Professeur à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Directeur du Centre d'Etude Doctorale. Je tiens à lui témoigner ma profonde gratitude pour les efforts et les encouragements qu'il ne cesse de prodiguer à la recherche scientifique.

Je tiens à remercier **Madame Saliha CHBICHEB** - Professeur en odontologie chirurgicale, Faculté de Médecine Dentaire de Rabat, Université Mohammed V Rabat, la directrice de ma thèse, et **Monsieur Mustapha ELALLOUSSI** - Ancien Professeur en pédodontie-prévention, Faculté de Médecine Dentaire de Rabat, Université Mohammed V Rabat, le premier co-encadrant de ma thèse, et **Madame Agnès BLOCH-ZUPAN** - Professeur des Universités en Sciences Biologiques, Praticien Hospitalier (PU-PH) de la Faculté de Chirurgie Dentaire de l'Université de Strasbourg, la deuxième co-encadrante qui m'ont dirigé, soutenu et accompagné durant tout le long de ma thèse, je leur exprime ici toute ma gratitude.

Je remercie vivement **Madame Rachida AMEZIAN** – Doyen de la faculté internationale de médecine dentaire Rabat, **Madame Hind DEHBI** – Professeur d'enseignement supérieur en génétique médicale, laboratoire de génétique et de pathologie moléculaire Faculté de Médecine et de Pharmacie Casablanca et **Monsieur Driss BENZAZZA** - Professeur de l'enseignement supérieur en parodontologie Faculté de Médecine Dentaire Rabat d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail ; je leur exprime toute ma reconnaissance.

Je suis sensible à l'honneur que me fait **Madame Sanaa CHALA**, Professeur de l'enseignement supérieur en odontologie conservatrice à la Faculté de Médecine Dentaire de Rabat, Université Mohammed V Rabat, d'assumer la fonction de Président du Jury d'évaluation de cette thèse.

Je remercie, **Madame Loubna BAHJE**, Professeur agrégé en orthopédie dento-faciale à la Faculté de Médecine Dentaire Rabat, Université Mohammed V Rabat. Qui me fait l'honneur en acceptant de juger ce travail. Je la prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma plus grande estime d'avoir accepté de siéger parmi le jury.

La réalisation du présent travail n'aurait pas pu voire le jour sans la collaboration FRANCO-MAROCAINE entre CNRST (Maroc) et INSERM (France) pour deux ans (2015 et 2016) qui a financé les billets de voyage et de séjours pour le déplacement de chercheurs marocains et français.

Je remercie également **Madame Hélène DOLFFUS** directrice du Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM U1112, Institut de Génétique Médicale d'Alsace, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, de m'avoir bien accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie également tous les membres de l'équipe du laboratoire; pour leur disponibilité et la qualité de leurs explications et conseils. Et plus particulièrement **Dr Megana PRASAD** qui m'a aidé avec ses conseils, et la qualité de ses explications concernant les techniques et les manipulations de laboratoire. Ce fut un réel plaisir et un honneur de travailler avec elle. Et également **Dr Mathilde HUCKERT** qui m'a aidé avec ses conseils, et ses encouragements.

Je remercie également **Dr Pascal DOLLE** et **Pr Agnès BLOCH-ZUPAN**, qui m'ont accepté dans leur équipe à l'institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) Illkirch, Strasbourg France.

Je remercie **Dr Karen NIEDERREITHER** pour m'avoir encadré durant mes stages à l'IGBMC. Je la remercie pour son investissement et son enthousiasme qui m'a permis d'acquérir beaucoup de connaissances scientifiques grâce à ses nombreuses explications. «Thank you so much Karen, you helped me to improve also my English and it was an honor for me to work with you».

Je tiens également à remercier **Madame Valérie FRAULOB** pour sa disponibilité et la qualité de ses explications et conseils tout au long de la réalisation de l'hybridation *in situ*.

Je remercie également **Dr Supawich MORKMUED** (Tun) ainsi que **Madame Brigitte SCHUHBAUR** que pour leur disponibilité et leurs précieux conseils scientifiques. «Thank you so much Tun for helping me when i was in Strasbourg, you're a very kind friend».

Je remercie l'ensemble de l'équipe de l'IGBMC (surtout **Muriel** et **Carole**) pour leurs encouragements écoute et gentillesse à mon égard qui m'a permis de découvrir les multiples facettes du travail de chercheur.

Je remercie également **Marzena** et **Sébastien** et tous les membres de l'équipe du Centre de référence des manifestations odontologiques des maladies rares et l'odontologie Pédiatrique pour votre collaboration et votre soutien.

Un grand merci à tous les patients et leurs familles qui ont participé dans ce travail et au Projet RARENET cofinancé par le FEDER de l'UE dans le cadre du programme INTERREG V Rhin supérieur ([www.rarenet.eu](http://www.rarenet.eu)).

Enfin je souhaite associer à ces remerciements tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, en particulier tous les personnels de la Faculté de médecine dentaire de rabat et le centre hospitalier universitaire Rabat : le centre de consultation et traitement, service odontologie pédiatrique.

## SOMMAIRE

<b>Introduction</b>	12
<b>Chapitre 1 : Odontogenèse et les gènes régulateurs de développement dentaire</b>	13
<b>I- Le développement dentaire</b>	13
<b>I-1. La denture humaine</b>	13
<b>I-2. La denture de la souris</b>	13
<b>I-3. Facteurs de croissance et de signalisation</b>	14
<b>I-4. Les gènes impliqués dans l'odontogenèse</b>	15
<b>I-5. Etapes de l'odontogenèse</b>	15
<b>I-5-1. Initiation dentaire</b>	15
<b>I-5-2. Placode</b>	18
<b>I-5-3. Transition du stade bourgeon au stade capuchon</b>	18
<b>I-5-3. Stade cloche</b>	19
<b>I-5-4. Cytodifférenciation cellulaire</b>	19
<b>I-5-4.a. Les odontoblastes</b>	19
<b>I-5-4.b. Les améloblastes</b>	20
<b>I-5-5. L'éruption</b>	20
<b>II- La formation et structure de l'émail</b>	20
<b>II-1. La formation de l'émail</b>	20
<b>II-1.1. Stade pré-sécrétoire</b>	22
<b>II-1.2. Stade sécrétoire</b>	23
<b>II-1.3. Stade de maturation</b>	23
<b>II-2. Structure de l'émail</b>	25
<b>II-2.1. Structure primaire de l'émail</b>	25
<b>II-2.2. Structure secondaire de l'émail</b>	27
<b>Chapitre 2 : Amélogenèses imparfaites</b>	31
<b>I. Caractéristiques cliniques et classification des amélogenèses imparfaites</b>	31
<b>I-1. Généralités</b>	31
<b>I-1.1. Définition</b>	31
<b>I-1.2. Prévalence</b>	31
<b>I-1.3. Transmission</b>	31

<b>I-2. Classification clinique des AI</b>	31
<b>I-2.1. La forme hypoplasique</b>	31
<b>I-2.2. La forme hypominéralisée</b>	32
<b>I-2.3. La forme hypomature</b>	33
<b>I-3. Diagnostic des AI</b>	33
<b>I-4. Relation entre le type des AI et les stades de l'amélogenèse</b>	34
<b>II- Classifications des amélogenèse imparfaite selon les gènes impliqués</b>	34
<b>II-1. AI isolées de type hypoplasique</b>	35
<b>II-2. AI isolées de type hypominéralisée</b>	41
<b>II-3. AI isolées de type hypomature</b>	43
<b>II-4. AI syndromiques</b>	45
<b>II-5. Evolution de la classification des AI</b>	52
<b>Chapitre 3 : Approches expérimentales</b>	59
<b>I- Projet de recherche</b>	59
<b>I-1 Registre D[4]/Phenodent</b>	60
<b>I-2. Prélèvements salivaires</b>	60
<b>I-3. Extraction d'ADN</b>	61
<b>I-4. Quantification de l'ADN</b>	61
<b>II- Séquençage Sanger</b>	62
<b>II-1-. Séquence de référence</b>	62
<b>II-2. Choix des amorces</b>	62
<b>II-3. PCR (Polymérase Chain Reaction) et mise au point</b>	62
<b>II-4. Amplification</b>	63
<b>II-5. Electrophorèse sur gel d'agarose</b>	63
<b>II-6. Purification, mise en suspension</b>	64
<b>II-7. Lecture des résultats</b>	64
<b>II-8. Validation et ségrégation familiale</b>	64
<b>III- Séquençage à haut débit ciblé</b>	64
<b>III-1. Les étapes communes du séquençage haut débit</b>	65
<b>III-2. Séquençage à haut débit ciblé</b>	65
<b>IV- Validation d'un nouveau gène chez la souris</b>	66
<b>IV-1. Production d'embryons</b>	66

IV-2- Recueil des embryons	66
IV-3. Préparation des tissus	67
IV-4. Synthèse des sondes	67
IV-5. Hybridation in situ	68
<b>Résultats-Publications</b>	70
I- <b>A rare association - amelogenesis imperfecta, platispondyly and bicytopenia: a case report [1]</b>	71
II- <b>A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement [2]</b>	76
III- <b>Amelogenesis Imperfecta: 1 Family, 2 Phenotypes, and 2 Mutated Genes [3]</b>	103
IV- <b>Enamel-renal syndrome with congenital heart defects and asthma: a rare association in a Moroccan child [4]</b>	111
V- <b>Validation de nouveaux gènes par l'étude de modèles animaux</b>	115
<b>Discussion-perspectives</b>	117
<b>Conclusion</b>	121
<b>Résumé</b>	123
<b>Annexes</b>	126
<b>Références bibliographiques</b>	140

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Stades du développement dentaire	13
<b>Figure 2</b> : Comparaison des dentitions humaine et murine	14
<b>Figure 3</b> : Voies de signalisation régulant le développement dentaire (FGF, BMP, SHH, Wnt, TNF)	15
<b>Figure 4</b> : Patron d'expression des gènes au cours du développement dentaire	17
<b>Figure 5</b> : Interactions épithélio-mésenchymateuses et le centre de signalisation épithéliale régulant l'odontogenèse	18
<b>Figure 6</b> : Cycle de vie de l'améloblaste	21
<b>Figure 7</b> : Schéma des différents stades de l'améloblaste	22
<b>Figure 8</b> : Différentes étapes de la formation de l'email	25
<b>Figure 9</b> : Schéma de l'email prismatique et interprismatique	26
<b>Figure 10</b> : Stries de Retzius et périkymaties, dent sèche	28
<b>Figure 11</b> : Bandes d'Hunter-Schreger , dent sèche	28
<b>Figure 12</b> : Lamelles et touffes de l'email, dent sèche	29
<b>Figure 13</b> : Fuseaux de l'email, dent sèche	30
<b>Figure 14</b> : Amélogénèse imparfaite de type hypoplasique	32
<b>Figure 15</b> : Amélogénèse imparfaite de type hypominéralisée	32
<b>Figure 16</b> : Amélogénèse imparfaite de type hypomature	33
<b>Figure 17</b> : Diagnostic des anomalies de l'email	34
<b>Figure 18</b> : Structure du gène <i>AMBN</i> (A) et produit de clivage protéolytique de l'améloblastine	39
<b>Figure 19</b> : Protocole de prélèvement salivaire (kit Oragene®•DNA)	61
<b>Figure 20</b> : Protocole de quantification (Qubit™)	62
<b>Figure 21</b> : Analyse de la distribution des transcrits de gène <i>X</i> chez la souris par in situ hybridation	116

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Tableau répertoriant les différentes mutations d' <i>AMELX</i>	36
<b>Tableau 2</b> : Tableau répertoriant les différentes mutations d' <i>ENAM</i>	38
<b>Tableau 3</b> : Mutations <i>ITGB6</i> connues sur les différents exons du gène	43
<b>Tableau 4</b> : Tableau répertoriant différentes mutations du <i>MMP20</i>	43
<b>Tableau 5</b> : Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans les AI isolées de type hypoplasique	52
<b>Tableau 6</b> : Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI isolées de type hypominéralisé	55
<b>Tableau 7</b> : Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI isolées de type hypomature	56
<b>Tableau 8</b> : Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI syndromiques	57

## Introduction

Les maladies rares sont définies par leur faible prévalence. Selon L'Union européenne (UE), une maladie rare est une maladie qui touche moins d'une personne sur 2000. En France, elle représente moins de 30 000 personnes pour une maladie rare donnée. Le nombre des maladies rares varie entre 5 000 et 8 000 maladies rares différentes. Les maladies rares se caractérisent par une diversité des manifestations cliniques. Parmi ces manifestations cliniques, on trouve les manifestations phénotypiques bucco-dentaires [5, 6].

Les amélogénèses imparfaites (AI) sont un groupe hétérogène d'altérations de l'émail dentaire d'origine génétique. L'étude des AI permet de développer les connaissances et la compréhension des mécanismes cliniques et génétiques de cette pathologie pour une prise en charge thérapeutique globale des patients et leurs familles.

Le but de ce travail est de combiner l'étude de phénotype clinique et la biologie moléculaire pour améliorer la compréhension de corrélation phénotype-génotype afin de déterminer les mécanismes étiopathogéniques impliqués dans les amélogénèses imparfaites

La stratégie de recherche de ce travail est reposée sur une recherche translationnelle qui est centrée sur l'étude des familles informatives présentant des AI de type isolées ou syndromiques. Dans un premier temps, l'examen clinique, radiographique et l'analyse de l'arbre généalogique ou le mode de transmission supposé sont analysés. Puis en fonction de ces éléments, un protocole de recherche est mis en place au laboratoire pour identifier des nouvelles mutations dans les gènes connus et des nouveaux gènes afin de comprendre la corrélation phénotype-génotype de l'amélogénèse imparfaite.

Ce travail s'articule autour de quatre chapitres. Le premier présente une synthèse bibliographique permettant de faire un état des connaissances concernant l'odontogénèse et les gènes régulateurs de développement dentaire en général et plus particulièrement l'amélogénèse.

Le second chapitre présente des généralités sur les amélogénèses imparfaites, ses étiologies et ses différentes formes.

Le troisième chapitre expose les techniques d'étude choisies ainsi les conditions expérimentales adoptées.

Le dernier chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus sous la forme d'articles publiés dans les revues scientifiques.

Enfin, une conclusion et quelques perspectives viendront clôturer notre travail.

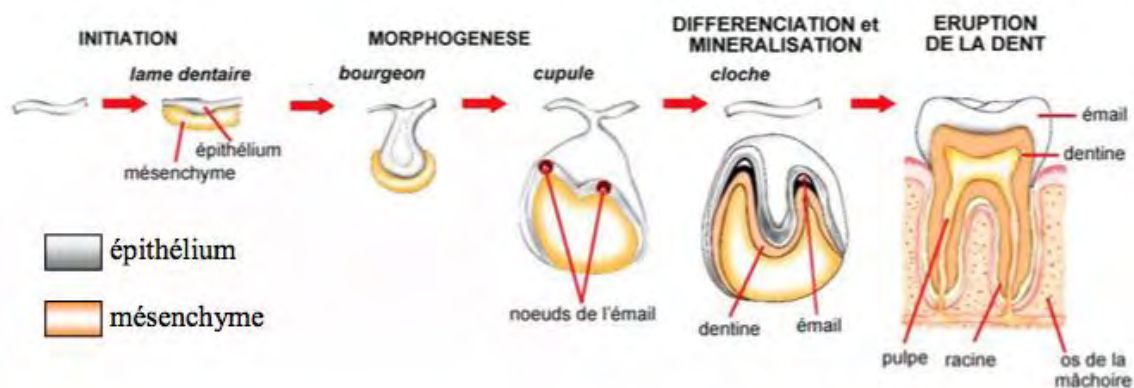


# Chapitre 1 : Odontogenèse et les gènes régulateurs de développement dentaire

## I. Le développement dentaire

### I-1. La denture humaine

Le développement dentaire (l'odontogenèse) chez l'homme commence entre la 6<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de gestation par la formation de la lame dentaire. Cette lame résulte grâce à des interactions entre l'épithélium (l'ectoderme oral) et le mésenchyme qui dérive des cellules des crêtes neurales [7-9]. Ces cellules entraînent la formation du mésenchyme dentaire, la pulpe dentaire, des odontoblastes, de la matrice de la dentine, du cément, du parodonte [10, 11]. L'odontogenèse est caractérisée par plusieurs stades successifs : lame dentaire, bourgeon, capuchon, cloche, cytodifférenciation terminales des odontoblastes et améloblastes, formation radiculaire et éruption (**figure 1**).



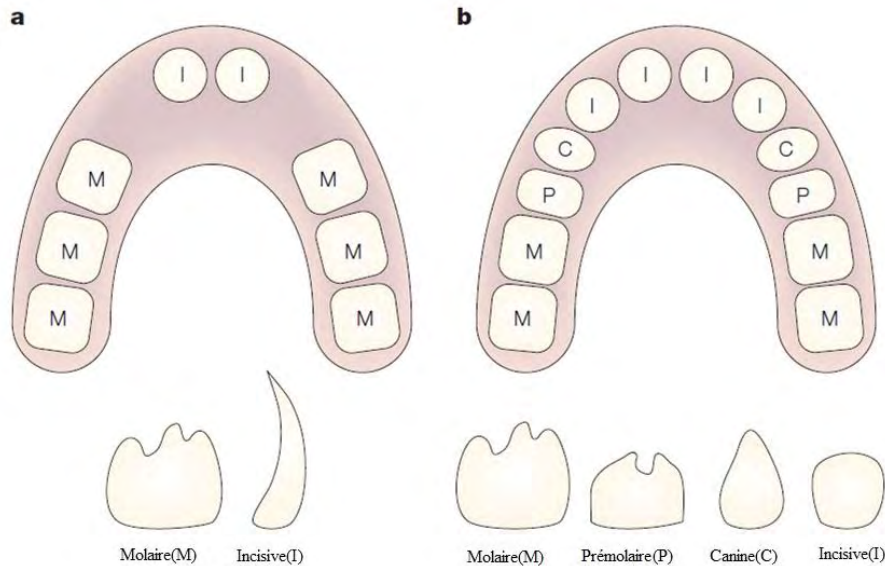
**Figure 1** : Stades du développement dentaire : lame dentaire, bourgeon, capuchon, cloche, formation radiculaire et éruption [12]

### I-2. La denture de la souris

L'odontogenèse chez la souris commence au 12<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (E12). Elle comporte les mêmes différentes étapes que celle chez l'homme.

La denture humaine se diffère de celle de la souris par plusieurs différences. Chez l'homme, la formule dentaire est diphodontie (denture temporaire et denture permanente) et est composée de quatre types de dents (incisives, canines, prémolaires et molaires). Pour la souris, la formule dentaire est monophodontie avec deux types de dents séparées par un espace appelé diastème (incisives et molaires). Les incisives de la souris se caractérisent par une croissance continue et un développement asymétrique [13] (**Figure 2**).

Malgré ces différences, le modèle murin constitue l'un des meilleurs modèles d'étude du développement dentaire chez l'homme. En effet, de nombreux mutants murins porteurs d'anomalies dentaires ont été créés, ressemblant aux anomalies dentaires humaines [14].

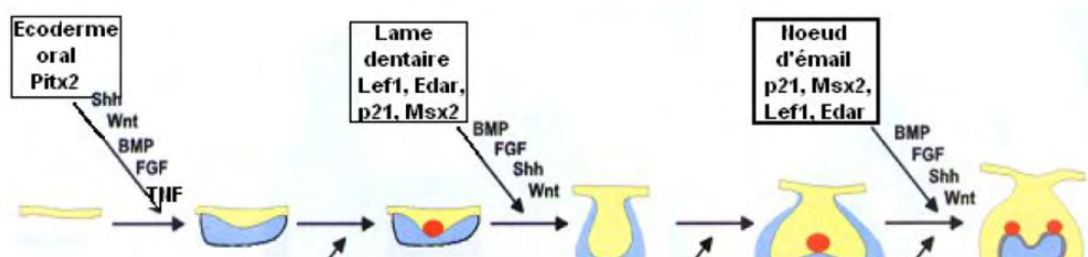


**Figure 2** : Comparaison des dentitions humaine et murine : **(a)** la souris a 3 molaires et une incisive sur chaque hémi-arcade, séparées par diastème. **(b)** la dentition humaine est plus complexe car elle est composée de quatre types de dents (deux incisives, une canine, deux prémolaires et trois molaires par hémi-arcade) [13].

### I-3. Facteurs de croissance et de signalisation

Le développement dentaire est contrôlé par des interactions épithélio-mésenchymateuses continues et réciproques et fait intervenir un programme moléculaire reposant sur des molécules de signalisation et des facteurs de croissance des familles telles que : TGF-beta (Transforming growth factor beta), BMP (Bone morphogenetic proteins) les activines et la follistatine, FGF (Fibroblast growth factors), Shh (Sonic hedgehog), et Wnt (Wingless) [11].

L'expression de facteurs de transcription et de molécules de signalisation vont guider le développement dentaire par la détermination des territoires d'expression dans le maxillaire et la mandibule [15] (**Figure 3**).



**Figure 3** : Voies de signalisation régulant le développement dentaire (FGF, BMP, SHH, Wnt, TNF) [15].

#### **I-4.** Les gènes impliqués dans l'odontogenèse

Plusieurs gènes régulant l'odontogenèse sont identifiés. Jusqu'à présent, plus de 300 gènes ont été associés au développement dentaire [14]. L'expression de ces gènes aux différents stades de l'odontogenèse est répertoriée dans la base de données de l'Université d'Helsinki <http://bite-it.helsinki.fi>. [16].

#### **I-5.** Etapes de l'odontogenèse

Le développement dentaire passe par différents stades successifs. Il se débute par la mise en place des territoires spécifiques dans l'épithélium oral et le mésenchyme sous-jacent. Il se termine par la détermination des morphologies de dents [17].

##### **I-5-1.** Initiation dentaire

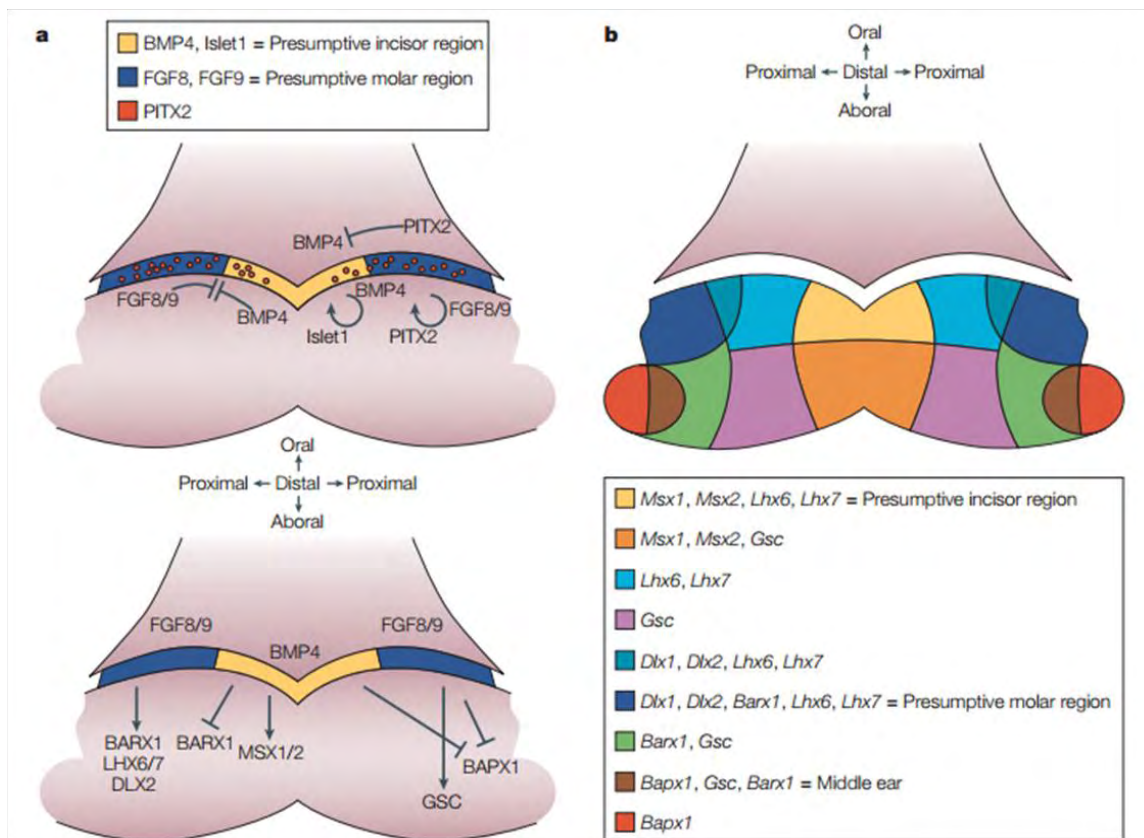
Au cours de cette phase, différents processus cellulaires et moléculaires déterminent le type exact, la position et l'orientation de chaque dent lors du développement de l'arcade [17].

La colonisation des cellules des crêtes neurales au niveau du premier arc branchial va permettre l'expression de molécules de signalisation qui va induire la régionalisation et la segmentation de premier arc branchial. L'identité dentaire va se déterminer par une combinaison des gènes à homéoboîte divergents et des facteurs de croissance [17].

Les cellules des crêtes neurales qui dérivent de la partie postérieure du mésencéphale et des rhombomères 1, 2 vont migrer vers le premier arc branchial et la formation ensuite de l'épithélium odontogène au niveau de la partie inférieure du bourgeon nasal [7-9].

Les interactions entre l'épithélium et le mésenchyme vont contrôler les étapes d'initiation. Le centre de signalisation précoce est initié par le premier signal épithélial de BMP4 qui va entraîner l'expression de *Msx1* et *Msx2* au niveau de l'ectomésenchyme [17]. Le deuxième signal épithélial de *Fgf8* et *Fgf9* vont induire l'expression du gène de l'homéoboîte *Barx1*. D'autres facteurs de transcription ont été identifiés dans le mésenchyme et qui sont régulés par les signaux d'origine épithéliale [17]. Les FGFs entraînent l'expression des gènes de l'homéoboîte *Lhx6* et *Lhx7*, *Msx1*, *Pax9*, *Dlx1* et *Dlx2* [17, 18]. D'autres études ont identifiés des cibles communes pour la signalisation épithéliale du BMP et FGF, y compris *Msx1*, *Dlx2*, *Runx2* dans le mésenchyme dentaire [18-23] (Figure 4).

Tucker et Sharpe (1999) ont proposé une explication pour la détermination de l'identité dentaire par la présence d'un code combinatoire des gènes à homéoboîte divergents qui s'expriment dans des régions spécifiques du mésenchyme du maxillaire et de la mandibule [24].



**Figure 4** : Le patron d'expression des gènes au cours du développement dentaire :

(a) : La signalisation épithéliale du BMP et FGF entraînent l'expression de plusieurs gènes à homéoboîte divergents dans le mésenchyme dentaire. Ceci active le patron d'expression complexe de gènes dans le mésenchyme dentaire.

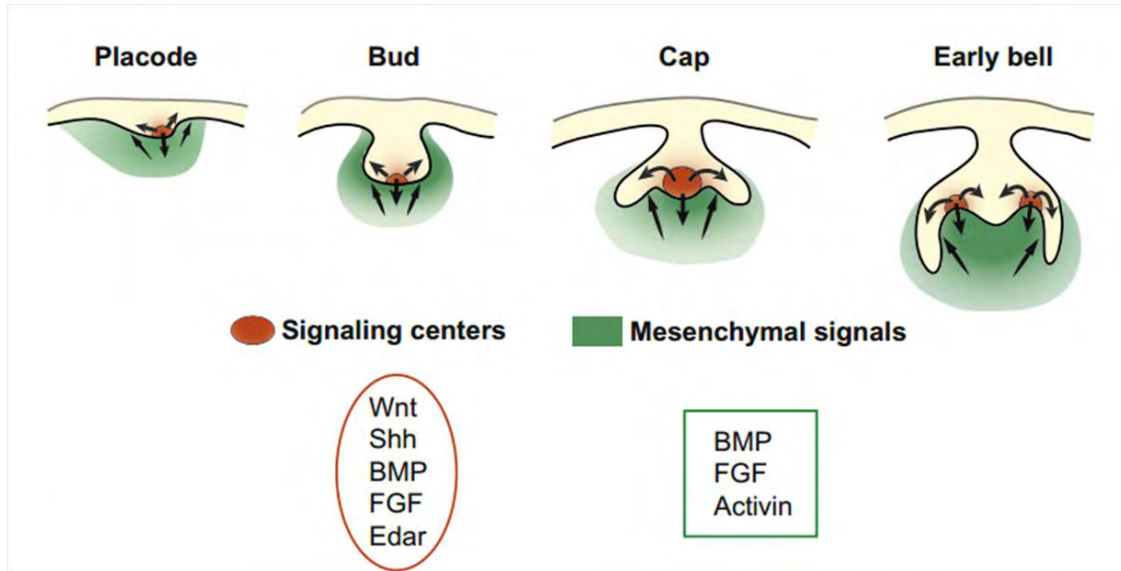
(b) : Le code modèle de gènes à homéoboîte divergents expliquant l'identité dentaire. L'expression chevauchante des gènes dans la mandibule crée un code qui détermine la position de chaque type de dents. *Bapx1*, bagpipe-like homeobox gene 1; *Barx1*, BarH-like homeobox 1; *Dlx*, distal-less homeobox; *Gsc*, goosecoid; *Lhx*, LIM-homeodomain genes; *Msx*, msh-like homeobox; *Pitx*, paired-related homeobox gene [13].

### I-5-2. Placode

La formation des placodes ectodermiques commence par des épaissements de l'épithélium à la position de chaque type de dents. Le centre de signalisation épithéliale exprime

les 4 grandes familles des molécules de signalisation conservées avec Edar, le récepteur de l'ectodysplasine (Eda) [16, 25].

Des indices indiquent que Wnt/ $\beta$ -catenin peut être le signal le plus en amont initiant la formation des centres de signalisation. La signalisation Wnt/ $\beta$ -catenin a été déjà montrée en amont de *Fgf4*, *Fgf20* et *Lef1* dans les nœuds d'émail [26, 27] (Figure 5).



**Figure 5:** Les interactions épithélio-mésenchymateuses et le centre de signalisation épithéliale régulant l'odontogenèse [17]:

### I-5-3. Transition du stade bourgeon au stade capuchon

La transition bourgeon-capuchon est une étape critique dans la morphogenèse dentaire. Cette étape est caractérisée par la transition du potentiel d'induction vers le mésenchyme avec la formation des centres de signalisation appelés nœuds de l'émail [17].

BMP mésenchymateux régule la transition du stade bourgeon au stade capuchon et initie la formation des nœuds de l'émail par l'induction de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendant p21, ce qui induit probablement l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules du nœud de l'émail [28].

Shh est le seul membre de famille hedgehog qui intervient à la fois dans les interactions épithélio-mésenchymateuse et épithéliale-épithéliale. Son expression est limitée à l'épithélium dentaire. Après son expression dans la lame dentaire, Shh est restreint aux placodes et aux nœuds de l'émail [29].

EDA est une molécule de signalisation de la famille de la nécrose tumorale. Le domaine d'expression de l'*Eda* dans l'épithélium oral et l'épithélium dentaire est régulé par la

signalisation Wnt intraépithéliale, tandis que l'activine mésenchymateuse régule le domaine d'expression de son récepteur, Edar, qui est restreint à la lame dentaire, aux placodes et aux nœuds d'émail [17].

Les Wnts sont nécessaires à l'expression de *Fgf4* dans les nœuds de l'émail [17].

#### **I-5-3. Stade cloche**

La formation des cuspides des molaires est initiée par la formation de nouveaux centres de signalisation appelés les nœuds de l'émail secondaires qui se localisent aux sommets des cuspides. Les interactions tissulaires impliquées par la signalisation de toutes les familles de signaux conservés et leurs inhibiteurs déterminent les emplacements et les hauteurs des cuspides. Ce processus est régulé par un mécanisme de réaction-diffusion de type Turing qui a été impliqué dans les placodes et implique des molécules de signalisation diffusibles, leurs inhibiteurs et une inhibition latérale [30-32].

La mort cellulaire programmée induit la disparition et la fin de l'activité des centres de signalisation des nœuds de l'émail secondaires [24, 33].

#### **I-5-4. Cytodifférenciation cellulaire**

La cytodifférenciation cellulaire commence par la différenciation terminale des cellules mésenchymateuses en odontoblastes et la différenciation des cellules de l'épithélium dentaire interne en améloblastes. Cette différenciation est contrôlée par des interactions épithélio-mésenchymateuses [17].

##### **I-5-4.a. Les odontoblastes**

Les odontoblastes se différencient suivant un gradient temporo-spatial du sommet des cuspides vers le collet. Le moment et l'emplacement de la formation de nœuds d'émail suggèrent que les nœuds d'émail sont la source des premiers signaux inductifs pour la différenciation des odontoblastes [34, 35].

La signalisation BMP / TGF $\beta$  a été souvent impliquée dans l'induction de la différenciation des odontoblastes. Il est montré aussi que la signalisation Wnt est importante pour la différenciation terminale des odontoblastes [17].

##### **I-5-4.b. Les améloblastes**

Les améloblastes se différencient suivant le même gradient spatio-temporel, mais décalé dans le temps. La différenciation terminale des améloblastes est déclenchée par la présence des odontoblastes fonctionnelles qui secrètent la matrice prédentine. Les BMP dérivées des

odontoblastes sont nécessaires pour la différenciation des améloblastes, en particulier BMP4 qui induit l'expression des marqueurs améloblastes p21 et améloblastine [36].

Les améloblastes sécrètent et résorbent les protéines de l'émail durant les stades de maturation via les protéinases enamelysine (MMP20) puis kallikréine 4 (KLK4) [37].

#### **I-5-5. L'éruption**

L'éruption dentaire est une série de processus physiologiques complexes qui se produisent une fois que la couronne est formée complètement, ainsi que lorsque la dent se déplace vers le plan occlusal. La plupart des études indiquent que le processus d'éruption dentaire implique l'os alvéolaire, les follicules dentaires, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les cytokines multiples. Les follicules dentaires régulent à la fois la résorption et la formation de l'os alvéolaire, ce qui est nécessaire pour l'éruption dentaire. En outre, la formation des racines avec le ligament parodontal facilite l'éruption continue des dents. Cependant, les mécanismes de l'éruption dentaire demeurent incertains [38].

## **II. Amélogénèse et structure de l'émail**

### **II-1. La formation de l'émail**

L'amélogénèse est la formation de l'émail par les améloblastes. Elle se déroule selon les étapes suivantes : la synthèse et la sécrétion des molécules de la matrice organique, la minéralisation puis la maturation de l'émail. L'émail est constitué d'une phase minérale 96% à 98 % sous la forme des cristaux d'hydroxyapatites et d'une phase organique 2% composée de protéines de structure, de lipides, de phospholipides, d'enzymes et d'eau [39].

L'amélogénèse est limitée dans le temps, ainsi l'émail de chaque dent se forme durant une période déterminée. Si une anomalie pouvant toucher l'émail intervient durant ce temps, seules les dents dont la formation de l'émail est en cours seront atteintes (sites concomitants de minéralisation) [39].

L'amélogénèse commence à partir du stade cloche au niveau des futurs bords incisifs ou aux futures pointes cuspidiennes et se termine jusqu'au collet de la dent [39].

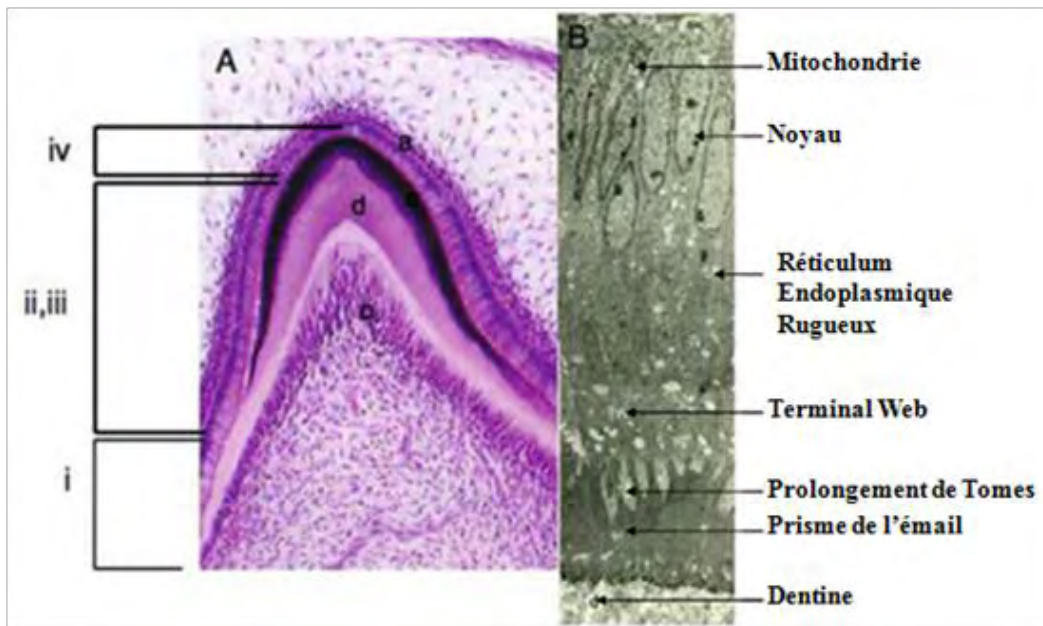
Les améloblastes sont responsables de la formation et du maintien d'un milieu extracellulaire favorable à la formation de l'émail. Ils sécrètent les protéines matricielles qui contrôlent le dépôt de la phase minérale. Ces cellules possèdent un cycle cellulaire à la fois unique et complexe [39] (**Figure 6**).



Les améloblastes subissent plusieurs modifications phénotypiques au cours de la formation de l'émail reflétant l'évolution de leurs fonctions : stade pré-sécréteur, sécréteur, et post-sécréteur [39].

Au cours de la formation de la couronne d'une dent, nous pouvons observer le cycle de la vie des améloblastes.

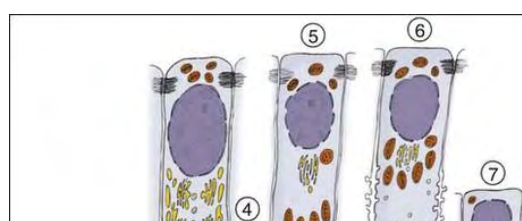
Ces améloblastes seront successivement : présécréteurs, sécréteurs sans prolongement de Tomes, sécréteurs avec prolongement de Tomes, de maturation et de protection (**Figure 7**).



**Figure 6** : Cycle de vie de l'améloblaste [40].

(A) coloration à l'hématoxyline et éosine d'une incisive, montrant le cycle de vie des améloblastes. (i) stade pré-sécrétoire ; (ii) et (iii) : stade sécrétoire (sans prolongement de Tomes) et améloblastes sécrétoires (avec prolongement de Tomes sécrétant l'émail ; (iv) stade de maturation. a : améloblaste ; o : odontoblastes ; e : matrice amélaire ; d : dentine.

(B) : microscopie électronique à transmission des améloblastes au stade sécrétoire. La cellule est caractérisée par un large réticulum endoplasmique rugueux, un appareil de Golgi localisé au centre du cytoplasme, des granules sécrétoires qui migrent en direction distale de la cellule.



**Figure 7:** Schéma des différents stades de l'améloblaste :

**1** : Préaméloblastes ; **2** : Améloblaste présécréteur ; **3** : stade sécrétoire (1<sup>ère</sup> couche de l'émail aprismatique); **4** : stade sécrétoire (émail prismatique); **5**, stade de maturation (aspect plissé d'améloblaste); **6** : stade de maturation (aspect lisse d'améloblaste); **7** : stade de protection ; 5+6= Modulation [41].

### **II-1.1.** Stade pré-sécrétoire

Les pré-améloblastes sortent du cycle mitotique et se différencient en améloblastes pré-sécréteurs. C'est le stade de différenciation.

Les pré-améloblastes subissent des modifications morphologiques : D'abord ils s'allongent et ils se polarisent avec une migration du noyau et ensuite ses mitochondries migrent vers le stratum intermedium [42].

Cette différenciation est suivie d'une dégradation de la membrane basale et la synthèse d'un manteau dentinaire par les odontoblastes.

### **II-1-2.** Stade sécrétoire

Au cours de ce stade, les améloblastes pré-sécréteurs se différencient en améloblastes sécréteurs sans prolongement de Tomes. Les protéines amélaïres sécrétées sont amélogénine, énaméline, améloblastine, tuftéline et la formation des premiers cristaux d'hydroxyapatite.

La première couche de matrice de l'émail est aprismatique (émail aprismatique interne) et elle forme la jonction émail-dentine [39] (**Figure 8**).

Après le dépôt de l'émail aprismatique interne, les améloblastes forment les prolongements de Tomes. Ces prolongements sont des extensions cellulaires, riches en éléments du cytosquelette (microtubules et microfilaments) qui dirigent les granules de sécrétion vers deux sites distincts. Le site de sécrétion proximal responsables des sécrétions et réabsorptions, sécrète la substance interprismatique par plusieurs améloblastes. Au site de sécrétion distale, chaque améloblaste forme un prisme d'émail [39].

Pendant le stade sécrétoire, l'émail formé est un émail immature. Il est composé de 37 % de minéral, 19 % de matrice organique et 44 % d'eau. La matrice organique de cet émail est formée de protéines non-collagéniques (amélogénine, énaméline, améloblastine, produites au niveau du réticulum endoplasmique rugueux), des enzymes (MMP20, KLK4) [43]. Cette matrice sert d'échafaudage pour contrôler l'organisation des cristallites (ions calcium, phosphates, cristaux d'hydroxyapatite) de la phase minérale.

La plus grande partie des protéines de la matrice amélaïre organique sont dégradées par des protéases avant la phase de maturation [39].

La couche de matrice amélaïre organique se caractérise par l'insolubilité et la résistance à la dissolution qui rendent difficile de déterminer sa composition moléculaire.[44]. Une partie des améloblastes dégènèrent par apoptose et le reste des améloblastes se raccourcissent et forment une nouvelle membrane basale au contact de l'émail immature [39].

### **II-1-3. Stade de maturation**

Au cours de la maturation de l'émail, les cristaux d'émail se développent en épaisseur et en largeur. Cette croissance s'effectue par l'élimination des protéines de la matrice amélaïre par les protéases. Les améloblastes restants vont subir des changements morphologiques : la réduction de leur taille et la diminution du nombre des organites de synthèse. Leur pôle distal varie d'une manière cyclique de 5 à 7 fois entre deux bordures (bordure lisse et bordure plissée), c'est le processus de modulation. Ils passent 80% de leur vie sous forme plissée et 20% à l'état lisse [39].

Ce processus permet une balance entre l'acidification et la neutralisation du pH, la dégradation des fragments protéiques de l'amélogénine et le transport des ions calcium et phosphate vers l'émail pour la croissance des cristaux [39].

L'améloblaste à aspect plissé présente une activité d'endocytose et contient un nombre important de lysosomes, de protéines de liaison au calcium, et des calcium-ATPases membranaires, qui permettent l'entrée des ions calcium durant la phase de maturation [39].

Pour l'améloblaste à aspect lisse, des ions calciums traversent la membrane de l'améloblaste vers l'émail. Et quand l'améloblaste plissé, le niveau de calcium est élevé avec une croissance du cristal de l'émail, associée à une chute du pH et des échanges ioniques importants [39].

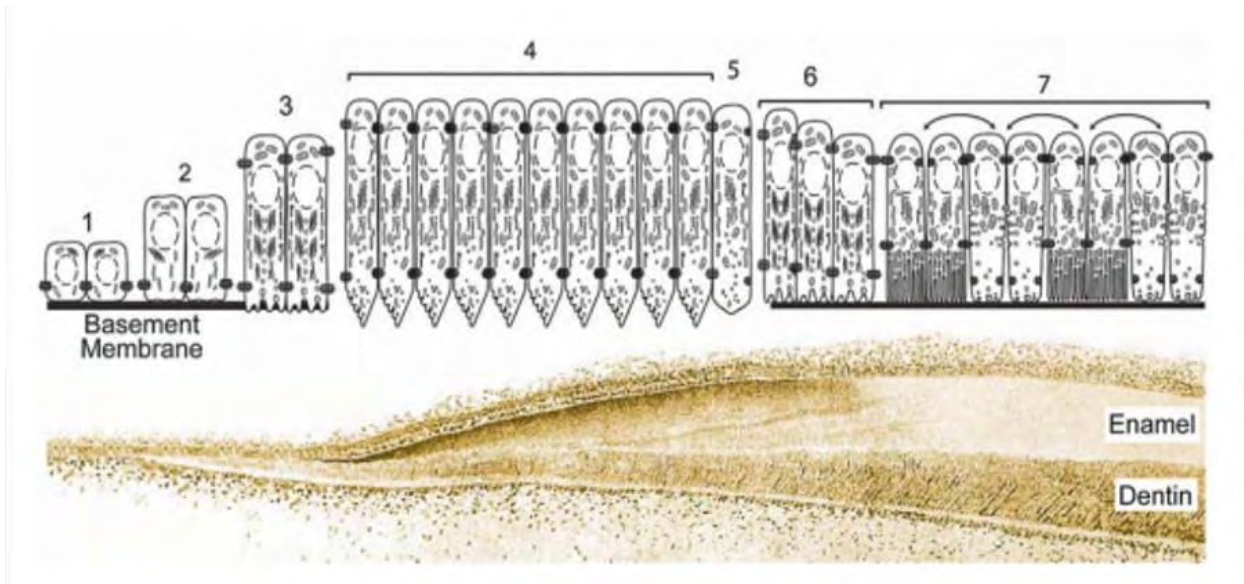
L'intégration des ions dans le cristal de l'émail est liée à l'aspect plissé des bordures. Les enzymes de dégradation de la matrice amélaire digèrent dans la partie extracellulaire les protéines matricielles en des fragments qui peuvent traverser la couche amélaire. Ces fragments peptidiques passent par les jonctions du pôle distal des améloblastes lisses et diffusent latéralement, pour être réabsorbées sur la surface basolatérale. D'autres fragments protéiques de la couche amélaire sont réabsorbés par les améloblastes plissés qui présentent des invaginations membranaires d'endocytose [42].

Les améloblastes plissés dans un premier temps secrètent une quantité importante d'anhydrase carbonique de type II qui libère des protons provoquant l'acidification du milieu extracellulaire. Cette acidité est nécessaire au bon fonctionnement de deux enzymes secrétées par ces mêmes améloblastes : MMP20 et KLK4. L'activité enzymatique étant optimale, les enzymes vont pouvoir dégrader les protéines amélares. Cependant, la baisse de pH mènerait à la dissolution des cristallites. Les améloblastes plissés participent à la neutralisation du pH, dans un deuxième temps, par la sécrétion d'ions bicarbonate et le passage de fluides interstitiels vers l'émail depuis les améloblastes lisses [40].

La majorité partie de la matrice organique de l'émail secrétée et transformée enzymatiquement est ensuite dégradée au cours du stade de maturation pour permettre la croissance en épaisseur et en largeur des cristallites. Les améloblastes remplacent la phase organique par la phase minérale pour obtenir le tissu le plus minéralisé (émail) (**Figure 8**).

Dernière étape de la vie de l'améloblaste, il se transforme en améloblaste de protection. Il devient cubique avec une adhésion à la membrane basale par des hémidesmosomes. Les améloblastes de protection vont se confondre avec la couche papillaire et forment l'épithélium réduit de l'émail. Son rôle est de protéger l'émail du follicule dentaire jusqu'à l'éruption de la dent [45].

A l'éruption des dents, toutes les cellules responsables de la formation de l'émail sont détruites. L'émail ne peut donc pas se régénérer mais simplement augmenter sa minéralisation dans un environnement favorable.



**Figure 8** : Les différentes étapes de la formation de l'émail [46]: **1-3** : stade de sécrétion, **4-5** : stade de maturation, **6-7** : stade de minéralisation et **7** : modulation

## II-2. Structure de l'émail

L'émail est la structure la plus minéralisée de l'organisme. Il est organisé en trois couches qui ont une orientation identique avec une continuité de structure [47].

- ✓ La couche aprismatique : La première couche d'émail synthétisée par les améloblastes sans prolongement de Tomes (environ 10  $\mu\text{m}$ ). Elle est en contact avec la jonction émail-dentine.
- ✓ La couche prismatique : Elle est formée par les prismes de l'émail, l'émail inter-prismatique et la gaine du prisme.
- ✓ La couche aprismatique de surface : La dernière couche d'émail synthétisée après l'évolution des prolongements de Tomes (environ 30  $\mu\text{m}$ ).

### II-2.1. Structure primaire de l'émail

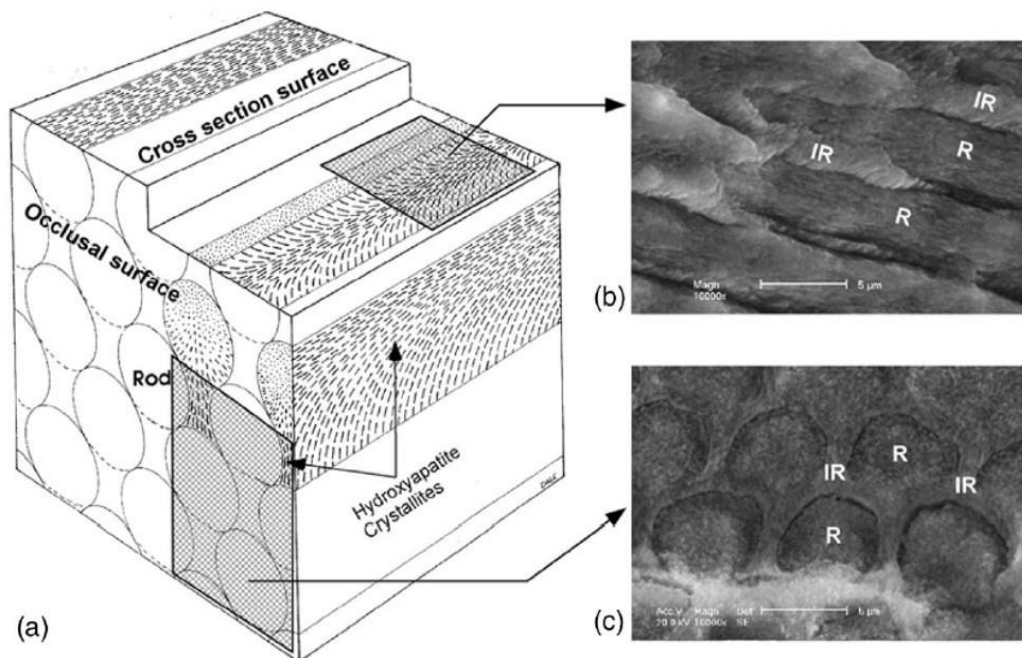
Parmi les structures primaires observées par microscope, on distingue le prisme de l'émail, l'émail inter-prismatique, la gaine du prisme et les cristaux d'hydroxyapatite et [47].

- Prismes d'émail

Les cristaux d'hydroxyapatite et la gaine organique constituent les prismes d'émail (leur diamètre est d'environ 5  $\mu\text{m}$ ). En coupe longitudinale, ces prismes sont parallèles entre eux et perpendiculaires à la jonction émail-dentine (JED). En coupe transversale, les prismes ressemblent à un trou de serrure, et ils vont de la jonction émail/dentine jusqu'à la surface occlusale de la dent [47].

- Email inter-prismatique

Il est situé entre les prismes. Il a une composition proche de l'émail prismatique mais l'orientation est différente de celle des cristaux des prismes. Ainsi les cristaux des prismes sont orientés à  $60^\circ$  par rapport à ceux de l'émail inter-prismatique [47] (**Figure 9**).



**Figure 9** : Schéma de l'émail prismatique et interprismatique (a) et coupes longitudinale (b) et transversale (c) de l'émail prismatique et interprismatique visible en microscopie électronique à balayage. R (rod) : prisme ; IR (interrod) : émail interprismatique [48].

- Gaine du prisme

Elle est localisée à l'interface entre prisme et inter-prisme avec une composition organique.

- Cristaux d'hydroxyapatite

Les cristaux d'hydroxyapatite sont en forme de ruban de section hexagonale, de dimension moyenne 60x20 nm avec 100 nm de diamètre et de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

## II-2.2. Structure secondaire de l'émail

Les structures secondaires observées au microscope sont les stries de Retzius, les périkymaties, les bandes d'Hunter-Schreger, les lamelles, touffes de l'émail et les fuseaux de l'émail [47].

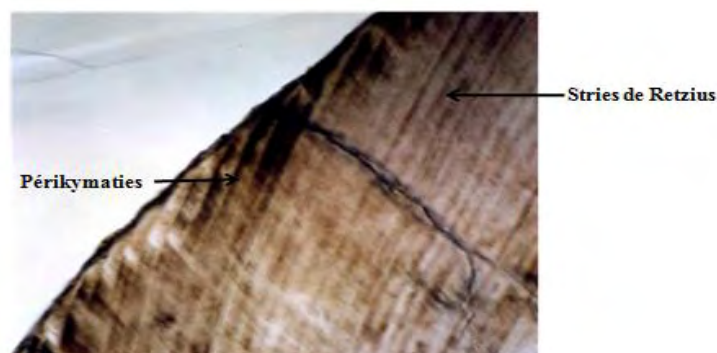
- Lignes ou stries de Retzius

Sur une coupe microscopique, les stries de Retzius sont des lignes brunâtres visibles plus au moins perpendiculaire à la direction des prismes et parallèles entre elles.

Au niveau des cuspides, les stries de Retzius, forment des cercles concentriques à l'axe de la dent et sont identiques sur des dents symétriques d'un même individu. Ces stries correspondent à des lignes de croissance de l'émail qui confirment le mode de croissance par opposition de l'émail. Elles forment une zone hypo minéralisée due à un ralentissement de la croissance de l'émail. La distance entre ces lignes est d'environ 30 à 40  $\mu\text{m}$  soit environ 7 à 8 jours de dépôt minéra [47].

- Périkymaties

Sur une coupe longitudinale, les stries de Retzius partent de la jonction amélo-dentinaire et atteignent la surface de manière oblique. Ils sont parallèles les uns aux autres. Les périkymaties sont absentes au niveau des cuspides mais nombreuses au niveau des collets [47] (**Figure 10**).



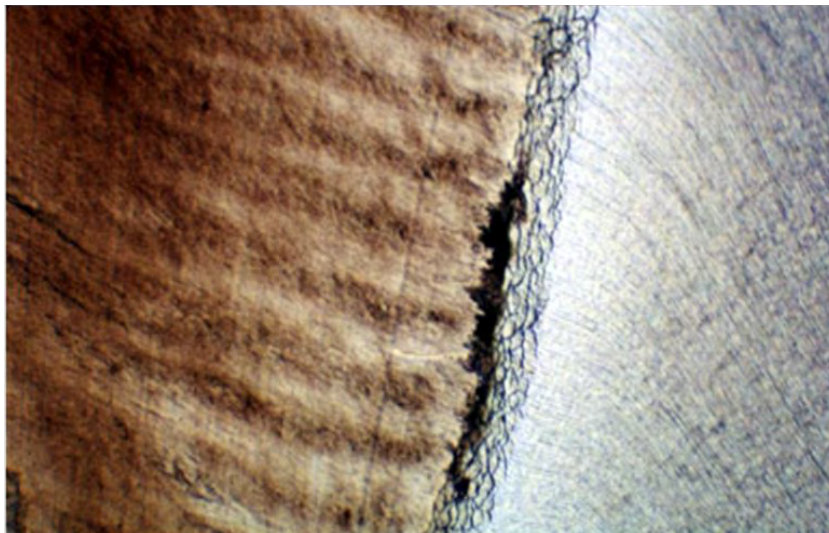


**Figure 10** : Stries de Retzius et périkymaties, dent sèche X100 [49]

- Bandes d'Hunter-Schreger

Ce sont des bandes alternativement claires et sombres que l'on peut apercevoir sur des coupes longitudinales. Ces structures sont expliquées par le trajet ondulatoire des prismes qui devient par groupes dans la moitié interne de la couche de l'émail.

Sur une coupe transversale, les prismes peuvent être en « diazonies » ou en « parazonies » sur une coupe longitudinale. Cette architecture est liée avec les mouvements des améloblastes lors de l'amélogénèse [47] (**Figure 11**).



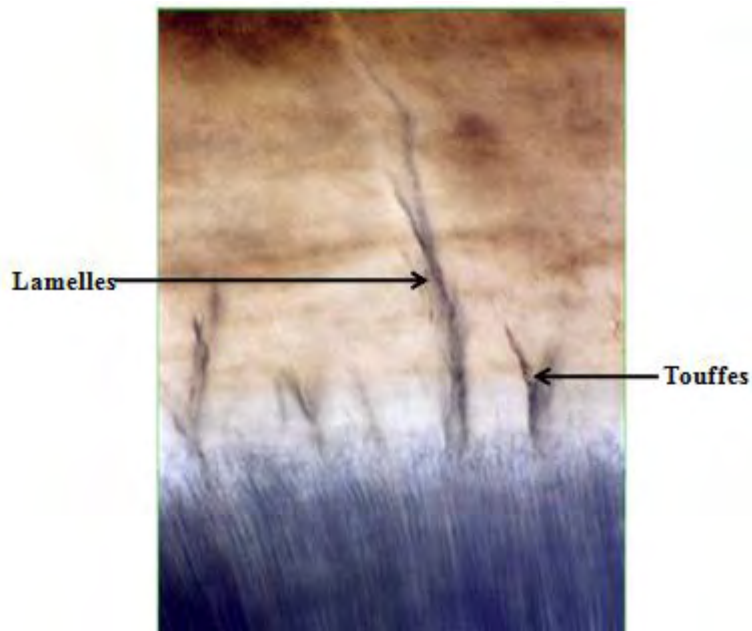
**Figure 11** : Bandes d'Hunter-Schreger , dent sèche X40 [49]

- Lamelles et touffes de l'émail



Les lamelles de l'émail sont des structures fines et longitudinales qui correspondent à un défaut de minéralisation, à une accumulation de matériel organique ou un amas des cellules dégénérées.

Les touffes de l'émail sont des structures arborescentes. Elles correspondent à un dépôt de matériel organique ou à des portions d'émail où les prismes sont entremêlés (**Figure 12**).

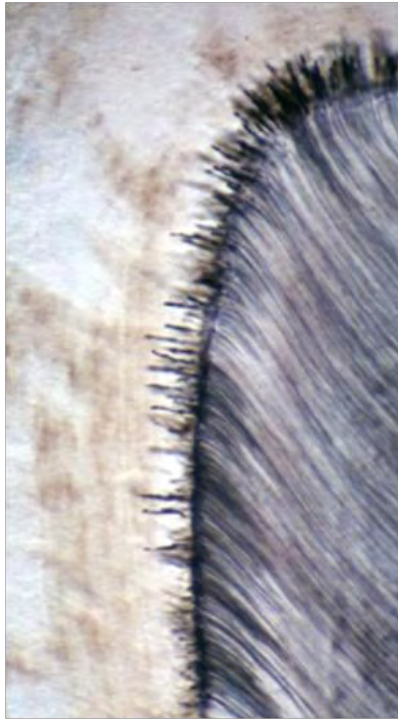


**Figure 12** : Lamelles et touffes de l'émail, dent sèche X200 [49]

- Les fuseaux de l'émail.

Ils correspondent à des restes cytoplasmiques d'odontoblastes intercalés entre les améloblastes durant l'amélogénèse.

A la différence des touffes, les fuseaux ne suivent pas la direction des prismes (**Figure 13**).



**Figure 13** : Fuseaux de l'émail, dent sèche X100 [49]

## **Chapitre 2 : Amélogénèses imparfaites**

### **I- Caractéristiques cliniques et classification des amélogénèses imparfaites**

## **I-1. Généralités**

### **I-1.1. Définition**

Les amélogénèses imparfaites (AI) sont un groupe hétérogène de maladies rares affectant l'émail dentaire. Elles peuvent exister de manière isolée ou associées à d'autres signes cliniques dans le cadre syndromique [50].

### **I-1.2. Prévalence**

La prévalence des amélogénèses imparfaites varie selon les populations étudiées (toutes les formes confondues), elles touchent en moyenne de 1/14 000 (aux Etats Unis) à 1/700 individus (en Suède) [50].

### **I-1.3. Transmission**

Les amélogénèses imparfaites sont des maladies héréditaires qui peuvent être isolées, ou syndromiques. Le mode de transmission peut être autosomique dominant, autosomique récessif ou lié au chromosome X en fonction des gènes incriminés[50].

## **I-2. Classification clinique des AI**

Les amélogénèses imparfaites sont classées en trois grandes formes selon le phénotype de l'émail dentaire : AI hypoplasique, AI hypominéralisée ou AI hypomature. En outre, cette classification clinique n'est pas toujours facile. Dans la mesure où plusieurs formes peuvent exister chez le même patient, voire sur la même dent [51].

### **I-2.1 La forme hypoplasique**

Cette forme représente un défaut quantitatif de l'émail affectant le plus souvent les deux dentures. L'émail est dur mais fragile en raison de sa faible épaisseur. Il présente des puits ou des stries à la surface amélaire. Il apparaît de couleur jaune brunâtre avec un contraste radiologique entre l'émail et la dentine

Une béance antérieure est fréquemment associée à l'amélogénèse imparfaite hypoplasique (**Figure 14**).



**Figure 14** : Amélogénèse imparfaite de type hypoplasique : **a** : un aspect rugueux avec des stries de l'émail. **b** : émail rugueux avec une béance antérieure. **c** et **d** : manifestations phénotypiques différentes chez un sœur (bandes horizontales) et un frère. D'après Bloch-Zupan et al [50]

### I-2.2 La forme hypominéralisée

La forme hypominéralisée est un défaut qualitatif, due à un défaut de minéralisation. L'émail a une épaisseur normale, de couleur jaune brun mais il est mou et peut être percé à la sonde. Radiographiquement, Il n'existe pas de contraste émail-dentine (**Figure 15**).



**Figure 15** : Amélogénèse imparfaite de type hypominéralisée : **e** et **f**: un émail mou, poreux et de couleur jaune brun. D'après Bloch-Zupan et al [50]

### I-2.3. La forme hypomature

C'est un défaut qualitatif, due à un défaut de maturation. L'émail est d'épaisseur normale, relativement dur et présente des colorations blanc crayeux (**Figure 16**).



**Figure 16** : Amélogenèse imparfaite de type hypomature : **g** et **h**: un émail dur avec une épaisseur normale et des colorations blanc craveux. D'après Bloch-Zupan et al [50]

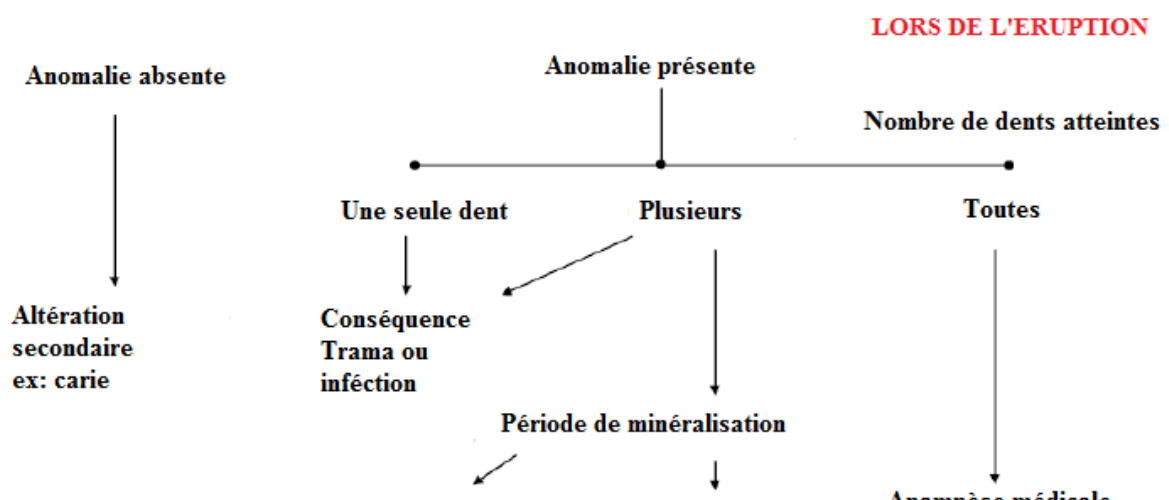
### I-3. Diagnostic des AI

Les anomalies de structure de l'émail peuvent avoir une origine acquise ou origine génétique. Le diagnostic des amélogenèses imparfaites est basé sur l'examen clinique et radiographique.

En effet, dans le cadre d'une seule dent touchée, l'étiologie est la plupart du temps locale ou traumatique (séquelles de traumatismes ou infection d'une dent temporaire par exemple).

Quand un groupe des dents est touché, l'étiologie peut être une toxicité environnementale ou systémique (exposition chimique, antibiotique, tétracyclines, fluorose, carence..).

Enfin l'affection de toutes les dents et des deux dentures peut être parfois un signe d'une étiologie génétique. Ces défauts se retrouvent dans les amélogenèses imparfaites (**Figure 17**).



**Figure 17** : Diagnostic des anomalies de l'émail (schéma adapté à partir de [52])

#### **I-4.** Relation entre le type des AI et les stades de l'amélogénèse.

Les différents phénotypes des amélogénèses imparfaites sont liés aux étapes de la formation de l'émail. Ces phénotypes dépendent à l'expression des gènes impliqués au cours de la formation de l'émail et l'intervention des différentes protéines.

La forme hypoplasique est plutôt en rapport avec les protéines matricielles (AMEL, ENAM, AMBN), alors que la forme hypomature pourrait être reliée avec les protéases (MMP20, KLK4). Enfin la forme hypominéralisée pourrait être en lien avec des éléments du métabolisme phosphocalcique [53].

## **II- Classifications des amélogénèse imparfaites selon les gènes impliqués**

A l'heure actuelle, plusieurs gènes impliqués dans les AI ont été identifiés. Parmi ces gènes il existe des gènes qui codent pour des protéines de structure de l'émail (AMELX, ENAM), pour des enzymes dégradant la matrice protéique (MMP20, KLK4) ; des facteurs de transcription (DLX3) et des protéines impliquées dans le métabolisme phosphocalcique.

Les gènes identifiés sont impliqués soit dans les AI isolées ou bien syndromiques mais parfois ils peuvent être présents dans les deux types. Ainsi, la frontière entre AI isolée et AI syndromique n'est pas toujours déterminée [54].

### **II-1.** AI isolées de type hypoplasique

- **AMELX, AMELY** : gène de l'amélogénine

L'amélogénine (AMELOGENIN, ALGN, AMG, AMGL, AIH1) est codée par le gène *AMEL* situé sur les chromosomes sexuels X et Y. Chez l'homme, les deux gènes s'expriment : le gène *AMELX* (OMIM 300391) (AMELOGENIN, ALGN, AMG, AMGL, AIH1) situé sur le bras court du chromosome X (Xp22.3-22.1) est responsable de 90% des protéines transcrites, alors que *AMELY* (OMIM 410000) (AMELOGENIN, Y-CHROMOSOMAL)), au locus Yp11.2 n'en produit que 10% [55]. De plus, aucun cas d'AI n'est décrite sur le gène *AMELY* à ce jour.

Les amélogénines sont des protéines riches en proline (la proline représente 25 % à 30 % des acides aminés des amélogénines), en glutamine, en leucine et en histidine. Elles constituent 90 % des protéines totales de l'émail en formation [39].

Les amélogénines sont phosphorylées, mais non glycosylées. Elles sont très hydrophobes et relativement basiques. Leur poids moléculaire varie de 5 à 25 kD, à cause de phénomènes d'épissage alternatif des messagers et de protéolyse extracellulaire.

Les amélogénines s'auto-assemblent à l'extérieur de la cellule pour former des agrégats sphériques de 15-20 nanomètres de diamètre appelés nanosphères d'amélogénine. Ces nanosphères se lient à l'hydroxyapatite et contrôlent l'orientation des cristaux en s'interposant entre deux cristaux d'émail et en empêchant les interactions électrostatiques [39].

Une grande diversité phénotypique des AI est observée en rapport avec différentes mutations du gène *AMELX*. Ainsi les hommes présentent un phénotype plus sévère que celui des femmes par l'absence du phénomène de lyonisation chez les hommes [56].

A ce jour 16 mutations distinctes du gène *AMELX* ont été associées à une AI (Table 1).

Le phénotype associé aux mutations d'*AMELX* peut aller de la forme AI hypoplasique à la forme AI hypominéralisée/hypomature. En effet, les phénotypes varient en fonction de la localisation de la mutation affectant la région de la protéine amélogénine (la région du peptide signal, les régions N-terminale et C-terminale) [57].

#	Gene	cDNA	Protein	References
1	g.1378T>C	c.2T>C	p.M1T	[1]
2	g.1387G>C	c.11G>C	p.W4S	[1]
3	g.1387G>A	c.11G>A	p.W4X	[2]

1. Kim J-W, Simmer JP, Hu YY, Lin BP-L, Boyd C, et al. (2004) Amelogenin p.M1T and p.W4S mutations underlying hypoplastic X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 83: 378-383.
2. Sekiguchi H, Kiyoshi M, Yakushiji M (2001) DNA diagnosis of X-linked amelogenesis imperfecta using PCR detection method of the human amelogenin gene. *Dent Japan* 37: 109-112.
3. Lagerstrom-Fermer M, Nilsson M, Backman B, Salido E, Shapiro L, et al. (1995) Amelogenin signal peptide mutation: correlation between mutations in the amelogenin gene (AMGX) and manifestations of X-linked amelogenesis imperfecta. *Genomics* 26: 159-162.
4. Lagerström M, Dahl N, Iselius L, Bäckman B, Pettersson U (1990) Mapping of the gene for X-linked *amelogenesis imperfecta* by linkage analysis. *Am J Hum Genet* 46: 120-125.
5. Lagerström M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, et al. (1991) A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics* 10: 971-975.
6. Lench NJ, Winter GB (1995) Characterisation of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Mutat* 5: 251-259.
7. Aldred MJ, Crawford PJ, Roberts E, Thomas NS (1992) Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Genet* 90: 413-416.
8. Lench NJ, Brook AH, Winter GB (1994) SSCP detection of a nonsense mutation in exon 5 of the amelogenin gene (AMGX) causing X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Hum Mol Genet* 3: 827-828.
9. Kida M, Sakiyama Y, Matsuda A, Takabayashi S, Ochi H, et al. (2007) A novel missense mutation (p.P52R) in amelogenin gene causing X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 86: 69-72.
10. Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, et al. (2011) Amelogenesis Imperfecta: Genotype-Phenotype Studies in 71 Families. *Cells Tissues Organs* 194: 279-283.
- Lee K-E, Lee S-K, Jung S-E, Song SJ, H. CS, et al. (2011) A novel mutation in the AMELX gene and multiple crown resorptions. *Eur J Oral Sci* 119 (Suppl.1): 324-328.
12. Collier PM, Sauk JJ, Rosenbloom SJ, Yuan ZA, Gibson CW (1997) An amelogenin gene defect associated with human X-linked amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol* 42: 235-242.
13. Hart S, Hart T, Gibson C, Wright JT (2000) Mutational analysis of X-linked amelogenesis imperfecta in multiple families. *Arch Oral Biol* 45: 79-86.
14. Ravassipour DB, Hart PS, Hart TC, Ritter AV, Yamauchi M, et al. (2000) Unique enamel phenotype associated with amelogenin gene (AMELX) codon 41 point mutation. *J Dent Res* 79: 1476-1481.
15. Chan HC, Estrella NM, Milkovich RN, Kim JW, Simmer JP, et al. (2011) Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *Eur J Oral Sci* 119: 311-323.
16. Hart PS, Aldred MJ, Crawford PJ, Wright NJ, Hart TC, et al. (2002) Amelogenesis imperfecta phenotype-genotype correlations with two amelogenin gene mutations. *Arch Oral Biol* 47: 261-265.
17. Sekiguchi H, Alaluusua S, Minaguchi K, Yakushiji M (2001) A new mutation in the amelogenin gene causes X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 80: 617.
18. Greene SR, Yuan ZA, Wright JT, Amjad H, Abrams WR, et al. (2002) A new frameshift mutation encoding a truncated amelogenin leads to X-linked amelogenesis imperfecta. *Arch Oral Biol* 47: 211-217.
19. Kindelan SA, Brook AH, Gangemi L, Lench N, Wong FS, et al. (2000) Detection of a novel mutation in X-linked amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 79: 1978-1982.

**Tableau 1** : Tableau répertorient les différentes mutations d'*AMELX* [57] avec les références.

- ***ARHGAP6***

Le gène *ARHGAP6* (OMIM 300118) (GTPase-ACTIVATING PROTEIN, RHO, 6; RHOGAP6) est situé sur le chromosome X, en position Xp22.2 et composé de 17 exons. Le



gène *AMELX* (OMIM 300391) réside dans l'intron 1 d'*ARHGAP6* dans l'orientation opposée [58]. Le gène *ARHGAP6* code pour une protéine de la famille des protéines rhoGAP qui jouent un rôle dans la régulation de la polymérisation de l'actine à la membrane plasmique au cours de plusieurs processus cellulaires.

Des mutations dans le gène *ARHGAP6* et le gène *AMELX* ont été rapportées chez des patients atteints de l'AI avec un phénotype peut aller de la forme hypoplasique à la forme hypominéralisée/hypomature. Le mode de transmission est lié à l'X [57].

- ***ENAM* : gène de l'émailine**

Le gène *ENAM* (OMIM 606585) (ENAMELIN, AIH2) code pour la plus grande protéine de la matrice de l'émail avec un poids moléculaire de 186 kD. Ce gène composé de 9 exons, est situé sur le chromosome 4, en position 4q13.3. L'émailine est impliquée dans la régulation de la croissance des cristallites et participe à leur nucléation et à leur élongation. Elle est très rapidement clivée par des protéases après sa sécrétion, tout d'abord à son extrémité carboxyterminale, ce qui donne naissance à des émailines de plus faible poids moléculaire que l'on retrouve au niveau des prismes et de la substance interprismatique [46, 59].

A l'heure actuelle, 16 mutations dans *ENAM* ont été trouvées (2 d'entre elles avec un mode de transmission). Le phénotype associé à ces mutations est souvent AI hypoplasique, mais la sévérité de l'atteinte dépend de la mutation. Différents phénotypes AI hypoplasique localisée ou généralisée et AI hypomature sont décrits, avec des stries horizontales, des puits localisés, un clivage secondaire de l'émail et une béance [2, 59, 60] (Table 2).

location	cDNA	Protein	Inheritance mode	References
Exon 2	c.123+1G>A	p.[N197I]fs*81	AD	Prasad <i>et al.</i> , 2015
Exon 4	c.107delA	p.Asn361I]fs*22	AD	Simmer <i>et al.</i> , 2013
Exon 5	c.157A>T	p.Lys53*	AD	Mardh <i>et al.</i> , 2002; Kim <i>et al.</i> , 2006
Exon 5	c.139delA	p.M47C]fs*11	AD	Wang <i>et al.</i> , 2015
Exon 6	c.211-2A>C	p.Met71-Gln157del	AD	Kim <i>et al.</i> , 2005a
Exon 7	c.358C>T	p.Gln120*	AD	Seymen <i>et al.</i> , 2014
Exon 7	c.454G>T	p.Glu152*	AD	Seymen <i>et al.</i> , 2014
Exon 7	c.406_407ms TCAAAAAAG CCGACCACAA	p.K136I]fs*16	AD	Wang <i>et al.</i> , 2015
Exon 8	c.534+1G>A	p.Ala158-Gln178del	AD	Rajpar <i>et al.</i> , 2001; Song <i>et al.</i> , 2012

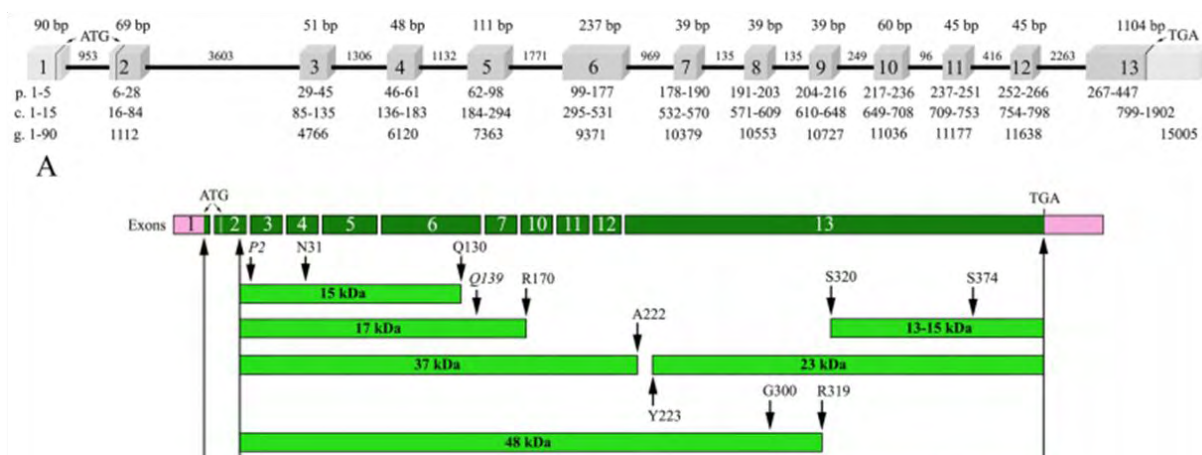
**Tableau 2:** Tableau répertoriant les différentes mutations d'*ENAM* (adapté à partir de [61]).

- ***AMBN***

Le gène *AMBN* (OMIM 601259) (AMELOBLASTIN ENAMEL MATRIX PROTEIN), est localisé sur le chromosome 4, en position 4q13.3, composé de 13 exons et code pour l'améloblastine. L'améloblastine est une protéine matricielle localisée au niveau des prolongements de Tomes des améloblastes au stade sécrétoire. Elle présente un peu d'affinité pour l'hydroxyapatite. Son rôle serait assurer l'adhésion des améloblastes sécréteurs à la matrice de l'émail [62] (**Figure 18**).

La première mutation trouvée dans ce gène provoquant une AI hypoplasique avec un mode de transmission autosomique récessif est une délétion de l'exon 6 [63].

Prasad et al. ont identifié une nouvelle mutation homozygote au niveau de site d'épissage de l'exon 5 (c.532-1G>C) [2].



**Figure 18** : Structure du gène *AMBN* (A) et produit de clivage protéolytique de l'améloblastine (B) [64]

- ***LAMB3***

Le gène *LAMB3* (OMIM 150310) (LAMININ BETA-3, LAMININ B3, LAMININ 5 BETA-3 SUBUNIT, LAM5 BETA-3 SUBUNIT, BM600-125kDa, kalinin-140kDa, LAMNB1, nicein-125kDa), est localisé sur le chromosome 1, en position 1q32.2, composé de 22 exons et code pour une sous unité de la laminine 5 de la famille des laminines. Ces protéines interviennent dans la croissance et l'adhésion cellulaire [65].

En cas de mutation de *LAMB3*, le phénotype AI hypoplasique est observé en dents temporaires et permanentes avec un mode de transmission autosomique dominant [2, 66].

Des mutations homozygotes de *LAMB3* (comme *COL17A1*, *LAMA3* et *LAMC2*) sont responsables d'une maladie appelée épidermolyse bulleuse jonctionnelle (JEB) (OMIM 226650). Il s'agit d'un groupe des pathologies héréditaires récessives caractérisées la formation de bulles et d'érosions cutanéomuqueuses qui se forment spontanément ou à la suite de traumatismes minimes [67].

Les patients porteurs de mutations hétérozygotes de ces gènes présentent des anomalies dentaires en particulier amélaire sans fragilité cutanéomuqueuse [66].

- ***LAMA3***

Le gène *LAMA3* (OMIM 600805) (LAMININ ALPHA-3, LAMA3, LAMININ A3, LAMININ5 ALPHA-3SUBUNIT, LAM5 ALPHA-3 SUBUNIT, EPILIGRIN 170-KD SUBUNIT, BM600, BM600-150kDa, epiligrin, kalinin-165kDa, LAMNA, nicein-150kDa) est localisé sur le chromosome 18, en position 18q11.2, composé de 75 exons et code également une sous unité de la laminine 5 [68].

Des mutations homozygotes de ce gène provoquent des épidermolyses bulleuses, et au syndrome Laryngoonycho-cutané (LOC, OMIM 245660) qui est un sous type d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (OMIM 226650) [69].

Yuen et al. (2012) décrivent des mutations de *LAMA3* à l'état hétérozygote chez des sujets porteurs, parents d'enfants présentant des épidermolyses bulleuses des épidermolyses bulleuses (autosomique récessif) avec des défauts de l'émail [70].

- ***LAMC2***

Le gène *LAMC2* (OMIM 150292) (LAMININ, GAMMA-2; LAMC2) est situé sur le chromosome 1, en position 1q25.3 et composé de 23 exons. Il code pour une sous unité de la laminine 5 de la famille des laminines. Ces protéines interviennent dans la croissance et l'adhésion cellulaire [68].

Des mutations homozygotes de *LAMC2* (comme *COL17A1*, *LAMA3* et *LAMB3*) sont responsables des épidermolyses bulleuses jonctionnelles (JEB) (OMIM 226650) [71].

Les patients ayant de mutations hétérozygotes de ces gènes présentent des anomalies dentaires en particulier amélaire sans fragilité cutanéomuqueuse [72].

- ***COL7A1***

Le gène *COL7A1* (OMIM 120120) (COLLAGEN, TYPE VII, ALPHA-1, LONG-CHAIN COLLAGEN, LC COLLAGEN, EBD1, EBDCT, EBR1), est localisé sur le chromosome 3, en position 3q21.31, composé de 118 exons et code pour la chaîne alpha-1 du collagène de type VII. Ce collagène est un élément majeur de fibrilles d'ancrage dans la zone de la membrane basale épidermique [73].

Ce gène est responsable de l'épidermolyse bulleuse dystrophique avec une transmission autosomique récessive (OMIM 226600) ou dominante (OMIM 131750) [74]. Umemoto et al. ont identifié des défauts amélaire lors de la différenciation des améloblastes chez des souris homozygotes (-/-) pour une délétion de *COL7A1*. Ces défauts sont dus à une déficience en collagène VII [75].

- ***COL17A1***

Le gène *COL17A1* (OMIM 113811) (COLLAGEN TYPE XVII ALPHA-1, COL17A1, BULLOUS PEMPHIGOID ANTIGEN 2, BPAG2, BP180), est localisé sur le chromosome 10, en position 10q24.3-q25.1, composé de 56 exons et code pour le collagène XVII. Ce collagène se fixe à la lame basale d'hémidesmosomes [76].

Des mutations homozygotes de ce gène engendrent des épidermolyses bulleuses jonctionnelles (OMIM 226650) [77]. Comme les gènes *LAMA3*, *LAMB3*, le gène *COL17A1* provoquent une AI hypoplasique à l'état hétérozygote [78].

Prasad et al. ont trouvé que le gène COL17A1 soit le gène le plus souvent muté provoquant l'AI isolée [2].

Les informations concernant ce gène sont développées de manière plus approfondies dans le chapitre « Résultats ».

- ***ITGB4***

Le gène *ITGB4* (OMIM 147557) (INTEGRIN, BETA-4) est situé sur le chromosome 17, en position 17q25.1 et composé de 43 exons. Il code pour une intégrine (glycoprotéine hémidesmosomales) impliquée dans le maintien de l'adhésion de la matrice cellulaire [79].

Ce gène *ITGB4* comme *ITGB6* est responsable des épidermolyses jonctionnelles avec atrésie du pylore (JEB-AP) (OMIM 226730) [80]. Des mutations hétérozygotes de *ITGB4* ont été identifiées chez des sujets présentant des JEB-AP avec un phénotype AI hypoplasique. Le mode de transmission est autosomique récessif [79].

- ***ACPT***

Le gène *ACPT* (OMIM 606362) (ACID PHOSPHATASE, TESTICULAR) est localisé sur le chromosome 19, en position 19q13.33 et composé de 11 exons. Il code pour la phosphatase acide testiculaire [81]. Il a une fonction cruciale pendant le stade sécrétoire de l'amélogénèse [82].

Seymen et al. ont identifié des mutations homozygotes et hétérozygotes dans ce gène chez six familles atteintes d'une AI hypoplasique généralisée. Le mode de transmission est autosomique récessif [82].

## **II-2. AI isolées de type hypominéralisé**

- ***FAM83H***

Le gène *FAM83H* (OMIM 611927) (FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY, MEMBER H, FLJ46072), se situe sur le chromosome 8, en position 8q.24.3 et comporte 5 exons. Il code pour une protéine intracellulaire des améloblastes qui semble intervenir dans la différenciation des pré-améloblastes en améloblastes fonctionnels et dans la minéralisation de la matrice amélaire [83].

Plus de 14 mutations ont été identifiées chez des patients atteints de l'AI hypominéralisée (localisée ou généralisée) de transmission autosomique dominante dans des différentes familles ethniques. Toutes les mutations identifiées sur ce gène sont trouvées au niveau de l'exon 5 du gène *FAM83H* [84].

- ***C4orf26***

Le gène *C4ORF26* (OMIM 614829) (CHROMOSOME 4 OPEN READING FRAME 26, FLJ23657), est localisé sur le chromosome 4, en position 4q21.1, composé de 2 exons et code pour une phosphoprotéine acide de la matrice extracellulaire.

Ce gène semble avoir une fonction dans la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite après phosphorylation de la région C-terminale [85].

Les mutations identifiées sur *C4orf26* causent des AI hypominéralisées à transmission autosomique récessive. L'émail est jaune brun hypominéralisé avec une légère hypoplasie qui signe un défaut de minéralisation précoce [85].

Les informations concernant ce gène sont développées de manière plus approfondies dans le chapitre « Résultats ».

- ***SLC24A4***

Le gène *SLC24A4* (OMIM 609840) (SOLUTE CARRIER FAMILY 24, SODIUM/POTASSIUM/CALCIUM EXCHANGER, MEMBER 4, NCKX4), est situé sur le chromosome 14, composé de 18 exons et en position 14q32.12. Il code pour une protéine jouant un rôle d'échangeur d'ions (transporteur d'ions calcium/sodium /potassium dépendant) [86, 87].

Des mutations homozygotes ont été identifiées chez des familles pakistanaises. La transmission se fait sur le mode autosomique récessif et le phénotype est celui d'une AI hypominéralisée avec une teinte ambrée et de l'émail qui se clive [86].

- ***ITGB6***

Le gène *ITGB6* (OMIM 147558) (INTEGRIN, BETA-6), est localisé sur le chromosome 2, en position 2q24.2 et composé de 16 exons. Il code pour une intégrine (glycoprotéine de l'adhésion cellulaire) retrouvée uniquement sur les cellules épithéliales. Il jouerait un rôle au niveau des récepteurs de la fibronectine et dans l'activation de *MMP20* [88].

Wang et al. ont décrit des mutations hétérozygotes et homozygotes chez deux familles hispaniques atteintes d'une AI hypoplasique [88].

Seymen et al. ont identifié une mutation homozygote chez une famille turque atteinte d'une AI hypominéralisée pimentée avec des puits et des colorations exogènes [89] (Table 3).

Le mode de transmission des mutations est autosomique récessif [90].

Location	cDNA	Protein	Mode of inheritance	References
Exon 4	c.427G>A	p.Ala143Thr	Paternal	Wang <i>et al</i> (2014)
Exon 4	c.517G>C	p.Gly173Arg	Homo	Seymen <i>et al</i> (2015)
Exon 4	c.586C>A	p.Pro196Thr	Homo	Poulter <i>et al</i> (2014a)
Exon 6	c.825T>A	p.His275Gln	Maternal	Wang <i>et al</i> (2014)
Exon 11	c.1846C > T	p.Arg616*	Homo	Wang <i>et al</i> (2014)

**Tableau 3** : Mutations *ITGB6* connues sur les différents exons du gène [89].

### II-3. AI isolées de type hypomature

- ***MMP20***

Le gène *MMP20* (OMIM 604629) (MATRIX METALLOPROTEINASE, ENAMELYSIN), est situé sur le chromosome 11, en position 11q22.2 et composé de 10 exons [Fig. 24]. Il code pour l'énamélysine, métalloprotéinase matricielle responsable de nombreux clivages protéolytiques notamment l'amélogénine. Elle élimine leur domaine C-terminal au stade de maturation ce qui modifie la structure des amélogénines de haut poids moléculaire. Ceci entraîne la dégradation des nanosphères et permet la croissance en épaisseur et en largeur des cristaux de l'émail [91, 92].

Le mode de transmission est autosomique récessif et les formes cliniques retrouvées sont soit une AI hypoplasique hypomature pigmentée ou hypomature pigmentée.

Le phénotype de l'AI hypoplasique-hypomature se caractérise par un émail poreux, jaune opaque avec une usure prématurée[93].

Pour le phénotype de l'AI hypomature pigmentée, l'épaisseur de l'émail est normale, cependant l'apparence est crayeuse, marbrée, et propice aux fractures [94-96] (Table 4).

Mutation	Location	Mode of Inheritance	References
g.115g>a; c.102g>a; p.W34X	exon 1	AR	Papagerakis <i>et al.</i> , 2008 Chan <i>et al.</i> , 2011
g.8,506delA; c.359delA; p.N120Ifs*2	exon 2	AR	Present study
g.13,444c>t; c.389c>t; p.T130I	exon 3	AR	Present study
g. 15,390; c.611A>G; p.H204R	exon 4	AR	Wang <i>et al.</i> , 2013
g.16,250T>A; c.678T>A; p.H226Q	exon 5	AR	Ozdemir <i>et al.</i> , 2005 Wright <i>et al.</i> , 2011
g.18,755G>A; c.910G>A; p.A304T	exon 6	AR	Lee <i>et al.</i> , 2010
g.30,574A>T; c.954-2A>T; p.I319Ffs*19	intron 6	AR	Kim <i>et al.</i> , 2005, 2006 Wright <i>et al.</i> , 2011

**Tableau 4** : Tableau répertoriant différentes mutations du *MMP20* [94].

- ***KLK4***

Le gène *KLK4* (OMIM 603767) (KALLIKREIN-RELATED PEPTIDASE 4, KALLIKREIN 4, KLK-L1, PROTEAS SERINE 17, PRSS17, PROSTASE, PSTS, EMSP, ENAMEL MATRIX SERINE PROTEINASE 1, EMSP1), est situé sur le chromosome 19, en position

19q13.41 et composé de 6 exons. Il code pour la kalikreine-4 (sérine protéinase) qui joue un rôle dans les étapes de nucléation et de minéralisation de l'émail [97].

La seule mutation identifiée sur ce gène, provoque une perte de la fonction catalytique de la protéine, essentielle à la maturation de l'émail, et génère une AI hypomature avec des colorations jaunâtres, marbrées, une surface rugueuse et une épaisseur normale. La transmission se fait sur le mode autosomique récessif [97].

- **WDR72**

Le gène *WDR72* (OMIM 613214) (WD REPEAT-CONTAINING PROTEIN 72, FLJ38736), composé de 20 exons (dont le 1er est non codant), est localisé sur le chromosome 15, en position 15q21.3. Il code pour une protéine du cytoplasme des améloblastes intervenant au niveau des membranes cellulaires lors de la minéralisation de l'émail. Ce gène aurait une action dans la mobilisation des vésicules d'endocytose [98].

Le mode de transmission est autosomique récessif et les signes cliniques sont ceux d'une AI hypomature. Les dents temporaires comme permanentes possèdent un émail crémeux à l'éruption avec une teinte orange-brune. Rapidement cet émail mou subit une attrition importante et s'use [99].

- **GPR68**

Le gène *GPR68* (OMIM 601404) (OVARIAN CANCER G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR 1; OGR1) est situé sur le chromosome 14, en position 14q32.11 et composé de 10 exons. Il code pour un récepteur couplé à protéine G de détection de protons avec une sensibilité dans la plage de pH qui se produit dans le développement de la matrice amélaire au cours de l'amélogénèse [100, 101].

Parry et al. ont décrit trois mutations homozygotes chez des patients atteints d'une AI hypomature. Le mode de transmission est autosomique récessif [100].

- **STIM1**

Le gène *STIM1* (OMIM 605921) (STROMAL INTERACTION MOLECULE 1, D11S4896E, GOK), est situé sur le chromosome 11, en position 11p15.4 et composé de 12 exons. Il code pour un capteur de calcium (qui opère le transfert d'ions calcium du réticulum endoplasmique à la membrane cellulaire via les canaux calciques). Il aurait une action lors de la maturation de l'émail via ce transport trans-cellulaire des ions calcium [87, 102].

D'autres pathologies liées à ce gène telles que le déficit immunitaire combiné par déficit en STIM1 (immunodéficiência 10 IMD10, OMIM 612783) [103], la myopathie avec agrégats tubulaires (TAM1, OMIM 160565) [104], et le syndrome de Stormorken-Sjaastad-Langslet (thrombocytopathie, asplénie, myosis, OMIM 185070) [105].



Picard et al. (2009) ont décrit des patients atteints du syndrome d'immunodéficience 10 ayant des défauts amélaire [103].

- **TUFT1**

Le gène *TUFT1* (OMIM 600087) (TUFTELIN 1), est localisé sur le chromosome 1, en position 1q21.3 et composé de 13 exons. Il code pour la tuftéline, une acido-protéine hydrophile (PM : 66kDa) retrouvée dans la matrice amélaire en formation et au stade de maturation. La tuftéline contient 7 sites de phosphorylation qui pourraient servir à fixer les ions calcium. Elle a une distribution non homogène : elle est présentée en grande quantité à la jonction émail-dentine et dans la substance interprismatique. Sa fonction n'est pas encore totalement définie, cependant ce gène jouerait un rôle majeur dans la nucléation du cristal de l'émail [106, 107].

Aucune mutation dans ce gène liée à l'AI n'a été trouvée. Mais Deutsch et al. ont évoqué une possibilité d'une AI autosomique dominante [106]. .

#### II-4. AI syndromiques

L'amélogénèse imparfaite peut être associée à d'autres manifestations cliniques dans le cadre de syndrome dont certains gènes connus sont identifiés. La frontière entre AI isolée et AI syndromique n'est pas toujours déterminée. Ainsi, le gène *AMELX* peut être retrouvé dans l'AI isolée ou dans le syndrome microphtalmie avec stries linéaires cutanées (MLS).

- **DLX3**

Le gène *DLX3* (OMIM 600525) (DISTAL-LESS HOMEODOMAIN 3), est situé sur le chromosome 17, en position 17q21.33 et composé de 3 exons. Il code pour une protéine à homéoboîte divergente. Avec *Msx2*, *Dlx5* et *Runx2*, *Dlx3* jouent un rôle dans la régulation de l'expression de l'ostéocalcine durant l'embryogenèse chez la souris et notamment lors des stades de minéralisation et de la différenciation ostéoblastique [108].

Une mutation dans ce gène est impliquée des AI hypomatures-hypoplasiques à transmission autosomique dominante, avec un taurodontisme et de larges chambres pulpaires. Ces AI peuvent être associées au syndrome tricho-dento-osseux (TDO) [109].

Le syndrome tricho-dento-osseux (OMIM 190320) est une maladie héréditaire rare, à transmission autosomique dominante. Il se caractérise par : des cheveux bouclés à frisés, une AI hypoplasique, une augmentation de la densité minérale osseuse (DMO) et de l'épaisseur de la corticale des os du crâne [110].

- **FAM20A / FAM20C**

Le gène *FAM20A* (OMIM 611062) (FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 20 MEMBER A, DKFZp434F2322), est localisé sur le chromosome 17, en position 17q24.2 et

composé de 11 exons. Il code pour une protéine kinase intervenant dans la minéralisation de l'émail et la différenciation des cellules hématopoïétiques [111].

Une mutation dans ce gène entraîne une AI associée à une néphrocalcinose dans le cadre du syndrome émail-rein (ERS) (OMIM 204690). Cette maladie se transmet sur le mode autosomique récessif et est caractérisée par une AI hypoplasique, une néphrocalcinose, une hyperplasie gingivale, un retard d'éruption dentaire, des inclusions dentaires, des hyperplasies des sacs folliculaires et des pulpolites [112, 113].

Les mutations recensées dans ce gène sont plus de 40 mutations homozygotes et hétérozygotes. Kantaputra et al ont identifié une nouvelle association de syndrome ERS avec la parodontite chez trois familles ayant des mutations homozygotes et hétérozygotes de *FAM20A* [114].

Les informations concernant ce syndrome sont développées de manière plus approfondies dans le chapitre « Résultats ».

Le gène *FAM20C* (OMIM 611061) (FAMILY WITH SEQUENCE SIMILARITY 20 MEMBER C, DENTIN MATRIX PROTEIN 4, DMP4, DKFZp547D065), est situé sur le chromosome 7, en position 7p22.3 et composé de 10 exons. Il code pour une protéine DMP4 qui intervient dans la régulation de la minéralisation de la dentine, mais également dans la phosphorylation des caséines et de certaines protéines de la biominéralisation [115].

Les mutations de ce gène sont associées au syndrome de Raine (RNS, OMIM 259775). Ce syndrome de dysplasie osseuse ostéosclérotique létale, très rare, à transmission autosomique récessive, est caractérisé par une ostéosclérose généralisée, une ossification périostique, une dysmorphie faciale caractéristique, des anomalies intracérébrales et une létalité dans la période néonatale. Le phénotype bucco-dentaire dans cette maladie se caractérise par une hypertrophie gingivale, des dents néonatales, une fente palatine ou une luvette bifide peuvent être observées. Les angles mandibulaires sont obtus et les corticales hyperostotiques. Initialement, cette pathologie était considérée comme létale durant l'enfance, cependant la survie jusqu'à l'âge adulte est possible [116]. Récemment deux membres d'une famille marocaine a été rapporté avec un syndrome de Raine atténué [117].

- ***TP63***

Le gène *TP63* (OMIM 603273) (TUMOR PROTEIN p63, TUMOR PROTEIN p73-LIKE, TP73L, p53- RELATED PROTEIN p63, p63, KET, EEC3, NBP, OFC8, p51, p53CP, p73H, SHFM4, TP53CP, TP53L, TP73L), est localisé sur le chromosome 3, en position 3q28 et composé de 14 exons. Il code pour un facteur de transcription essentiel dans l'initiation du développement dentaire. Cette protéine est sécrétée par les cellules épithéliales et envoie des signaux aux cellules ecto-mésenchymateuses [118].

Ce gène est impliqué dans le syndrome dysplasie ectodermique avec ectrodactylie et fente palatine ECC (OMIM 129900) associé à une AI hypomature, hypoplasique ou hypominéralisée [119]. Cette maladie se caractérise par une dysplasie ectodermique avec une peau sèche des cheveux clairsemés, effilochés, à croissance lente. Des doigts et orteils peuvent être fusionnés et une fente labio-palatine peut être observée [120].

- ***CNNM4***

Le gène *CNNM4* (OMIM 607805) (CYCLIN M4, ANCIENT CONSERVED DOMAIN PROTEIN 4, ACDP4, KIAA1592), est situé sur le chromosome 2, en position 2q11.2 et composé de 7 exons. Ce gène intervient dans le transport d'ions métalliques qui sont essentiels pour la formation du cristal de l'émail [121].

Une mutation dans ce gène est responsable du syndrome de Dystrophie des cônes et des bâtonnets (OMIM 217080) associé à l'AI aussi appelé le syndrome de Jalili. La transmission de la maladie est autosomique récessive. Cette maladie se traduit par une rétinite pigmentaire, avec une baisse de l'acuité visuelle centrale et périphérique, une altération de la vision des couleurs, une photophobie, et peut aboutir à une cécité nocturne. Le phénotype AI hypoplasique et/ou hypominéralisée est observé avec un émail jaunâtre et rugueux. Par ailleurs un taurodontisme des molaires et des béances antérieures sont souvent observées [122].

A l'heure actuelle, 20 mutations dans *CNNM4* ont été identifiées. Une nouvelle mutation a été identifiée chez une famille marocaine consanguine [123].

- ***ROGDI***

Le gène *ROGDI* (OMIM 614574) (ROGDI DROSOPHILA HOMOLOG OG, FLJ22386), est localisé sur le chromosome 16, en position 16p13.3 et composé de 7 exons. Il code pour une protéine dont la fonction n'est pas encore déterminée. Par ailleurs, il semblerait que *ROGDI* interagisse avec DISC1 (Disrupted In Schizophrenia 1, OMIM 605210), une protéine impliquée dans la stabilité du cytosquelette, la migration neuronale, le transport intracellulaire et la division cellulaire [124-126].

Des mutations dans ce gène sont responsables du syndrome de Kohlschütter-Tönz (KTZS, OMIM 226750). C'est une maladie dégénérative (amélo-cérébro-hypohidrotique) qui associe une AI hypominéralisée-hypomature avec un émail jaunâtre, une épilepsie et une régression mentale. D'autres signes tels que l'hypersudation, une myopie, un taux de sodium et de potassium élevé peuvent aussi être observés et des cas d'hypertrophie ventriculaire, d'hypoplasie du vermis cérébelleux ont été retrouvés [127, 128]. La transmission de cette maladie est autosomique récessive [125, 126].

- ***SLC13A5***

Le gène *SLC13A5* (OMIM 608305) (SODIUM-COUPLED CITRATE TRANSPORTER; NACT) est situé sur le chromosome 17, en position 17p13.1 et composé de 12 exons. Il code pour une protéine appartenant au groupe de protéines 13 de la famille des supports de soluté. Ce membre de la famille du sodium est un co-transporteur de citrate dépendant du sodium qui peut réguler les processus métaboliques [129].

Ce gène est impliqué dans l'encéphalopathie épileptique infantile précoce (OMIM 615905). Schossig et al. ont rapporté des mutations de ce gène chez des patients atteints du syndrome de Kohlschütter-Tönz (KTZS, OMIM 226750). Le mode de transmission est autosomique récessif [130].

- ***LTBP3***

Le gène *LTBP3* (OMIM 602090) (LATENT TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA BINDING PROTEIN 3, LTBP2, FORMERLY), est situé sur le chromosome 11, en position 11q13.1 et composé de 28 exons. Il code pour une protéine de la voie de signalisation TGF-beta, intervenant dans la production et la dégradation des matrices extracellulaires [131].

Une mutation dans ce gène entraîne une brachyolmie (OMIM 601216) associée à une AI hypoplasique (quasi absence d'email) avec un taurodontisme et de larges chambres pulpaire [132, 133].

La brachyolmie est un groupe hétérogène de dysplasies squelettiques avec comme principale caractéristique un retard de croissance staturale disproportionné. Radiographiquement, une platyspondylie généralisée sans modification importante des épiphyses ou métaphyses des os longs est observée. Par ailleurs, certains cas présentent une classe III squelettique, des retards d'éruption et des oligodonties [134-136].

- ***PEX1, PEX6***

Le gène *PEX1* (OMIM 602136) (PEROXIN 1, PEROXISOMAL BIOGENESIS FACTOR 1), est situé sur le chromosome 7, en position 7q21.2 et composé de 24 exons. Il code pour un membre de la famille AAP ATPase, un grand groupe d'ATPases associées à diverses activités cellulaires [137].

Les mutations de ce gène sont associées aux maladies peroxysomales du groupe 1 comme Adréno-leucodystrophie néonatale, Syndrome de Zellweger et Maladie de Refsum forme infantile [137].

Le gène *PEX6* (OMIM 601498) (PEROXIN 6, PEROXISOMAL ASSEMBLY FACTOR 2; PAF2, PEROXISOMAL-TYPE ATPase 1; PXAAA1), est situé sur le chromosome 6, en

position 6p21.1 et composé de 17 exons. Il code pour un membre de la famille des ATPases AAA (ATPases associées à diverses activités cellulaires) [138].

Récemment, des mutations dans le gène *PEX1* et *PEX6* sont associées au syndrome Heimeler (HMLR, OMIM 234580) [139]. Ce syndrome de surdité-hypoplasie de l'émail-anomalie des ongles est caractérisé par une surdité neurosensorielle, une hypoplasie généralisée de l'émail des dents définitives (alors que la dentition primaire est normale) et des anomalies des ongles (lignes de Beau et leuconychie). Le mode de transmission est autosomique récessif [140].

- ***CLDN16, CLDN19***

Le gène *CLDN16* (OMIM 603959) (CLAUDIN 16), est localisé sur le chromosome 3, en position 3q28 et composé de 5 exons. Il code pour une protéine de la famille de la claudine qui est une protéine membranaire intégrale et un composant de brins de jonction serrés [141].

Les mutations de ce gène sont la cause d'hypomagnésémie primaire (OMIM 248250), qui se caractérise par une perte massive de magnésium rénal avec hypomagnésémie et hypercalciurie, entraînant une néphrocalcinose [142].

Le gène *CLDN19* (OMIM 610036) (CLAUDIN 19), est localisé sur le chromosome 1, en position 1p34 et composé de 4 exons. Il code pour la protéine claudine 19 qui joue un rôle majeur dans les jonctions serrées de l'espace intercellulaire. Une mutation dans ce gène entraîne une hypomagnésémie rénale (OMIM 248190) avec atteinte oculaire [143].

Récemment, l'équipe de Bardet et l'équipe de Yamaguti ont rapporté une association de l'AI et hypercalciurie et hypomagnésémie avec néphrocalcinose (FHHNC) (OMIM 248190) chez des patients ayant des mutations dans le gène *CLDN16* et *CLDN19*. La transmission de cette maladie est autosomique récessive [144, 145].

- ***MSX2***

Le gène *MSX2* (OMIM 123101) (MSH, DROSOPHILE, HOMOLOG OF, 2) est localisé sur le chromosome 5 en position 5q35.2 et composé de 2 exons. Il code pour un membre de la famille des gènes homéobox du segment musculaire. La protéine *Msx2* est un répresseur transcriptionnel et joue un rôle dans la croissance cellulaire dans certaines conditions [146]. Elle peut être également une cible pour les voies de signalisation RAS. Les maladies associées à ce gène sont les craniosynostoses type 2 (OMIM 604757) et le foramen pariétal (OMIM 168500). La transmission se fait sur le mode autosomique dominant.

Une mutation de ce gène *MSX2* a été rapportée chez un patient atteint d'une AI hypoplasique et néphrocalcinose [147]. La souris homozygote (-/-) pour une délétion de *Msx2* présente un phénotype ressemblant à l'AI [148].

- ***MSX1***

Le gène *MSX1* (OMIM 142983) (MSH, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 1 HOMEODOMAIN 7; HOX7) est localisé sur le chromosome 4 en position 4p16.2 et composé de 2 exons. Il code pour un membre de la famille des gènes homéobox du segment musculaire. La protéine Msx1 est un répresseur transcriptionnel au cours de l'embryogenèse par des interactions avec des composants du complexe transcriptionnel et d'autres homéoprotéines [149].

Jumlongras et al. ont décrit l'association d'une mutation du gène *Msx1* avec le syndrome de witkop (ou syndrome dents et ongles, OMIM 189500). Ce syndrome se caractérise par une hypoplasie de l'émail, une onycholyse terminale [150] (décollement de l'ongle du lit unguéal à départ disto-latéral) et une hypohidrose. Le mode de transmission est autosomique dominant [151].

- ***TSC1, 2***

Le gène *TSC1* (OMIM 605284) (HAMARTIN) est situé sur le chromosome 9, en position 9q34 et composé de 25 exons. Il code pour une protéine inhibitrice (l'hamartin), en suggérant qu'elle joue un rôle dans la stabilisation de la tubérine [152].

Le gène *TSC2* (OMIM 191092) (TUBERIN TSC4 GENE, FORMERLY; TSC4, FORMERLY) est situé sur le chromosome 16, en position 16p13.3 et composé de 44. Il code pour une protéine qui s'associe à l'hamartin dans un complexe cytosolique, agissant éventuellement comme chaperon pour l'hamartin. Cette protéine est aussi un suppresseur de tumeurs [153].

Le gène *TSC1* et *TSC2* sont impliqués dans la sclérose tubéreuse de type 1 et type 2 (OMIM 191100 et 613254). Des mutations de ces deux gènes ont été rapportées chez des patients ayant une hypoplasie de l'émail avec des puits sur la surface amélaire [154].

Le mode de transmission est autosomique dominant.

- ***PORCN***

Le gène *PORCN* (OMIM 300651) (PORC) est situé sur le chromosome X, en position Xp11.23 et composé de 15 exons. Il code pour une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique qui est impliquée dans le processus des protéines de signalisation Wnt [155].

Des mutations de ce gène ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome de l'hypoplasie dermique focale (FDH) (OMIM 305600) appelé aussi syndrome de Goltz. Ce syndrome est caractérisé par des lésions cutanées et des anomalies pouvant affecter les yeux,

les dents, le squelette, le système nerveux central et les systèmes urinaire, gastro-intestinal et cardiovasculaire [156].

Wright et al. ont décrit des patients atteints de syndrome de FDH ayant une hypoplasie de l'émail [157].

Le mode de transmission est dominant lié à l'X.

- **AIRE**

Le gène *AIRE* (OMIM 607358) (AUTOIMMUNE REGULATOR) est situé sur le chromosome 21, en position 21q22.3 et composé de 14 exons. Il code pour un facteur de transcription qui forme des corps nucléaires et interagit avec la protéine de liaison CREB (coactivateur transcriptionnel) [158].

Des mutations de ce gène provoquent une maladie auto-immune appelée polyendocrinopathie auto-immune de type 1 ou syndrome APECED. Ce syndrome est caractérisé par une candidose buccale et unguéale, une hypoparathyroïdie, une insuffisance surrénale et une hypoplasie amélaire [159].

Le mode de transmission est autosomique récessif.

- **ORAI1**

Le gène *ORAI1* (OMIM 610277) (CALCIUM RELEASE-ACTIVATED CALCIUM MODULATOR 1; CRACM1 TRANSMEMBRANE PROTEIN 142A; TMEM142A) est situé sur le chromosome 12, en position 12q24.31 et composé de 2 exons. Il code pour une sous unité de canal calcique membranaire qui est activée par le capteur de calcium STIM1 au moment d'épuisement des réserves en Ca<sup>2+</sup> [160, 161]. L'expression de protéine *ORAI1* a été prouvée au stade sécrétoire améloblaste au cours de l'amélogenèse [162].

Des mutations homozygotes et hétérozygotes de ce gène sont impliquées dans le syndrome de déficit immunitaire (OMIM 612782) associé à une myopathie congénitale, une dysplasie ectodermique anhidrotique (EDA) (OMIM 224900) et une AI hypominéralisée [161].

- **GALNS**

Le gène *GALNS* (OMIM 612222) (N-ACETYL GALACTOSAMINE-SULFATE SULFATASE) est situé sur le chromosome 16, en position 16q24.3 et composé de 16 exons. Il code pour une N-acétylgalactosamine-6-sulfatase qui est une exohydrolase lysosomale nécessaire pour la dégradation des glycosaminoglycanes, du sulfate de kératane et du 6-sulfate de chondroïtine [163].

Des mutations dans ce gène sont responsables du syndrome de mucopolysaccharidose (MPS) de type IVA (OMIM 253000) appelé aussi syndrome de Morquio. Ce syndrome est caractérisé

par une dysplasie spondylo-épiphyso-métaphysaire, une hyperlaxité ligamentaire, une hypoplasie de l'odontoïde et une AI hypoplasique [164].

Prasad et al. ont identifié une mutation pathogène et une autre mutation potentiellement pathogène dans le gène *GALNS* chez deux patients ayant une AI hypoplasique avec un émail mince et strié dans le contexte de suspicion du syndrome MPS [2].

## II-5. Evolution de la classification des AI

La classification des AI a connu une évolution avec le temps. D'abord une classification basée seulement sur le phénotype clinique a été établie par Weinman et al. (1945). Ensuite, Witkop (1988) a proposé une classification exhaustive selon le phénotype clinique et le mode de transmission.

En 1995, Aldred et Crawford ont établi une classification basée sur le phénotype dentaire, le mode de transmission, les gènes identifiés et les résultats biochimiques trouvés.

En 2003, Aldred et al. ont proposé une version modifiée de cette classification en se basant sur la classification de Witkop. Cette classification est basée sur le mode de transmission, les bases moléculaires, les résultats biochimiques et le phénotype clinique [50].

La classification d'Aldred peut être se développer en parallèle avec l'identification de nouvelles mutations associées à des AI.

Dans le mesure où la classification clinique ne répond pas à la diversité clinique des formes des AI et les connaissances en biologie moléculaire sont parfois limitées. L'établissement d'une classification exhaustive serait nécessaire pour comprendre la corrélation phénotype/génotype.

Les tableaux ci-dessous récapitulent les informations précédentes concernant les gènes connus et les amélogenèse imparfaites. Les gènes connus, le locus, le nombre d'exons, le mode de transmission, la protéine codée et les phénotypes cliniques associés sont répertoriés (**Table 5, 6, 7 et 8**).



AI isolée	Gènes impliqués dans des AI isolées de type hypoplasique											
	<i>AMELX</i> (300391)	<i>AMELY</i> (410000)	<i>ARHGAP6</i> (300118)	<i>ENAM</i> (606585)	<i>AMBN</i> (601259)	<i>LAMB3</i> (150310)	<i>LAMA3</i> (600805)	<i>LAMC2</i> (150292)	<i>COL7A1</i> (120120)	<i>COL17A1</i> (113811)	<i>ACPT</i> (606362)	<i>ITGB4</i> (147557)
Locus et nombre d'exons	Xp22.2 inclus dans ARHGAP6 7 exons	Yp11.2	Xp22.2 17 exons	4q13.3 9 exons	4q13.3 13 exons	1q32.2 22 exons	18q11.2 75 exons	1q25.3 23 exons	3q21.31 118 exons	10q24.3-q25.1 56 exons	19q13.33 11 exons	17q25.1 43 exons
Mode transmission	lié à l'X		Lié à l'X	AD AR	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AR	AR
Protéine codée	Amélogénine			Enaméline	Améloblastine	Protéine de l'émail	Protéine de l'émail	Protéine de l'émail	Protéine de l'émail	Protéine de l'émail	phosphatase acide testiculaire	Intégrine
Signes cliniques	Hypoplasique ou hypomature Stries verticales		Hypoplasique ou hypomature Stries verticales	Hypoplasique dents lisses, puits béance antérieure	Hypoplasique	Hypoplasique Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (forme AR)	Gène impliqué dans l'épidermolyse bulleuse avec atrésie du pylore (forme AR)	Hypoplasique

**Tableau 5 :** Tableau récapitulatif des gènes impliqués dans les AI isolées de type hypoplasique (AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif)

AI isolée	Gènes impliqués dans des AI isolées de type hypominéralisé			
	<i>FAM83H</i> (611927)	<i>C4orf26</i> (614829)	<i>SLC24A4</i> (609840)	<i>ITGB6</i> (147558)
Locus et nombre d'exons	8q24.3 5 exons	4q21.1 3 exons	14q32.12 17 exons	2q24.2 15 exons
Mode transmission	AD	AR	AR	AR
Protéine codée	Protéine intracellulaire Intervenant dans la différenciation des améloblastes	Acide phosphoprotéique de la matrice extracellulaire	Echangeur d'ions (transporteur d'ions calcium/sodium /potassium dépendant)	Intégrine des Cellules épithéliales
Signes cliniques	Hypominéralisée Classe III Béance antérieure	Hypominéralisée	Hypominéralisée	Hypominéralisée pigmentée ou Hypoplasique

**Tableau 6** : Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI isolées de type hypominéralisé (AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif).

AI isolée	Gènes impliqués dans des AI isolées de type hypomature					
	<i>MMP20</i> (604629)	<i>KLK4</i> (603767)	<i>WDR72</i> (613214)	<i>STIM1</i> (605921)	<i>TUFT1</i> (600087)	<i>GPR68</i> (601404)
Locus et nombre d'exons	11q22.2 10 exons	19q13.41 5 exons	15q21.3 20 exons	11p15.4 12 exons	1q21.3 13 exons	14q32.11 10 exons
Mode transmission	AR	AR	AR	AR	AD	AR
Protéine codée	Métalloprotéase	Sérine protéase	Protéine cytoplasmique intervenant dans la minéralisation de l'émail	Capteur de calcium	Acido-protéine de la matrice amélaire	récepteur couplé à protéine G
Signes cliniques	Hypomature	Hypomature pigmentée	Hypomature	Gène impliqué dans : - le déficit immunitaire combiné par déficit en STIM1 - la myopathie avec agrégats tubulaires (TAM1) - le syndrome de StormorkenSjaastad-Langslet		Hypomature

**Tableau 7** : Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI isolées de type hypomature (AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif)

AI syndromique	Gènes impliqués dans des AI syndromiques										
	<i>DLX3</i> (60055)	<i>FAM20A</i> (611062)	<i>FAM20C</i> (611061)	<i>TP63</i> (603273)	<i>CNNM4</i> (607805)	<i>ROGDI</i> (614574)	<i>SLC13A5</i> (608305)	<i>LTBP3</i> (602090)	<i>MSX2</i> (123101)	<i>MSX1</i> (142983)	<i>PORCN</i> (300651)
Locus et nombre d'exons	17q21.3 3 exons	17q24. 11 exons	7p22.3 10 exons	3q28 14 exons	2q11.2 7 exons	16p13.3 11 exons	17p13.1 12 exons	11q13.1 28 exons	5q35.2 2 exons	4p16.2 2 exons	Xp11.23 15 exons
Mode transmission	AD	AR	AR	AD	AR	AR	AR	AR	AD	AD	lié à l'X
Protéine codée	Facteur de Transcription	Glycoprotéine sécrétée	Protéine de la matrice dentinaire	Facteur de transcription	Transporteur de métaux	Fonction inconnue, mais interaction avec MAP Kinase et DISC1	co-transporteur de citrate dépendant du sodium	Production et dégradation de la matrice extracellulaire, interaction avec la fibrillin1	répresseur transcriptionnel	répresseur transcriptionnel	protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique
Signes cliniques	Hypoplasique Hypomature Taurodontisme Anomalies cheveux et os	Hypoplasique Hyperplasie gingivale Néphrocalcinose	Syndrome de Raine	Syndrome EEC (dysplasie ectodermique avec ectrodactylie et fente palatine)	syndrome de Jalili (Dystrophie cônes et bâtonnets)	Hypominéralisée-Hypomature Syndrome de Kohlschütter-Tönz	encéphalopathie épileptique infantile précoce et Syndrome de Kohlschütter-Tönz	Brachyolmie	AI hypoplasique et néphrocalcinose	syndrome de witkhop	syndrome de Goltz

**Tableau 8 :** Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI syndromiques (AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif)

AI syndromique	Gènes impliqués dans des AI syndromiques				
	<i>PEX1</i> (602136) <i>PEX6</i> (601498)	<i>CLDN16</i> (603959) <i>CLDN19</i> (610036)	<i>GALNS</i> (612222)	<i>ORAI1</i> (610277)	<i>AIRE</i> (607358)
Locus et nombre d'exons	7q21.2 (24 exons) 6p21.1 (17 exons)	1p34 (5 exons) 3q28 (4 exons)	16q24.3 16 exons	12q24.31 2 exons	21q22.3 14 exons
Mode transmission	AR	AR	AR	AR	AR
Protéine codée	membre de la famille AAP ATPase	Claudine 16 Claudine 19	N-acétylgalactosamine- 6-sulfatase	sous unité de canal calcique membranaire	facteur de transcription
Signes cliniques	Syndrome d'Heimeler	Hypoplasique Hypominéralisée Hypercalciurie Hypomagnésémie néphrocalcinose	mucopolysaccharidose (MPS) de type IVA	dysplasie ectodermique anhidrotique	polyendocrinopathie auto-immune de type 1 ou syndrome APECED

**Tableau 8** : Tableau récapitulatif des gènes connus impliqués dans les AI syndromiques (AD : autosomique dominant ; AR : autosomique récessif)  
(suite)

## **Chapitre 3 : Approches expérimentales**

### **I. Projet de recherche**

Notre projet de recherche a été sélectionné pour une coopération FRANCO-MAROCAINE en recherche médicale entre CNRST (centre national pour la recherche scientifique et technique Maroc) et INSERM (institut national de la santé et de la recherche médicale pour deux ans (2015 et 2016)). Cet accord a financé des billets de voyage et de séjours pour le déplacement des chercheurs marocains et français. Notre projet s'est déroulé en 3 trois études :

L'étude clinique est menée dans le centre hospitalier universitaire Rabat : Centre de Consultation et Traitement, Service odontologie Pédiatrique est visée à préciser les signes cliniques des patients atteints de l'amélogenèse imparfaite, et de déterminer les informations familiales et génétiques (les antécédents médicaux) à l'aide d'un questionnaire élaboré par l'équipe de projet de recherche « Maladies bucco-dentaires et anomalies génétiques ».

Cette étude clinique a obtenu les autorisations légales du comité d'éthique pour la recherche biomédicale de Rabat sous le numéro:21/16. Une information éclairée et de formulaires sont fournis afin d'assurer le respect de vie privée et les droits du patient.

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

L'étude génétique et moléculaire est menée dans le Centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies rares (Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg) et le Laboratoire de Génétique Médicale UMR\_S 1112, unité INSERM 1112 (Faculté de Médecine de Strasbourg, Pr. Dollfus). Cette étude est reposée sur une recherche translationnelle. Elle est centrée sur l'étude de familles, en commençant par le phénotype clinique, après un protocole de recherche est mis en place au laboratoire pour élucider le génotype. Ce protocole a permis d'identifier de nouvelles mutations dans des gènes connus ou de nouveaux gènes.

La 3ème étude est consistée de valider par les techniques d'hybridation in situ chez la souris au cours de l'odontogenèse, le patron d'expression des nouveaux gènes candidats qui peuvent être impliqués dans des syndromes chez l'homme affectant le développement dentaire mais sous lesquels l'expression ou le mode d'action ne sont pas encore déterminés. Cette étude est menée au sein de l'équipe de Dr. Pascal DOLLE et Pr. Agnès BLOCH-ZUPAN dans l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Illkirch Strasbourg France).

### I-1 Registre D[4]/Phenodent

Les familles ont accepté de participer au projet, ont signé les consentements éclairés pour ce projet et pour leur intégration au registre D[4]/Phenodent.

Le registre D[4]/Phenodent ([www.phenodent.org](http://www.phenodent.org)) est un registre français de patients atteints des maladies rares odontologiques. D[4]/Phenodent est une base de données, interfacée à un site web dynamique Phenodent qui permet la collecte et l'analyse de données phénotypiques bucco-dentaires humaines dans le but de [165]:

- Collecter des données phénotypiques précises et standardisées dans le cadre de consultations cliniques spécialisées en odontogénétique (formulaire d'enregistrement des données phénotypiques, examens complémentaires radiographiques, clichés photographiques numérisés). Ces informations peuvent être complétées par une analyse histopathologique des tissus dentaires et des prélèvements biologiques éventuels.
- Obtenir des données épidémiologiques sur la fréquence de ces pathologies
- Stimuler le recrutement de ces patients et de faciliter le diagnostic et la compréhension de ces affections rares.
- Promouvoir des projets de recherche dans ce domaine d'investigation, et d'installer la base d'une analyse moléculaire et histopathologique.

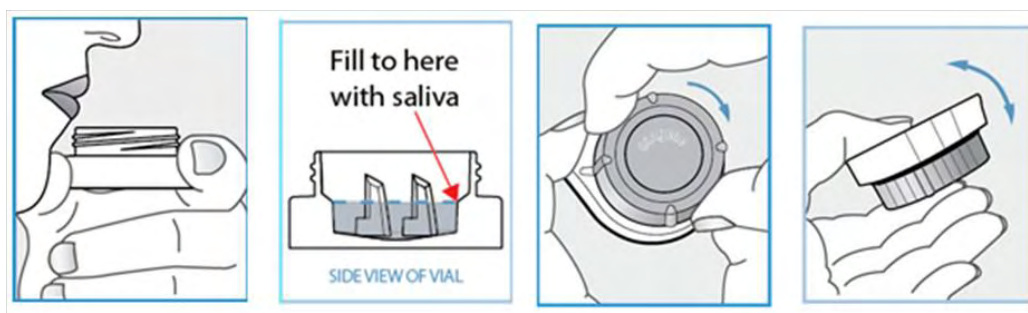
Les données personnelles et cliniques des patients et de leur famille ont été enregistrées sur D[4]/Phenodent.

### I-2. Prélèvements salivaires

Les échantillons salivaires ont été prélevés à l'aide du kit Oragene®•DNA (OG-250) (2 mLsample volume). Il s'agit d'un kit permettant de collecter la salive de manière non invasive, de la stabiliser et de la transporter afin d'en extraire l'ADN [165].

Les prélèvements de la salive ont été faits selon le protocole suivant (**figure 19**):

- Déposer la salive dans le collecteur,
- Remplir jusqu'au niveau indiqué (sans bulles),
- Poser le flacon sur une surface plane et fermer le bouchon de manière étanche,
- Agiter pendant 10 secondes.



**Figure 19** : Protocole de prélèvement salivaire (kit Oragene®•DNA) [166]

Après anonymisation, les échantillons des patients et de leur famille ont été envoyés au laboratoire de Génétique Médicale UMR\_S 1112, unité INSERM 1112 (Faculté de Médecine de Strasbourg, Pr. Dollfus)

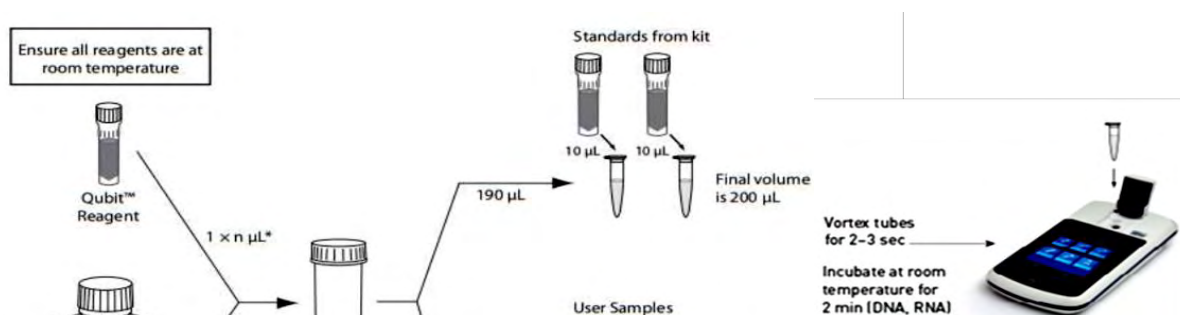
### I-3. Extraction d'ADN

Nous avons extrait l'ADN salivaire des patients et de leurs famille selon le protocole prepIT®•L2P du kit Oragene-DNA [167] :

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

### I-4. Quantification de l'ADN

La quantification de l'ADN a été faite par mesure de la densité optique à l'aide d'un fluorimètre (Qubit™). Il a permis de quantifier l'ADN, l'ARN ou les protéines (**Figure 20**)





**Figure 20** : Protocole de quantification (Qubit™).

## **II. Séquençage Sanger**

A partir d'un phénotype clinique, des gènes connus sont proposés comme gènes candidats et peuvent être validés par la technique de séquençage Sanger pour la recherche des mutations.

Les familles, pour qui la recherche de mutations dans les gènes connus serait invalide, feront l'objet d'études moléculaires visant à localiser et identifier de nouveaux gènes responsables par d'autres méthodes comme le séquençage haut débit ciblé ou encore l'analyse par exome.

### **II-1. Séquence de référence**

Pour un gène donné, les séquences de référence (ADN génomique gDNA, ADN complémentaire cDNA du transcrit codant) peuvent être téléchargées sur le site Ensembl ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene)).

### **II-2. Choix des amorces**

A partir des séquences de références, des oligonucléotides amorces (Forward : F et Reverse : R) sont déterminés grâce à des logiciels de design comme Primer 3. L'unicité des amorces est vérifiée dans In-Silico PCR (UCSC-Genome Browser), puis les oligonucléotides sont créés par la société Sigma® [165].

### **II-3. PCR (Polymérase Chain Reaction) et mise au point**

Une série de mises au point a été faite pour le gène *FAM20A* pour déterminer les conditions optimales d'amplification de chacun des exons. Les PCR sont réalisées à l'aide d'ADN génomique témoin et selon un programme avec gradient de température (Eppendorf Master cycler) afin de déterminer la Température moyenne ( $T_m$ ) [165].

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

- 12µl de Mix (=1X concentré final, qui comprend le tampon (Sigma®), les dNTPs (Euromedex®), qui sont les quatre désoxyribonucléotides constitutifs de l'ADN, dATP, dCTP, d GTP, dTTP à la concentration de 200µM chacun et du MgCl<sub>2</sub> 1,5mM final (Sigma®))
- 1 unité de Taq Polymérase (Sigma®)
- 10pmol d'amorce sens, 10pmol d'amorce antisens (Sigma®)
- 1µl d'ADN à 50ng/µl
- complétés avec de l'eau stérile pour un volume total de 60µl.

#### **II-4. Amplification**

Les amplifications sont réalisées dans un appareil pour PCR Mastercycler® egradient S (Eppendorf®) où s'enchainent les étapes suivantes :

- Dénaturation à 94°C pendant 3 min
- 35 cycles d'amplification comprenant : une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation des amorces à leur température moyenne T<sub>m</sub> pendant 30 s, une élongation
- à 72°C pendant 30 s (40 s pour les fragments de plus de 700 pb)
- Extension finale à 72°C pendant 10 min.

#### **II-5. Electrophorèse sur gel d'agarose**

L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 1.5% préparé à partir d'un mélange de poudre d'Agarose (3,75g) et de Tampon (250mL d'une solution d'électrolytes, pH=8, Tris Borate 40mM + EDTA 1mM (TBE) : dH<sub>2</sub>O (1 :10)).

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

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

L'électrophorèse est effectuée à 150V pendant 30min.

Les fragments d'acide nucléique sont révélés à l'aide de bromure d'éthidium (BET) sous UV [165].

#### **II-6. Purification, mise en suspension**

Après la vérification de l'amplification, les produits de PCR sont purifiés grâce au système MultiScreenHTS PCR 96-Well Plate (Millipore®), qui permet de séparer le produit PCR des produits utilisés lors de la réaction de PCR aspirés à travers une membrane. Les produits de PCR sont remis en suspension dans 50µl d'eau stérile puis adressés avec un aliquot des amorces sens et antisens (à 10 pmol/µl) à la société GATC Biotech basée en Allemagne qui réalise le séquençage [165].

#### **II-7. Lecture des résultats**

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

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

Le logiciel SeqScape v2.6 a permis de comparer par alignements multiples les séquences des patients par rapport à la séquence de référence et les séquences des patients atteints et non atteints entre eux. Cette lecture est effectuée par deux opérateurs indépendants, en double aveugle pour éliminer les défauts d'interprétation, et le séquençage est réalisé de manière bidirectionnelle (Amorce R et Amorce F) [165].

#### **II-8. Validation et ségrégation familiale**

Les variations trouvées sont vérifiées dans des populations de référence issues du site NCBI et des bases de données (Ensembl, dbSNP, 1000 genomes, EVS) pour savoir s'il s'agit des variations de mutation ou de polymorphisme (variant non pathogène). Si le polymorphisme n'est pas retrouvé dans la population de référence, il est interprété comme une mutation. Puis la ségrégation familiale va préciser la présence de cette mutation et sa distribution au sein de la famille.

### **III. Séquençage à haut débit : Séquençage nouvelle génération (NGS)**

La méthode automatisée de séquençage Sanger est considérée comme une technologie de « 1<sup>ère</sup> génération ». Cette technique est actuellement dépassée par la nouvelle génération de séquenceurs permettant de séquençage à très grande échelle et de manière beaucoup plus rapide avec un coût à la base beaucoup plus faible.

Les principales technologies de séquençage à haut débit actuellement disponibles sont celles proposées par Roche 454 Life Sciences, Illumina et Ion Torrent. Elles utilisent la détection de signaux chimiques ou Lumineux lors de l'incorporation de bases nucléotidiques pendant la synthèse du brin complémentaire pour déterminer la séquence. De manière générale, l'ADN est fragmenté à la taille souhaitée pour son étude, chaque fragment est ensuite lié à des adaptateurs et cloné pour amplifier le signal de fluorescence ou chimique [168].

### III-1. Les étapes communes du séquençage haut débit

Plusieurs étapes sont communes à l'ensemble des techniques de séquençage à haut débit de l'ADN. Il est important de souligner que le séquençage haut débit ne peut s'effectuer qu'à partir de molécules d'ADN. Ainsi, les molécules d'ARN vont devoir subir une étape de transcription inverse en vue d'une conversion en ADN complémentaire (ADNc).

- **Fragmentation enzymatique de l'ADN**
- **Préparation d'une banque d'ADN** par ligation d'adaptateurs. Ceci permet une amplification par PCR.
- **Amplification clonale** : Elle peut être réalisée soit par une émulsion huile/eau suivie de la création de microréacteurs et d'une ePCR (émulsion PCR) ou par une amplification sur phase solide suivie d'une bridge PCR.
- **Séquençage** : La dernière étape est le séquençage des fragments d'ADN. Ce séquençage va différer selon la technique utilisée. L'émission de signaux luminescents ou fluorescents selon la technique utilisée, va permettre d'identifier les bases constituant la séquence d'ADN étudiée. Ces signaux vont être analysés, puis convertis en une séquence de bases.
- **Analyse bioinformatique** : Les reads ont été alignés sur le génome de référence du GRCh37 en utilisant Burrow–Wheeler aligner (v0.7.5a) et la détection des variations de séquences (variant calling) a été effectuée avec la GATK Toolkit v3.1. Les variantes ont été annotées en utilisant snpEffv.3.4.

Les résultats sont rendus par échantillon, sous forme de fichiers textes tabulés.

### III-2. Séquençage à haut débit ciblé

Une collaboration entre le Laboratoire de Génétique Médicale UMR\_S 1112, unité INSERM 1112 (Faculté de Médecine de Strasbourg, Pr. Dollfus) et l'IGBMC (Illkirch Strasbourg France) a permis de développer un outil diagnostique de séquençage haut débit pour diagnostiquer les maladies bucco-dentaires. Cet outil permet de mettre en évidence des variations de séquence

(mutation ou polymorphisme) de l'ADN du patient pour les gènes répertoriés sur ce panel NGS [2].

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

Dans le cadre du Projet INTERREG Offensive Science N° A 27 « Manifestations bucco-dentaires des maladies rares » plusieurs séries d'ADN de patients ont été analysées. Certains patients marocains ont participé à ce projet.

Les informations concernant ce panel NGS sont développées de manière plus approfondies dans le chapitre « Résultats ».

#### **IV. Validation d'un nouveau gène chez la souris**

Après la découverte d'une mutation dans un nouveau gène qui peut être impliqué dans des anomalies dentaires, un protocole de validation de ce gène en utilisant des modèles de souris est mis en place au laboratoire. Cette étape s'est déroulée à l'institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire (IGBMC) Strasbourg France au sein de l'équipe de Dr. Pascal DOLLE et Pr. Agnès BLOCH6-ZUPAN pour préciser le patron d'expression de ce nouveau gène. Les résultats de cette étude ne sont pas encore publiés. La raison pour laquelle, en gardant le nom de ce gène anonyme et nous l'appellerons gène X

##### **IV-1. Production d'embryons**

Les souris blanches types CD1 sont utilisées pour ces expériences. Le jour de détection du « bouchon vaginal » (sperme coagulé) est considéré comme le jour E0.5 de la gestation.

##### **IV-2- Recueil des embryons**

Les femelles gestantes sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les embryons vivants sont prélevés et récupérés dans une solution de PBS (phosphatebuffered saline). Les embryons sont prélevés à différents stades de leur développement : E12 .5, E14.5, E16.5 et E18.5 [169].

### IV-3. Préparation des tissus

Les têtes des embryons E14.5, E16.5, E18.5 et PN6 sont inclus directement dans l'OCT 4583 (Tissue-TEK, SaKura) et stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Pour les embryons E12.5 sont fixés toute la nuit dans le paraformaldéhyde (4% (w/v) pH 7,5) dans du PBS 1X puis dans le sucrose 20% (w/v) et du PBS 1X toute une nuit également.

Les têtes des embryons sont coupées au cryostat à -20°C (Modèle Leica® CM3050S) à une épaisseur de 10µm.

Les têtes E12.5 et E14.5 sont coupées en frontal sur 5 séries (5 sondes), celles de E16.5, E19.5 et PN6 sur 7 séries en sagittal.

Les coupes sont récoltées sur des lames Superfrost plus. Les lames sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à leur utilisation [169].

### IV-4. Synthèse des sondes

Toutes les sondes utilisées sont synthétisées à partir d'un produit PCR du programme EURExpress ([www.eurexpress.org](http://www.eurexpress.org)). La séquence de ce produit correspond à celle du gène *X* flanquée des séquences de promoteurs T3 et T7.

Les ribosondes antisens marquées par la digoxygénine (DIG) ont été transcrits in vitro par incubation pendant 2h à 37°C, en utilisant 1 µg de produit PCR du gène *X* et 20U de polymérase T7, tampon de transcription (Transcription Buffer 5X (Promega), DIG RNA Labelling Mix 10X (Roche), DTT 0,5M, RNAsin 20U). La réaction a lieu dans un volume final de 20µl [169].

Pour synthétiser la sonde antisens, 1 µg de produit PCR du gène *X* et 20U de polymérase T7 sont incubés 2h à 37°C dans du tampon de transcription (Transcription Buffer 5X (Promega), DIG RNA Labelling Mix 10X (Roche), DTT 0,5M, RNAsin 20U). Le volume final de la réaction est 20µl. Le DIG RNA Labelling contient les quatre nucléotides ainsi que des UTP marqués à la digoxygénine afin de permettre la synthèse d'une ribosonde marquée.

Ensuite, la réaction de synthèse est arrêtée par ajout de 2µl d'EDTA 0,2M à pH 8. L'ARN est précipité par ajout d'un 1 µl de tRNA à 10mg/ml, 2,5µl de Chlorure de Lithium 4M, 75µl d'éthanol 100%. Le mélange est incubé à -80°C pendant 15min et centrifugé à 12000 rpm à 4°C pendant 30 minutes.

Le culot est repris dans 22µl d'eau, puis, l'ARN est à nouveau précipité par ajout de 2,5µl de Chlorure de Lithium 4M et 75µl d'éthanol 100%, suivi d'une incubation de 30 minutes à -80°C et d'une centrifugation à 12000 rpm à 4°C pendant 30 minutes.

Le culot est lavé dans 0,5ml d'éthanol 70% par une centrifugation de 15 minutes à 12000 rpm à 4°C. Le surnageant est ensuite retiré puis le culot est laissé à sécher à l'air libre. La sonde est reprise dans 20µl d'eau stérile et la concentration est vérifiée.

Le contrôle qualitatif de la sonde s'est effectué par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. 1µl de la sonde est dilué dans 4µl d'H<sub>2</sub>O-DEPC et est laissé sur glace 3min. L'échantillon est déposé sur le gel après ajout d'1µl de tampon de charge. L'électrophorèse est lancée à 120V pendant 45 min. La sonde est jugée de bonne qualité si on n'observe aucun « smear » et que la bande a la masse moléculaire escomptée.

La quantité d'ARN récupérée est évaluée par spectrophotométrie. Le volume est alors ajusté à 150 ng/µl. La sonde est ensuite diluée dans 100 à 200µl de tampon d'hybridation en fonction de la quantité de transcrits et stockée à -20°C jusqu'à utilisation [169].

#### **IV-5. Hybridation in situ**

- Post-fixation et perméabilisation

Les lames sont sorties de leur stockage à -80°C et laissées à température ambiante pendant 2 heures. Ensuite, elles sont post-fixées sur glace en formaldéhyde à 4% (PBS 1x) pendant 10 minutes. La fixation est arrêtée dans du PBS puis les lames sont perméabilisées dans une solution de protéinase K à 0,6µg/ml pendant 2 fois 10 minutes puis rincées dans du PBS. Les lames sont ensuite acétylées pendant 2 minutes (Triethanolamine 1,3%, HCl 0,06%, Anhydride acétique 0,18%), puis rincées dans du PBS [169].

- Hybridation et lavages post-hybridation

Le tampon d'hybridation est composé de 50% de formamide desionisée, 10% de sulfate dextran, tRNA 1mg/ml, solution de Denhardt 1X et Salt 1X (NaCl 0,195M, Tris 0,005M pH 7,2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·1H<sub>2</sub>O 1,13M, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,4M, EDTA 0,005M pH8).

La sonde est mélangée au tampon d'hybridation à une concentration comprise entre 0.1 et 1µg/ml. Ce mélange est ensuite mis à dénaturer 10 minutes à 70°C. 120 µl sont déposés sur chaque lame qui est ensuite recouverte d'une lamelle puis mises à 65°C dans un bain marie toute la nuit pour permettre l'hybridation. Les lames sont ensuite lavées deux fois pendant 30 min à 65°C dans du 1X SSC, 50% formamide, 0,1% tween-20. Ces lavages sont suivis de deux bains de 30 min à température ambiante dans du tampon MABT (MAB 1X, 0,1% Tween-20) [169].

- Détection de la sonde

La détection de la sonde hybridée est précédée par un blocage des sites aspécifiques pendant 1h à température ambiante dans une solution de blocage (20% de sérum de chèvre normal et 2% de Blocking Reagent (Roche) dans du MABT). 200 µl d'anticorps primaire anti-DIG (Roche) dilués au 1 : 2500e dans la solution de blocage sont déposés sur chaque lame. Les lames sont ensuite recouvertes de parafilm et mises pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont lavées cinq fois 20 min dans du tampon MABT puis rincées deux fois 10 min dans du tampon NTMT (100mM NaCl, Tris pH9,5 100mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 50mM, Tween-20 0,1%). 200 µl de solution de coloration (3,5µl/ml NBT (Roche), 3,5µl/ml BCIP (Roche) dans du NTMT 1X) fraîchement préparée sont déposés sur chaque lame, elles sont ensuite recouvertes d'un parafilm puis révélées toute une nuit à température ambiante à l'abri de la lumière. Le milieu de coloration est renouvelé chaque jour, si besoin. Après obtention d'une coloration optimale, les lames sont rincées deux fois 10 minutes dans du NTMT 1X. La coloration est arrêtée par un court rinçage dans du PBS puis dans de l'eau. Les lames sont ensuite laissées à sécher toute une nuit, puis montées avec du DPX [169].

## Résultats-Publications



Nous avons utilisé une approche de médecine translationnelle combinant la biologie moléculaire, la biologie de développement ; la bioinformatique, l'étude de modèle murins et de l'analyse des phénotypes cliniques chez les patients concernés.

Grâce à ce protocole, nous avons identifié différentes mutations et gènes responsables des amélogenèses imparfaites.

Les résultats sont présentés sous la forme d'articles publiés dans les revues scientifiques. Ils sont classés par ordre d'année de publication.

Le premier article (2015) décrit un cas clinique présentant une association rare entre l'amélogenèse imparfaite, platyspondylie et la bicytopenie.

Le deuxième article (2016) consiste en un travail collaboratif ayant pour but de développer un panel diagnostique des maladies génétiques dentaires. A travers une étude de cohorte de 101 patients séquencés par la technique de séquençage nouvelle génération (NGS). Cette étude a montré la nécessité de l'intégration des techniques NGS dans le diagnostic clinique/génétique des anomalies dentaires.

Le troisième article (2016) illustre la validation d'une mutation découverte par la technique NGS par une ségrégation familiale d'une famille marocaine consanguine en technique séquençage Sanger.

Le quatrième article (2016) présente un cas clinique ayant un tableau clinique complexe qui montre la rareté et la diversité des associations des AI avec d'autres anomalies comme l'asthme et les anomalies congénitales du cœur.

Enfin, la dernière étude révèle le patron d'expression du gène *X* au cours de l'odontogenèse et l'organogenèse chez la souris. Elle précise ainsi les connaissances autour des gènes impliqués dans les maladies rares ayant des répercussions dans la cavité buccale.

## **I- A rare association - amelogenesis imperfecta, platyspondyly and bicytopenia: a case report [1]**

### **Résumé**

Cet article décrit un patient de 5 ans issu d'une famille consanguine présentant un phénotype AI hypoplasique, un retard staturo-pondéral, un retard psycho-moteur, des troubles de comportement et de crises d'épilepsie.

Un bilan biologique a révélé une bicytopenie (une anémie normocytaire-normochrome avec thrombocytopenie).

L'examen radiographique de la colonne vertébrale a montré une déviation de la colonne vertébrale dans le plan frontal sous forme scoliose thoraco-lombaire avec une légère platyspondylie.

Notre observation a montré une association de signes cliniques inhabituelles tel que : la bicytopenie, AI hypoplasique et la platyspondylie ce que nous a laissé penser à un syndrome génétique polymalformatif. D'après la littérature, le gène *LTBP3* est le gène impliqué dans le syndrome brachyolmie et AI.

L'étude moléculaire n'a pas été réalisée. Le père de l'enfant a refusé de continuer les investigations pour des raisons personnelles (absence de la motivation et les problèmes de la distance pour l'obtention des prélèvements salivaires) [50, 127, 133, 134, 170-176].

CASE REPORT

Open Access

# A rare association - amelogenesis imperfecta, platyspondyly and bicytopenia: a case report



Samir Laouina<sup>1,2\*</sup>, Siham Chafai El Alaoui<sup>4</sup>, Rachida Amezian<sup>2</sup>, Abderrahmane Al Bouzidi<sup>1,3</sup>, Abdelaziz. Sefiani<sup>4</sup> and Mustapha El Alloussi<sup>2</sup>

## Abstract

**Introduction:** Amelogenesis imperfecta is an inherited disease characterized by generalized structural abnormalities of the enamel on all teeth, including both primary and permanent dentition. To the best of our knowledge, this is the first case report of a rare association of amelogenesis imperfecta, platyspondyly, and bicytopenia.

**Case presentation:** A 5-year-old Moroccan boy was examined in the Centre for Dental Consultation and Treatment, Faculty of Dentistry, Rabat. He was a child of consanguineous parents (first degree). The child failed to thrive (-4 standard deviation score) and displayed delayed overall development. A dental examination revealed a hypoplastic amelogenesis imperfecta with a bacterial biofilm deposit on tooth surfaces. A complete blood count revealed bicytopenia (normocytic-normochromic anemia with thrombocytopenia). A radiographic examination of the spinal column showed a deviation of the spine in the frontal plane in the form of thoracolumbar scoliosis. The interpedicular distance was not expanded; but a mild platyspondyly exists, especially pronounced in T11 and T12.

**Conclusions:** No other family members presented amelogenesis imperfecta, bicytopenia, or platyspondyly. The consanguineous marriage suggested an autosomal recessive mode of inheritance. Further studies are necessary to clarify the genetic defect producing this syndrome, and the symptomatic associations of amelogenesis imperfecta, platyspondyly and bicytopenia.

**Keywords:** Amelogenesis imperfecta, Bicytopenia, Platyspondyly

## Introduction

Amelogenesis imperfecta (AI) is a genetically and phenotypically heterogeneous group of inherited disorders that affects the quality and quantity of primary and/or permanent enamel, which may be associated with other morphologic or biochemical changes elsewhere in the body [1]. The population incidence varies from 1:700 to 1:16,000, depending on the diagnostic criteria used and the populations studied [2]. Dental problems, which vary depending on the severity of the condition, include sensitive teeth and poor tooth appearance, due to tooth loss and staining [3].

AI has been categorized into four broad groups based primarily on phenotype: hypoplastic, hypocalcified, hypomaturational, and hypomaturational-hypoplastic. At least 14 subtypes of AI also exist, when phenotype and mode of inheritance are considered [3]. AI associates with inclusions and abnormalities in dental eruption, congenitally missing teeth, anterior open bite, pulpal calcifications, dentine dysplasias, root and crown resorption, hypercementosis, root malformations, and taurodontism [4].

Brachyolmia is characterized clinically by short trunk stature and radiographically by generalized platyspondyly, without significant epiphyseal, metaphyseal, or diaphyseal changes in long bones [5].

AI and platyspondyly have been previously reported in the literature [6, 7]. This is the first description of a Moroccan patient with a rare association of amelogenesis imperfecta, platyspondyly and bicytopenia.

\* Correspondence: samirlaouina@gmail.com

<sup>1</sup>Faculty of Medicine and Pharmacy Rabat, University Mohammed V Rabat, avenue Mohamed Belarbi El Alaoui, Rabat Institut, BP 6203, 10000 Rabat, Morocco

<sup>2</sup>Faculty of Dentistry Rabat, Centre for Dental Consultation and Treatment, Department of Pediatric Dentistry, University Mohammed V Rabat, avenue Allal el Fassi, rue Mohammed Jazouli cité Al Irfane BP 6212 Rabat Institut, 10000 Rabat, Morocco

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



© 2015 Laouina et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

### Case presentation

A 5-year-old Moroccan boy was referred to the Department of Pediatric Dentistry for dental treatment. He is the first child of a healthy consanguineous couple (first degree). Both parents have normal teeth. No dental problems were reported in other family members.

A detailed medical, dental and social history of the parents was obtained. The medical history and general physical condition were unremarkable.

The boy was born at term after a normal pregnancy, with low birth measurements (weight 1500 g, length 39 cm).

At 24 months of age, he could neither crawl nor walk. He was hospitalized several times to investigate the cause of his failure to thrive, his facial dysmorphism (a thin triangular face, almond-shaped eyes, a big nose and short neck), and swelling of his hands and feet. A physical examination at age 30 months revealed a body weight of 8000 g [-4 standard deviation score (SDS)]. His vital signs were within normal range. In general, the boy was small, thin, and hyperactive with aggressive behavior. Also he was noted to have brief episodes of loss of consciousness.

An examination of his cardiovascular, respiratory, and neurological systems was unremarkable.

Abdominal ultrasonography showed a normal hepatobiliary gallbladder without any anomaly identified.

Frontal digital radiography of his rib cage showed a normal mineralization of the bone matrix, no rib injuries, with rib number and morphology appearing normal.

The genitourinary examination revealed an intra-abdominal testicle.

A complete blood count revealed bicytopenia (normocytic-normochromic anemia with thrombocytopenia): a hemoglobin concentration of 118 g/l (range, 115–140), a hematocrit level of 34 % (range, 37–45 %), a red blood cell count of 3.7 M/ $\mu$ l (range, 3.2–5.5), a total white blood cell count of 9400/ $\mu$ l (neutrophil count 2162/ $\mu$ l), and a platelet count of 126,000/ $\mu$ l (range, 150,000–450,000). Peripheral blood smears of our patient confirmed normocytic-normochromic anemia and low platelet counts.

A cytomorphological examination showed his bone marrow to be free of blast or malignant cells, with normal maturation of the erythroid (18 %) and neutrophil (62 %) lineage. Eosinophils (2 %), lymphocytes (18 %), and megakaryocytes were also of normal number and morphology.

The metabolic workup, including tests for serum electrolytes, fasting blood glucose, renal function, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), iron and ferritin, were all within normal limits.

His urinalysis was normal (pH 6, protein negative, ketone negative, blood negative, leukocytes negative) and urine cultures were negative.

A complete infectious workup, including a human immunodeficiency virus (HIV) test, was negative.

The values of immunoglobulin A (IgA) and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies were negative.

The thyroid function tests and the cortisol levels taken at 8:00 a.m. were within normal limits.

Results of somatomedin C [insulin-like growth factor 1 (IGF-1)] and testosterone tests were as follows: IGF-1 16  $\mu$ g/l (range, 27–114) and testosterone 0.08 ng/ml (range, 1.56–8.77).

The insulin tolerance test showed no response to growth hormone (GH). Thus, the diagnosis of GH deficiency was confirmed. This deficiency was treated with injections of GH until the age of puberty.

A brain magnetic resonance imaging (MRI) scan was unremarkable.

A cytogenetic examination revealed a chromosomal formula 46, XY, a minor increase in the rate of chromosomal breaks (15 breaks), with a triradial picture.

A radiographic examination of his hands showed a normal bone structure, but bone age was delayed by 3 months in this 30-month-old child. A brachymesophalangy, cone epiphyses at the second phalanges, and pseudoepiphysis at the metatarsals were observed (Fig. 1).

A radiographic examination of his spinal column showed a deviation of the spine in the frontal plane in the form of a thoracolumbar scoliosis. The interpedicular distance was not expanded; but a mild platyspondyly exists, especially in T11 and T12 (Fig. 1).

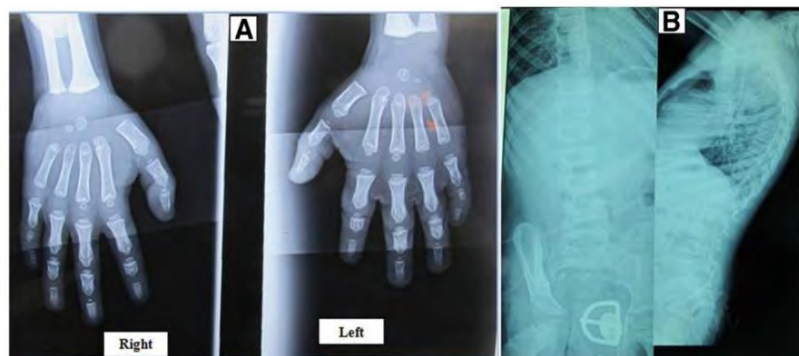
A dental examination revealed hypoplastic AI with a bacterial biofilm deposit on tooth surfaces (Fig. 2).

### Discussion

In 1996 Verloes *et al.* [6] described the case of a 12-year-old boy (brother) and a 16-year-old girl (sister) born of consanguineous parents with amelogenesis imperfecta and platyspondyly (OMIM 601216). At the age of 12, the boy was 133 cm tall, with a sitting height of 63 cm, and arm span of 134 cm. The girl was 141 cm tall at age 16, with an arm span of 142 cm, a sitting height of 72 cm, and short hands. The clinical features were amelogenesis imperfecta associated with short trunk and brachyolmia (that is, a generalized platyspondyly with short pedicles, narrow intervertebral and interpedicular distances, rectangular-shaped vertebrae with posterior scalloping, herniation of the nuclei, and broad femoral necks) [6].

Bertola *et al.* [7] described two other families (two brothers and one unrelated patient), presenting with amelogenesis imperfecta, brachyolmia (generalized platyspondyly), and taurodontism (OMIM 601216). In addition to that, the two brothers had congenital absence of the second mandibular premolars and hypoplastic amelogenesis imperfecta. The unrelated patient had retarded eruption of permanent teeth. The radiologic appearance of the dentition in these three cases is identical, but different from that observed in the case report of Verloes *et al.*





**Fig. 1** Hands-wrist and lumbar spine radiographs of the boy at the age of 30 months. **a** Hands-wrist radiograph shows normal bone structure, but bone age is delayed by 3 months for a 30-month-old child. **b** Lumbar spine radiograph shows a deviation of the spine in the frontal plane in the form of a thoracolumbar scoliosis with a mild platyspondyly

Verloes *et al.* and Bertola *et al.* suggested an autosomal recessive mode of inheritance [6, 7]. Mutation in the latent transforming growth factor (TGF)-beta binding protein 3 (LTBP3) gene causes brachyolmia with amelogenesis imperfecta [8].

Interestingly, in all of these cases, no hematologic abnormalities have been reported. In our case, the patient has been diagnosed clinically as bicytopenia, with GH deficiency, a mild platyspondyly and hypoplastic amelogenesis imperfecta.

Hence while the combination the GH deficiency with amelogenesis imperfecta have been reported [9], the association of bicytopenia with amelogenesis imperfecta, mild platyspondyly, and GH deficiency has never been observed, hence the genetic basis for this heterogeneity is to date unknown.

The bicytopenia in children can be caused by a wide variety of alterations, often leading to diagnostic uncertainty. Etiologies range from congenital and acquired bone marrow failure, to marrow space-occupying lesions, peripheral destruction of hematopoietic cells, autoimmune disorders, infection, and ineffective marrow production [10].

Inherited causes of bone marrow failure encompass Fanconi anemia, dyskeratosis congenita, Shwachman-

Diamond syndrome, and congenital amegakaryocytic thrombocytopenia [10].

Fanconi anemia is characterized by bicytopenia/pancytopenia associated with multiple congenital anomalies (such as skeletal abnormalities, small stature, skin hyperpigmentation, urogenital abnormalities, and mental deficiency), high spontaneous chromosomal breakage and the tendency toward development of malignant disease [10].

In our case, the cytogenetic examination revealed a minor increase in the rate of chromosomal breaks (15 breaks), that suggested Fanconi anemia, but careful examination of clinical data, laboratory findings, and family history could not confirm this diagnosis.

Furthermore, the rate of chromosomal breakage is not sufficient to establish the diagnosis of Fanconi anemia in the absence of other phenotypic anomalies. Hence clinical findings are insufficient to determine the underlying etiology of the bicytopenia [11].

The clinical features appear to have some features of a hereditary condition of amelogenesis imperfecta in which enamel structure is defective. The mode of inheritance appeared to be autosomal recessive because of consanguinity and a negative family history for any bone or dental abnormalities.



**Fig. 2** Intraoral view of the boy at 2 years old reveals hypoplastic amelogenesis imperfecta with a bacterial biofilm deposit on tooth surfaces



## Conclusions

Further research is necessary to clarify the genetic defect behind this syndrome, which combines three uncommon conditions, such as amelogenesis imperfecta, platyspondyly and bicytopenia.

## Consent

Written informed consent was obtained from the patient's family for publication of this case report and any accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

SL and ME wrote the manuscript. ME, RA and AA participated in the clinical diagnosis and the management of the patient. SCE and AS participated in the diagnosis and chromosome studies. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We are grateful for the cooperation of the patient's family.

## Author details

<sup>1</sup>Faculty of Medicine and Pharmacy Rabat, University Mohammed V Rabat, avenue Mohamed Belarbi El Alaoui, Rabat Institut, BP 6203, 10000 Rabat, Morocco. <sup>2</sup>Faculty of Dentistry Rabat, Centre for Dental Consultation and Treatment, Department of Pediatric Dentistry, University Mohammed V Rabat, avenue Allal el Fassi, rue Mohammed Jazouli cité Al Irfane BP 6212 Rabat Institut, 10000 Rabat, Morocco. <sup>3</sup>Military Hospital Mohammed V, BP 1018 Hay Riad, 10100 Rabat, Morocco. <sup>4</sup>Genomic Center of Humain Sciences, Department of Medical Genetics, Institut National d'Hygi ne, University Mohammed V Rabat, 27 avenue Ibn Batouta, BP 769, 10100 Rabat, Morocco.

Received: 6 May 2015 Accepted: 7 October 2015  
Published online: 28 October 2015

## References

- Kirzioglu Z, Ulu KG, Sezer MT, Yuksel S. The relationship of amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14:e579–582.
- Witkop Jr CJ. Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification. *J Oral Pathol*. 1988;17:547–53.
- Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:17.
- Aldred MJ, Savarirayan R, Crawford PJ. Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century. *Oral Dis*. 2003;9:19–23.
- Mukamel M, Karmazyn B, de Vries L, Horev G, Shohat M. Brachyolmia and spinal stenosis. *Am J Med Genet A*. 2003;120a:272–5.
- Verloes A, Jamblin P, Koulischer L, Bourguignon JP. A new form of skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta and platyspondyly. *Clin Genet*. 1996;49:2–5.
- Bertola DR, Antequera R, Rodovalho MJ, Honjo RS, Albano LM, Furquim IM, et al. Brachyolmia with amelogenesis imperfecta: further evidence of a distinct entity. *Am J Med Genet A*. 2009;149a:532–4.
- Huckert M, Stoetzel C, Morkmued S, Laugel-Haushalter V, Geoffroy V, Muller J, et al. Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 2015;24:3038–49.
- Dundar B, Ercal D, Bober E, Berk T, Buyukgebiz A. Amelogenesis imperfecta with growth hormone deficiency in a 12 year-old boy. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002;15:659–62.
- Erlacher M, Strahm B. Missing cells: pathophysiology, diagnosis, and management of (pan)cytopenia in childhood. *Front Pediatr*. 2015;3:64.
- Cervenka J, Arthur D, Yasis C. Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia. *Pediatrics*. 1981;67:119–27.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## **II- A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement [2]**

### **Résumé**

Le but de cet article a été de développer un panel diagnostique de gènes par séquençage nouvelle génération (NGS) ciblé sur 585 gènes qui ont été soit impliqués dans les maladies bucco-dentaires syndromiques et non syndromiques ou ont été considérés comme des gènes candidats pour ces maladies.

Nous avons effectué une étude de cohorte de 101 patients sans diagnostic moléculaire, référés au centre de référence pour les manifestations odontologiques des maladies Strasbourg France pour différentes anomalies génétiques dentaires incluant AI isolée et syndromique, dentinogenèse imparfaite isolée et syndromique, oligodontie et retard d'éruption. 3 patients marocains ont participé dans cette étude. Le premier patient issu d'une famille consanguine présentait une AI isolée de type hypoplasique. Le deuxième patient ayant un retard d'éruption des dents permanentes et le dernier patient présentait une dentinogenèse imparfaite avec une chondrodysplasie (soupçonné d'un syndrome de Goldblatt).

21 nouveaux variants pathogènes a été découverts et la mutation causale a été identifiée chez 39 patients dans les gènes connus. Le taux diagnostique global est de 39%.

Parmi les 71 patients atteints de l'AI (50 patients avec AI isolée et 21 avec AI syndromique), un diagnostic définitif a été confirmé pour 14 patients (27%) et 15 patients (71%) respectivement.

Pour les 3 patients marocains participés, nous avons identifié la mutation causale pour le premier patient atteint de l'AI hypoplasique et la mutation trouvée a été validée par le séquençage Sanger.

Pour les 2 autres patients, l'analyse bioinformatique des résultats n'a pas confirmé le diagnostic clinique. En attendant de poursuivre les investigations par d'autres techniques de recherche pour identifier les gènes impliqués dans ces anomalies [50, 59, 63, 65, 67, 70, 79, 83, 85-87, 90, 94, 95, 97, 109, 112, 121, 122, 125, 132, 136, 151, 177-257].





## ORIGINAL ARTICLE

# A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement

Megana K Prasad,<sup>1</sup> Véronique Geoffroy,<sup>1</sup> Serge Vicaire,<sup>2</sup> Bernard Jost,<sup>2</sup> Michael Dumas,<sup>2</sup> Stéphanie Le Gras,<sup>2</sup> Marzena Switala,<sup>3,4</sup> Barbara Gasse,<sup>5</sup> Virginie Laugel-Haushalter,<sup>6</sup> Marie Paschaki,<sup>1,6</sup> Bruno Leheup,<sup>7</sup> Dominique Droz,<sup>8</sup> Amelie Dalstein,<sup>8</sup> Adeline Loing,<sup>3</sup> Bruno Grollemund,<sup>4</sup> Michèle Muller-Bolla,<sup>9,10</sup> Séréna Lopez-Cazaux,<sup>11</sup> Maryline Minoux,<sup>3,4</sup> Sophie Jung,<sup>3,4</sup> Frédéric Oby,<sup>3,4</sup> Vincent Vogt,<sup>3,4</sup> Jean-Luc Davideau,<sup>4</sup> Tiphaine Davit-Beal,<sup>5,12</sup> Anne-Sophie Kaiser,<sup>13</sup> Ute Moog,<sup>13</sup> Béatrice Richard,<sup>14</sup> Jean-Jacques Morrier,<sup>14</sup> Jean-Pierre Duprez,<sup>14</sup> Sylvie Odent,<sup>15</sup> Isabelle Bailleul-Forestier,<sup>16</sup> Monique Marie Rousset,<sup>17</sup> Laure Merametdijan,<sup>18</sup> Annick Toutain,<sup>19</sup> Clara Joseph,<sup>20</sup> Fabienne Giuliano,<sup>21</sup> Jean-Christophe Dahlet,<sup>3</sup> Aymeric Courval,<sup>22</sup> Mustapha El Alloussi,<sup>23</sup> Samir Laouina,<sup>23</sup> Sylvie Soskin,<sup>24</sup> Nathalie Guffon,<sup>25</sup> Anne Dieux,<sup>26</sup> Bérénice Doray,<sup>27</sup> Stephanie Feierabend,<sup>28</sup> Emmanuelle Ginglinger,<sup>29</sup> Benjamin Fournier,<sup>30,31</sup> Muriel de la Dure Molla,<sup>30,31</sup> Yves Alembik,<sup>27</sup> Corinne Tardieu,<sup>32</sup> François Claus,<sup>3,4</sup> Ariane Berdal,<sup>30,31</sup> Corinne Stoetzel,<sup>1</sup> Marie Cécile Manière,<sup>3,4</sup> Hélène Dollfus,<sup>1,33</sup> Agnès Bloch-Zupan<sup>3,4,6</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103302>).

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**  
Professor Agnès Bloch-Zupan,  
Faculty of Dentistry,  
University of Strasbourg,  
8 rue St Elisabeth,  
Strasbourg 67000, France;  
[agnes.bloch-zupan@unistra.fr](mailto:agnes.bloch-zupan@unistra.fr)

Received 6 June 2015  
Revised 8 September 2015  
Accepted 24 September 2015  
Published Online First  
26 October 2015



CrossMark

**To cite:** Prasad MK,  
Geoffroy V, Vicaire S, et al.  
*J Med Genet* 2016;**53**:  
98–110.

**ABSTRACT**

**Background** Orodontal diseases include several clinically and genetically heterogeneous disorders that can present in isolation or as part of a genetic syndrome. Due to the vast number of genes implicated in these disorders, establishing a molecular diagnosis can be challenging. We aimed to develop a targeted next-generation sequencing (NGS) assay to diagnose mutations and potentially identify novel genes mutated in this group of disorders.

**Methods** We designed an NGS gene panel that targets 585 known and candidate genes in orodontal disease. We screened a cohort of 101 unrelated patients without a molecular diagnosis referred to the Reference Centre for Oro-Dental Manifestations of Rare Diseases, Strasbourg, France, for a variety of orodontal disorders including isolated and syndromic amelogenesis imperfecta (AI), isolated and syndromic selective tooth agenesis (STHAG), isolated and syndromic dentinogenesis imperfecta, isolated dentin dysplasia, otodontal dysplasia and primary failure of tooth eruption.

**Results** We discovered 21 novel pathogenic variants and identified the causative mutation in 39 unrelated patients in known genes (overall diagnostic rate: 39%). Among the largest subcohorts of patients with isolated AI (50 unrelated patients) and isolated STHAG (21 unrelated patients), we had a definitive diagnosis in 14 (27%) and 15 cases (71%), respectively. Surprisingly, *COL17A1* mutations accounted for the majority of autosomal-dominant AI cases.

**Conclusions** We have developed a novel targeted NGS assay for the efficient molecular diagnosis of a wide

variety of orodontal diseases. Furthermore, our panel will contribute to better understanding the contribution of these genes to orodontal disease.

**Trial registration numbers** NCT01746121 and NCT02397824.

**INTRODUCTION**

Orodonal disorders encompass a number and variety of diseases that affect the teeth and oral cavity. Broadly, these disorders can be classified into anomalies of tooth number, shape and size (eg, hypo/oligo/ano-dontia (collectively selective tooth agenesis (STHAG)), microdontia, globodontia), anomalies of tooth structure (eg, amelogenesis imperfecta (AI), hereditary dentin disorders) and anomalies of tooth eruption. The prevalence of these disorders varies from relatively common (4.2% for hypodontia in the Caucasian population)<sup>1</sup> to extremely rare (1 in 100 000 for dentin dysplasia (DD) type 1).<sup>2</sup>

Orodonal disorders can have a genetic, environmental or multifactorial basis.<sup>3,4</sup> Although evidence demonstrates a role for environmental pollutants such as dioxins and fluoride in developmental enamel defects,<sup>5,6</sup> a number of studies have also demonstrated a strong genetic aetiology for several orodontal diseases (reviewed in refs. 7–9). Among the >5000 known genetic syndromes, >900 have orodontal/craniofacial features.<sup>10</sup> Even in the case of isolated orodontal diseases, significant genetic heterogeneity exists, with several of the same genes being involved in isolated and syndromic forms of



disease. For instance, mutations in eight genes have been implicated in STHAG (*PAX9*, *MSX1*, *LTBP3*, *AXIN2*, *WNT10A*, *EDA*, *EDARADD* and *EDAR*),<sup>11–17</sup> of which several (*MSX1*, *WNT10A*, *EDA*, *EDARADD* and *EDAR*) have also been linked with forms of ectodermal dysplasia.<sup>18–20</sup> Similarly, mutations in a number of genes have been implicated thus far in AI, of which 10 cause an exclusively dental phenotype (*ENAM*, *WDR72*, *KLK4*, *AMELX*, *MMP20*, *FAM83H*, *AMBN*, *ITGB6*, *SLC24A4* and *c4orf26*),<sup>21–30</sup> some cause syndromic disease with AI (*LTBP3*, *FAM20A*, *CNNM4*, *ROGDI*, *STIM1* and *FAM20C*),<sup>31–36</sup> and yet others account for isolated and syndromic AI (*COL17A1*, *LAMA3*, *LAMB3* and *DLX3*).<sup>37–40</sup> Indeed, the pattern of inheritance and penetrance associated with each gene also varies. This wide range of heterogeneity can render genetic diagnosis challenging.

Yet, the early molecular diagnosis of orodental disorders is important as it can improve patient care. For instance, mutations in *AXIN2* that cause STHAG have been shown to predispose carriers to colorectal cancer.<sup>12</sup> Early diagnosis of *AXIN2* mutations can hence alert clinicians to counsel patients to have regular colonoscopies. Similarly, the identification of mutations in *FAM20A* in patients presenting with AI can prompt a renal investigation for the management of nephrocalcinosis.<sup>41</sup>

Targeted next-generation sequencing (NGS) has proven extremely beneficial clinically for the molecular diagnosis of a number of genetically heterogeneous disorders, such as hearing loss, mitochondrial disease, intellectual disability (ID), neuromuscular disorders and Bardet–Biedl syndrome.<sup>42–46</sup> Better coverage, lower cost and relative ease of data interpretation have made it more commonplace for routine clinical use than whole-exome sequencing (WES) and whole-genome sequencing (WGS).<sup>47</sup>

We have developed the first targeted NGS panel for the molecular diagnosis of isolated and syndromic orodental disorders. We demonstrate the utility of this panel in the molecular diagnosis of a variety of orodental disorders. In a cohort of 103 patients (101 unrelated) without a known molecular diagnosis referred to the Reference Centre for Rare Diseases with Oro-dental Manifestations, we were able to provide a definitive molecular diagnosis in 39% of patients in known disease-causing genes. The identification of mutations in genes underlying syndromic forms of orodental disease highlights the potential benefits of a complete oral investigation in the diagnosis of rare genetic diseases. The aim of this article is to demonstrate the utility of this targeted NGS assay for the diagnosis of mutations in known orodental disease genes. However, the potential for the discovery of novel genes is addressed in the discussion.

## METHODS

### Patients

Patients were referred to the Reference Centre for Rare Diseases with Oro-dental Manifestations (Strasbourg, France) by dentists, paediatricians and geneticists from 13 hospitals and 32 private practices in France, Germany and Morocco. The inclusion criterion for the study was the presence of an orodental anomaly, defined as an anomaly of the mouth, including teeth and surrounding structures such as the periodontium (alveolar bone, ligament and gingivae), as well as defects of lip and palate formation. Patients with known mutations used for the validation assay were previously diagnosed either in clinical (Laboratory for Genetic Diagnosis, Strasbourg University Hospital) or research laboratories. DNA was obtained from peripheral blood or saliva samples (Oragene DNA, DNA Genotek, Canada).

Patient phenotype was recorded using D[4]/Phenodent (<http://www.phenodent.org>).

### Gene selection and targeted capture design

Genes were selected based on their involvement in human diseases with orodental phenotypes, mutation in animal models presenting orodental disorders,<sup>48–49</sup> expression in the developing mouse tooth<sup>50</sup> and known role in tooth development. Two versions of the gene panel were developed, v1.0 and v2.0. v1.0 was used for patients V1.01–V1.16, whereas v2.0 was used for patients V2.01–V2.95. Complementary RNA capture probes were designed against all coding exons and 25 bp of flanking intronic sequence in order to cover splice junctions of these genes using the SureDesign portal (<https://erray.chem.agilent.com/suredesign>, Agilent, USA).

### Library preparation, sequencing and data analysis

Targeted regions were captured using a Custom SureSelectXT2 in-solution target enrichment kit (Agilent) and libraries were prepared for sequencing (2×100 bp) on the HiSeq2500 (Illumina, USA) following the manufacturer's instructions. For v1.0, 16 samples were multiplexed per lane for sequencing, whereas for v2.0, 32 samples were multiplexed per flow-cell lane. Read alignment, and variant calling and annotation were performed using standard methods. Briefly, reads were aligned to the GRCh37 reference genome using Burrow–Wheeler aligner (v0.7.5a)<sup>51</sup> ensuring tagging of multi-mapped reads, and duplicates were marked with Picardv1.102 (<http://picard.sourceforge.net>). Indel realignment, base quality score recalibration and variant calling were performed with the GATK Toolkit v3.1 using hard-filtering parameters.<sup>52–54</sup> Variants were annotated using snpEffv.3.4.<sup>55</sup> Variant frequencies were compared with an internal exome database and prioritised using VARank.<sup>56</sup> Variants were prioritised by allele frequency (<1% in the Single Nucleotide Polymorphism database (dbSNP137), 1000 Genomes database,<sup>57</sup> Exome Variant Server (EVS) database<sup>58</sup> and our internal database, except for non-syndromic STHAG, for which we used a cut-off of <4%) and predicted functional effect (frameshift, invariant splice sites, non-synonymous and splice affecting mutations). Missense mutations were evaluated for pathogenicity bioinformatically using Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT), PolyPhen, MutationTaster and amino acid conservation.<sup>59–61</sup> Splice affecting mutations were evaluated bioinformatically using Human Splice Finder, MaxEntScan, NNSplice, Gene Splicer, SSF, Rescue ESE and ESE Finder.<sup>62–67</sup> CNVs were detected as previously described.<sup>44–45</sup> Variant pathogenicity was interpreted according to the American College of Medical Genetics guidelines.<sup>68</sup> Evidence used to establish pathogenicity is provided in online supplementary figures S1–S45.

### Mutation validation

All mutations were validated by Sanger sequencing (GATC, Germany). Segregation analyses were performed whenever DNA was available for additional family members. Single-molecule PCR followed by Sanger sequencing was used to phase biallelic mutations when parental DNA was unavailable.<sup>69–70</sup> Deletions were validated by qPCR. The region of interest and an internal control region (*RPPH1*) were amplified from 2 ng of genomic DNA from the patient and a control using the iQ SYBR Green Supermix (170-8880, Biorad, USA) on a CFX96 Real-Time System (Biorad). Data were analysed using the Pfaffl method.<sup>71</sup>



## RESULTS

## Validation of v1.0 of the NGS panel

As a proof of principle, we created a primary version (v1.0) of a custom NGS panel that targets 560 known and candidate genes (2.36 Mb) in orodental disorders. Of these genes, probes for 175 known and strong candidate genes (0.81 Mb) were designed to have superior coverage (diagnosis subpanel), whereas the remaining candidate genes constituted a 'Discovery subpanel' (see online supplementary tables S1 and S2). We validated v1.0 in a cohort of 16 patients: patients V1.01–V1.08 with isolated and/or syndromic orodental diseases with known mutations as determined by previous candidate gene Sanger sequencing, WES, or array CGH (see online supplementary table S3) and patients V1.09–V1.16 without a known molecular diagnosis. Patients V1.01–V1.08 were selected to include a variety of heterozygous, homozygous and hemizygous mutations (substitutions, indels, a large heterozygous deletion) at eight different loci in order to test the sensitivity of the gene panel to different types of genetic alterations. Using our computational pipeline, 10 of 10 mutations, including a large heterozygous deletion on the X chromosome (see online supplementary table S3), were detected in a blinded manner by a bioinformatician who was unaware of the molecular alteration but was aware of the clinical diagnosis for each patient. The bioinformatician was also blinded to the mode of inheritance in order to simulate a diagnostic scenario where such information is often unavailable. Samples V1.09–V1.16 were selected to cover a variety of orodental phenotypes (AI, dentinogenesis imperfecta (DGI), DD, STHAG) to determine the potential to identify unknown mutations with our panel. The molecular results from samples V1.09–V1.16 are presented and discussed in tables 1–3, together with the results from v2.0 of the gene panel presented below. Briefly, pathogenic or likely pathogenic mutations were identified in six of eight samples among samples V1.09–V1.16 (tables 2 and 3).

On average, in this validation cohort, by multiplexing 16 samples per lane of a sequencing flow cell, 2.2 Gb of sequence was generated per sample, giving a mean coverage of 365 $\times$ , with 95.31% nucleotides covered at  $\geq 50\times$  (see online supplementary table S4). The mean coverage of the diagnostic subpanel was 404 $\times$ , with 98.94% of nucleotides covered at  $\geq 20\times$ , permitting confident diagnosis of mutations in these genes, for which we set a minimum coverage threshold of 20 $\times$  (see online supplementary table S4). A small percentage of targeted regions (33.3 kb, 1.4%) had an average coverage  $< 20\times$  across samples due to high guanine-cytosine (GC) content or pseudogenes with highly similar sequences (see online supplementary table S5). The majority of these regions were in the discovery subpanel (28.1 kb). Under-representation of high GC content and pseudogenic regions is a known issue with probe-based targeting strategies. However, these gaps can be filled in by Sanger sequencing for regions considered to be relevant on a case-by-case basis. On average, we detected ~2648 variants/sample, of which ~87 variants/sample were rare ( $< 1\%$  in dbSNP137, 1000Genomes, EVS and an in-house database). Among these rare variants, we identified on average per sample ~20 missense changes, 0.38 nonsense mutations, 0.25 splice-site changes and 0.56 frameshift-inducing indels (see online supplementary table S6).

## Development of v2.0 of the NGS panel

Having validated v1.0 of our NGS gene panel, we included 25 additional genes to the discovery subpanel to create a second

version of the panel (v2.0) that included 585 genes (2.47 Mb). These additional genes were included due to their implication in animal models of orodental disease that was unknown when designing v1.0 of the panel v2.0 of the panel was used to sequence 95 patients (V2.01–V2.95). Furthermore, since the average coverage achieved with v1.0 was more than sufficient for confident molecular diagnosis, with v2.0, 32 samples were multiplexed per well of a flow cell lane in order to reduce sequencing costs while ensuring a minimum average coverage of 100 $\times$  per sample. Sequencing output with v2.0 is shown in online supplementary table S7. Briefly, we achieved a mean coverage of 179 $\times$  overall, with 97.2% of the targeted region covered at  $\geq 20\times$ . Furthermore, the diagnostic panel had an average coverage of 211 $\times$  with 97% of bases covered at  $\geq 50\times$ .

## Screening a cohort of patients with diseases with orodental involvement

A description of the final cohort of 103 patients (101 unrelated) without a known mutation sequenced with v1.0 (V1.09–V1.16) and v2.0 (V2.01–2.95) and the diagnostic yield by disease category is shown in table 1. Isolated AI was the most common disorder in the cohort (50%), followed by isolated STHAG (20%). We also included several patients with syndromic forms of AI, ranging from well-defined syndromes, such as Enamel Renal Syndrome, to undefined and suspected syndromes, hoping that a molecular diagnosis may aid difficult clinical diagnosis. The remaining cases consisted of patients with isolated or syndromic dentin disorders, syndromic STHAG, suspected orodental dysplasia and primary failure of tooth eruption. Since AI and STHAG can be inherited in an autosomal-dominant (AD),

**Table 1** Cohort description and diagnostic yield per disease category

Disease	Number of patients	Diagnostic yield, N (%)
Isolated AI	52 (51*)	14 (27%)
Of which confirmed AI	51 (50*)	15 (29%, 30%*)
Of which suspected AI	1	0 (0%)
Syndromic AI	14	1 (7%)
Enamel renal syndrome	1	1 (100%)
Mucopolysaccharidosis IV A	1	0 (0%)†
Kohlschutter Tonz (suspected)	1	0 (0%)
Osteogenesis imperfecta (suspected)	1	0 (0%)
Spondyloepiphyseal dysplasia	1	0 (0%)†
Undefined syndrome	9	0 (0%)
Isolated STHAG	21	15 (71%)
Syndromic STHAG	4	2 (50%)
Ectodermal dysplasia	3	1 (33%)
Intellectual disability with STHAG	1	1 (100%)
Isolated DGI	5 (4*)	5, 4* (100%)
Syndromic DGI	2	1 (50%)
Goldblatt syndrome (suspected)	1	0 (0%)
Osteogenesis imperfecta	1	1 (100%)
Isolated DD	2	1 (50%)
Orodental syndrome	1	1 (100%)
Primary failure of tooth eruption	2	0 (0%)
Total	103 (101*)	40, 39* (39%)

\*Number of unrelated patients.

†Likely pathogenic mutations were identified in *GALNS* in these patients.

AI, amelogenesis imperfecta; DD, dentin dysplasia; DGI, dentinogenesis imperfecta; STHAG, selective tooth agenesis.



**Table 2** Pathogenic mutations identified in patients without a known mutation

Patient ID	Sex	Age (years)	Mode	Clinical features	Gene	Transcript	c.	p.	Inheritance	Reference	Figure
<i>Pathogenic variants</i>											
<i>Isolated AI</i>											
V1.14	M	25	?	Hypoplastic, hypomineralised	<i>WDR72</i>	NM_182758.3	c.[182A>G];[815G>A]	p.[H61R];[W272*]	Compound heterozygous	Novel	S1
V2.05	M	6	AR	N/A	<i>CNNM4</i>	NM_020184.3	c.[1495G>A];[1495G>A]	p.[V499M];[V499M]	Homozygous (C)	Novel	S2
V2.08	M	12	AR	Hypomineralised	<i>SLC24A4</i>	NM_153646.3	c.[(1537+1_1538-1)_(*67_?)del]; [(1537+1_1538-1)_(*67_?)del]	p.[0?];[0?]	Homozygous (C)	72	S3
V2.09	F	16	AD	Hypoplastic	<i>COL17A1</i>	NM_000494.3	c.[2407G>T]; [=]	p.[G803*];[=]	Maternal	73	S4
V2.18	M	13	?	Hypoplastic	<i>LAMB3</i>	NM_000228.2	c.[124C>T]; [=]	p.[R42*];[=]	?	74	S5
V2.20	F	18	?	Hypomature	<i>FAM83H</i>	NM_198488.3	c.[1289C>A];[=]	p.[S430*];[=]	?	75	S6
V2.26	M	13	AD	Hypomineralised	<i>FAM83H</i>	NM_198488.3	c.[1282C>T];[=]	p.[Q428*];[=]	Paternal	Novel	S7
V2.28	M	14	?	Hypoplastic	<i>AMELX</i>	NM_182680.1	c.[155C>T];[=]	p.[P52L];[=]	De novo	Novel	S8
V2.29	M	14	AD	N/A	<i>ENAM</i>	NM_031889.2	c.[123+1G>A];[=]	p.[0?];[=]	Paternal	Novel	S9
V2.48	F	20	AD	Hypoplastic	<i>COL17A1</i>	NM_000494.3	c.[1646G>A];[=]	p.[W549*];[=]	Maternal	Novel	S10
V2.53	F	19	?	Hypoplastic	<i>AMBN</i>	NM_016519.5	c.[532-1G>C];[532-1G>C]	p.[0?];[0?]	Homozygous	Novel	S11
V2.63	M	10	?	N/A	<i>FAM83H</i>	NM_198488.3	c.[2029C>T];[=]	p.[Q677*];[=]	?	76	S12
V2.79	M	10	?	Hypoplastic, hypomature	<i>COL17A1</i>	NM_000494.3	c.[1873C>T];[=]	p.[R625*];[=]	?	Novel	S13
V2.82	F	14	AD	Hypoplastic	<i>COL17A1</i> ; <i>LAMA3</i>	NM_000494.3; NM_198129.1	<i>COL17A1</i> :c.[1141+1G>A]; <i>LAMA3</i> :c.[6477_6486del]	<i>COL17A1</i> :p.[0?]; <i>LAMA3</i> :p.[I2159Mfs*46]	Maternal and ?	Novel	2
<i>Syndromic AI</i>											
V2.06	F	14	?	Enamel Renal Syndrome	<i>FAM20A</i>	NM_017565.3	c.[1106_1107del]; [c.1006_1107del]	p.[E2316Gfs*10]; [E2316Gfs*10]	Homozygous	Novel	S14
<i>Isolated STHAG</i>											
V1.11	M	21	?	Ag 12, 13, 14, 15, 18, 22, 23, 24, 25, 28, 31, 34, 35, 38, 44, 45, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[383G>A];[=]	p.[R128Q];[=]	Maternal	77	S15
V1.15	F	11	?	Ag 12, 15, 17, 22, 25, 27, 28, 31, 35, 37, 38, 41, 44, 45, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[343A>C](c);[682T>A]	p.[K115Q](c);[F228I]	?	Novel and 78	S16
V2.55	F	15	?	Ag 11, 12, 13, 14, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[321C>A];[321C>A]	p.[C107*];[C107*]	Homozygous	78	S17
V2.65	F	17	?	Ag 12, 13, 15, 17, 18, 22, 23, 25, 27, 28, 31, 32, 35, 37, 38, 41, 42, 45, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[682T>A]	p.[F228I];[F228I]	Homozygous	78	S18
V2.66	M	37	?	Ag 12, 13, 18, 22, 28, 31, 32, 37, 38, 41, 42, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[682T>A]	p.[F228I];[F228I]	Homozygous	78	S19
V2.67	M	11	AD	Ag 15, 16, 17, 18, 25, 26, 27, 28, 36, 37, 38, 45, 46, 47, 48	<i>PAX9</i>	NM_006194.3	c.[(?_-115)_(*62_?)del];[=]	p.[0?];[=]	Paternal	78	S20
V2.69	M	18	?	Ag 13, 14, 18, 22, 23, 24, 28, 31, 41, 45	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[637G>A];[=]	p.[G213S];[=]	?	79	S21
V2.71	M	11	?	Ag 12, 13, 15, 17, 18, 22, 23, 25, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[321C>A]	p.[F228I];[C107*]	Compound heterozygous	78	S22
V2.72	M	33	?	Ag 17, 18, 22, 28, 31, 32, 37, 38, 41, 42, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A ](c);[321C>A]	p.[F228I](c);[C107*]	?	78	S23
V2.74	M	26	?	Ag 13, 15, 18, 23, 24, 25, 28, 31, 33, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[682T>A]	p.[F228I];[F228I]	Homozygous	78	S24

Continued

Table 2 Continued

Patient ID	Sex	Age (years)	Mode	Clinical features	Gene	Transcript	c.	p.	Inheritance	Reference	Figure
V2.76	M	15	?	Ag 12, 14, 15, 18, 22, 24, 25, 28, 31, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[682T>A]	p.[F228I];[F228I]	Homozygous	<sup>78</sup>	S25
V2.78	F	9	?	Ag 12, 14, 22, 31, 32, 35, 41	<i>EDA</i>	NM_001399.4	c.[467G>A];[=]	p.[R156H];[=]	De novo	<sup>17</sup>	S26
V2.91	F	12	AD	Ag 14, 15, 24, 25, 35, 36, 45, 46	<i>MSX1</i>	NM_002448.3	c.[249del];[=]	p.[E84Rfs*76];[=]	Paternal	Novel	S27
V2.92	M	9	?	Ag 12, 17, 22, 23, 24, 25, 27, 35, 37, 33, 31, 41, 43, 45, 47	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[=]	p.[F228I];[=]	Maternal	<sup>78</sup>	S28
V2.93	M	28	?	Ag 14, 15, 18, 25, 27, 28, 32, 34, 35, 37, 38, 44, 45, 47, 48	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[682T>A]	p.[F228I];[F228I]	Homozygous	<sup>78</sup>	S29
Syndromic STHAG											
V2.54	F	49	?	ED	<i>WNT10A</i>	NM_025216.2	c.[682T>A];[c.416C>T]	p.[F228I];[p.A139V]	Compound heterozygous	<sup>78</sup> and novel	S30
V2.87	F	3	?	Intellectual disability	<i>CTNNB1</i>	NM_001904.3	c.[998dup];[=]	p.[Tyr333*];[=]	?	Novel	S31
Isolated DGI/DD											
V1.09	F	10	AD	DD*	<i>DSPP</i>	NM_014208.3	c.[3480del];[=]	p.[S1160Rfs*154];[=]	?	Novel	S32
V1.10	M	9	AD	DGI*	<i>DSPP</i>	NM_014208.3	c.[3480del];[=]	p.[S1160Rfs*154];[=]	Maternal	Novel	S32
V2.36	M	45	AD	DGI	<i>DSPP</i>	NM_014208.3	c.[3533_3534insTA];[=]	p.[N1179Tfs*136];[=]	?	Novel	S33
V2.55	F	12	AD	DGI	<i>DSPP</i>	NM_014208.3	c.[52G>T];[=]	p.[V18F];[=]	Maternal	<sup>80</sup>	S34
V2.57	F	44	AD	DGI	<i>DSPP</i>	NM_014208.3	c.[3480del];[=]	p.[S1160Rfs*154];[=]	?	Novel	S35
V2.59	F	41	?	DGI	<i>DSPP</i>	NM_014208.3	c.[3682_3686del];[=]	p.[S1228*];[=]	?	Novel	S36
Syndromic DGI											
V2.58	M	47	AD	Osteogenesis imperfecta	<i>COL1A1</i>	NM_000088.3	c.[3837_3840del];[=]	p.[N1279Lfs*51];[=]	Paternal	Novel	S37
Otodental syndrome											
V2.03	M	13	AD		<i>FGF3</i>	NM_005247.2	c.[(?)_3]_(220+1_221-1)del];[=]	p.[O?];[=]	Paternal	Novel	S38

\*Related individuals.

AD, autosomal dominant; AI, amelogenesis imperfecta; AR, autosomal recessive; C, consanguineous parents; DD, dentin dysplasia; DGI, dentinogenesis imperfecta; ED, ectodermal dysplasia; ID, intellectual disability; STHAG, selective tooth agenesis.



**Table 3** Likely pathogenic variants and other variants identified in patients without a known mutation

Patient ID	Sex	Age (y)	Mode	Clinical features	Gene	Transcript	c.	p.	Inheritance	Reference	Figure
<i>Likely pathogenic variants</i>											
V1.12	M	11	?	Ectodermal dysplasia	EDA	NM_001399.4	c.[396+5G>A];[=]	p.[07];[=]	Maternal	Novel	S39
V2.07	M	14	?	AI hypomineralised, hypoplastic	MMP20	NM_004771.3	c.[954-2A>T];[126+6T>G]	p.[07];[07]	Compound heterozygous	<sup>25</sup> and novel	S40
V2.13	F	17	?	AI hypoplastic, hypomature	MMP20	NM_004771.3	c.[954-2A>T];c.[103A>C]	p.[07];[R35R]	?	<sup>25</sup> and novel	S41
V2.15	M	20	?	Spondyloepiphyseal dysplasia	GALNS	NM_000512.4	c.[121-3T];[935C>G]	p.[07];[T312S]	Compound heterozygous	Novel and <sup>81</sup>	S42
V2.32	F	26	?	AI hypomineralised, hypoplastic	FAM20A	NM_017565.3	c.[590-2A>G;590-3C>A];c.[1294G>A]	p.[07];[c].[A432T]	Maternal and de novo	<sup>82</sup> and novel	S43
V2.86	F	6	?	AI hypoplastic	LAMB3	NM_000228.2	c.[1903C>T];[=]	p.[R635*];[=]	Maternal, asymptomatic	<sup>83</sup>	S44
Cases where only a single pathogenic variant was identified											
V2.49	F	4	?	Mucopolysaccharidosis IVA	GALNS	NM_000512.4	c.[1156C>T];[?]	p.[R386C];[?]	de novo	<sup>84</sup>	S45

AI, amelogenesis imperfecta; ID, intellectual disability.

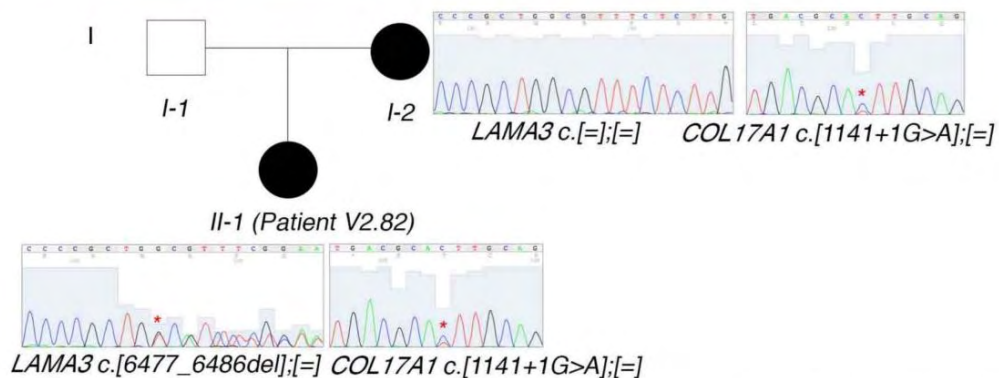
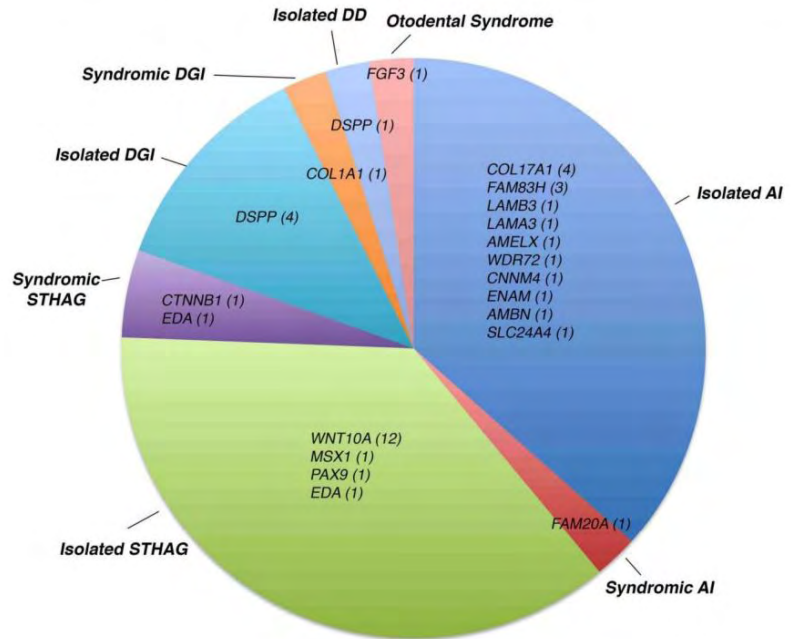
autosomal-recessive (AR) or X-linked fashion, the mode of transmission was unclear for the majority of cases. Sixty-six cases showed sporadic disease, whereas 35 showed familial transmission. The mode of inheritance could be confidently inferred only in 18 cases, 15 as AD due to the presence of other affected family members, 2 as AR due to the presence of consanguinity between the parents of the index case and 1 as X-linked. Due to the large number of cases without a known mode of inheritance of disease, a common situation in diagnostic cohorts, variant filtration was performed for all samples for all modes of inheritance. Overall, we had a definitive molecular diagnosis in known genes in 39 cases (39%) and discovered 21 novel pathogenic variants. All pathogenic mutations identified in this cohort are listed in table 2. Likely pathogenic mutations and other variants are shown in table 3. The distribution of pathogenic variants identified with respect to the disease category and the number of cases corresponding to each mutated gene is shown in figure 1.

**Isolated AI: COL17A1 mutations are a frequent cause of AI**

Of the 50 unrelated cases with confirmed isolated AI, we identified the causative mutation in 14 cases (27%). Surprisingly, the most frequently mutated gene in our cohort was COL17A1, with four independent patients segregating pathogenic mutations in this gene (of which three are novel). In the biallelic state, mutations in COL17A1, encoding a structural component of hemidesmosomes, cause junctional, non-Herlitz-type epidermolysis bullosa (EB), a skin blistering disorder with associated dental enamel defects.<sup>85</sup> However, rare cases of isolated ADAI in heterozygous carriers have been reported.<sup>37 86</sup> Similarly, heterozygous mutations in LAMA3 and LAMB3, which also encode hemidesmosomal components, can cause ADAI, whereas biallelic mutations in these genes cause EB.<sup>38 39</sup> We found one family segregating a known heterozygous LAMB3 nonsense mutation. These patients showed a similar enamel phenotype characterised by a hypoplastic form of AI with thin enamel and a characteristic pitting of the enamel that varied in severity (figures 2A–H and 3C). Depending on the extent of pitting, the enamel surface was sometimes rough. Secondary extrinsic colouration of the pits rendered them more visible. Interestingly, patient V2.82 had two unlinked mutations, one maternally inherited novel COL17A1 splice mutation (c.1141+1G>A) and a novel LAMA3 frameshift-inducing deletion (p.I2159Mfs\*46) that is absent in her mother (figure 2I). The father of the patient was unavailable for testing but was described as unaffected at the time of ascertainment. The c.1141+1G>A mutation is predicted to cause either in-frame skipping of exon 14 (which encodes a part of the intracellular domain) or retention of intron 14 that would subsequently introduce a premature termination codon (PTC) and likely nonsense-mediated decay (NMD) of the transcript. Patient V2.82's enamel phenotype is more severe than that of her mother, suggesting digenic inheritance in this individual. Patient V2.82 has hypoplastic AI with clearly visible pitted enamel in the vestibular, lingual and palatal surfaces of premolars and molars and a white colouration following Retzius striae visible in the permanent incisors (figure 2A, B). Her mother's dentition, in contrast, shows more discrete signs of AI and fewer pits are visible on the buccal surfaces of premolars (figure 2C, D). Digenic mutations in LAMB3 and COL17A1 that modify the severity of the EB phenotype have been previously reported.<sup>87</sup> However, this is the first report of seemingly digenic inheritance in ADAI.

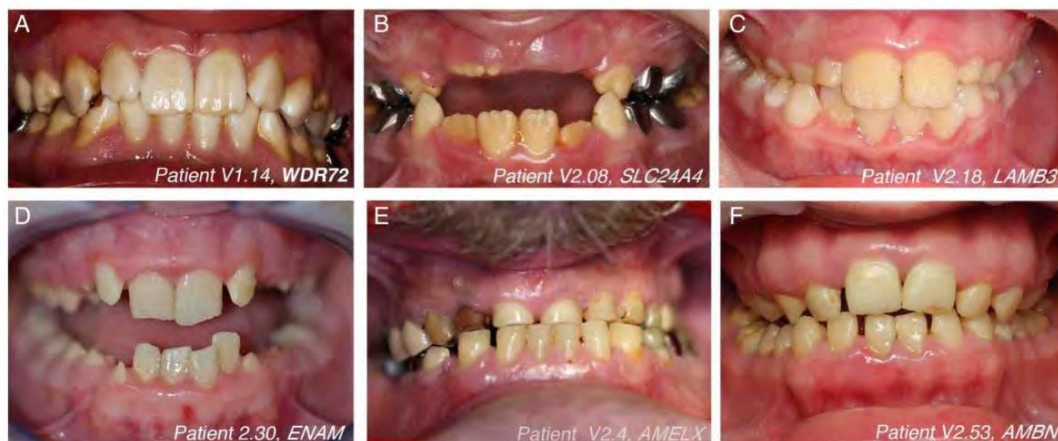
## Methods

**Figure 1** Distribution of pathogenic variants identified by disease category. The genes in which pathogenic mutations were identified are shown with respect to the disease in which they were identified. In parentheses next to each gene is the number of independent patients in whom mutations were identified in the gene. This figure includes results from patients V1.09–V1.16 and V2.01–V2.95. DD dentin dysplasia; DGI, dentinogenesis imperfecta; STHAG selective tooth agenesis.



**Figure 2** *COL17A1* mutations show a characteristic enamel phenotype in autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. (A–H) Photos of the enamel phenotypes of individuals with *COL17A1* mutations. (A, B) Patient V2.82. (C, D) Mother of patient V2.82. (E, F) Patient V2.09. (G, H) Patient V2.48. Arrows mark pits in the enamel that are characteristic of *COL17A1* mutations. Extrinsic colouration makes these pits more visible in (B), (E) and (H). (I) Seemingly digenic inheritance of amelogenesis imperfecta in patient V2.82. Asterisks on the sequence chromatograms mark the mutated nucleotides.





**Figure 3** The variety of isolated amelogenesis imperfecta phenotypes seen in this cohort. Representative images of the enamel phenotype associated with mutations in different genes. The mutated gene and patient number are indicated in each panel.

We also identified a family with a novel homozygous splice-site mutation (c.532-1G>C) in *AMBN*. To date, only a single family has been reported to carry mutations in this gene.<sup>27</sup> Similar to the patients in the initial study, our patient too exhibited hypoplastic AI with very limited enamel as seen in the unrestored yellow-tinged premolars and permanent molars. However, the tooth surfaces did not seem as pitted as described previously (figure 3F).<sup>27</sup> This mutation is predicted to alter mRNA splicing by inducing either the skipping of exon 7 or the retention of intron 6. Exon skipping would lead to in-frame deletion of exon 7, which encodes a domain involved in heparin and fibronectin interaction that is thought to be important for the interaction of *AMBN* with dental epithelial cells.<sup>88 89</sup> Intron retention would introduce a PTC that is likely to cause NMD of the mRNA. Additionally, a cryptic acceptor splice-site is predicted bioinformatically to be activated in exon 7 that would cause partial out-of-frame skipping of exon 7 and a subsequent PTC (see online supplementary figure S11). Thus, this mutation is predicted to cause at least a partial loss of *AMBN* function. We also identified novel mutations in *WDR72*, *AMELX* and *ENAM*, and a known deletion of the last three exons of *SLC24A4* (table 1). Representative images of the enamel phenotype associated with mutations in each gene are shown in figure 3. Similar to previous reports, *WDR72* and *SLC24A4* mutations caused hypomineralised, hypomature AI with brownish/yellowish discoloured teeth.<sup>22 29</sup> The enamel showed a lack of contrast with the underlying dentin upon X-ray imaging (data not shown). The softer enamel seen in the patient with *WDR72* mutations was subject to wear, whereas the enamel in the patient with the *SLC24A4* mutation was opaque. Patients with *AMELX*, *LAMB3* and *ENAM* mutations had hypoplastic AI with yellow discoloration and smaller teeth due to thinner enamel.

Interestingly, we identified a novel homozygous missense mutation (p.V499M) in *CNNM4* in patient V2.05 who was born to first-cousins and was referred for isolated AI. This mutation affects a highly conserved residue in a functional cystathionine beta-synthase domain of the protein and is predicted bioinformatically by three algorithms (SIFT, PolyPhen and MutationTaster) to be deleterious (see online supplementary figure S2). However, mutations in this gene are known to cause Jalili syndrome, which is characterised by a combination of AI and cone-rod dystrophy.<sup>33 90</sup> A subsequent full-field

electroretinography revealed a marked loss of cone response and a less severe loss of rod response in the patient, thus confirming the Jalili phenotype (see online supplementary figure S2E, F).

#### Syndromic AI

We confirmed the molecular diagnosis in one case of Enamel Renal Syndrome (patient V2.06). This patient was homozygous for a novel frameshift-inducing deletion in *FAM20A* (c.1106\_1107del).

In patient V2.15, referred for the management of AI in the context of suspected spondyloepiphyseal dysplasia (SED), we identified a known pathogenic missense mutation (p.T312S) and a likely pathogenic intronic variant (c.121-31) in *GALNS* (mutated in mucopolysaccharidosis (MPS) IVA) predicted to create an intronic splice enhancer (see online supplementary figure S42). However, the biological effect of this intronic mutation warrants further investigation. No deleterious mutations were identified in *CHST3* or *COL2A1* and a differential diagnosis of mucopolysaccharidosis type III was eliminated due to normal hexosaminidase, alpha-L-fucosidase and beta-D-glucuronidase levels (data not shown). Similar clinical presentation of SED and MPS IVA has been previously demonstrated,<sup>91</sup> therefore, our results suggest a potential differential diagnosis of MPS IVA in this patient. In the case of patient V2.49, referred for the management of AI linked to MPS IVA,<sup>92 93</sup> we identified only a single de novo known pathogenic mutation in *GALNS* (p.R386C), suggesting the presence of a second mutation in intronic or regulatory regions, or a structural mutation missed by our pipeline. The presence of an undetected second mutation is consistent with the virtually absent *GALNS* activity in the patient's leucocytes (1 nmol/h/mg protein) (data not shown). Both these patients exhibited hypoplastic AI with thin striated and pitted enamel and subsequently flattened buccal surfaces (see online supplementary figure S45) consistent with previous reports of the enamel phenotype seen in MPS IVA,<sup>94</sup> further supporting a diagnosis of MPS IVA in both patients. However, additional tests are necessary to confirm this diagnosis.

#### Isolated and syndromic STHAG

We identified the causative mutation in 15/21 (71%) cases of isolated STHAG. The majority carried mutations in *WNT10A* either in a heterozygous, homozygous or compound



## Methods

heterozygous state as has been previously reported.<sup>77–79</sup> Fortuitously, we were also able to provide a molecular diagnosis for a patient presenting with ID who was referred for the management of hypodontia. The patient (V2.87) had agenesis of five incisors, two maxillary incisors and three mandibular permanent incisors (agenesis 12, 22, 41, 31 and 32) and had no family history of hypodontia or ID. We identified a novel heterozygous nonsense mutation in *CTNNB1* (p.Tyr333\*), which encodes beta-catenin, a member of the WNT signalling pathway, which is essential during multiple stages of tooth development.<sup>95</sup> Recent reports have established a role for heterozygous *CTNNB1* mutations in ID characterised by mild to severe ID, autism spectrum disorder childhood hypotonia with progressive spastic diplegia, microcephaly and significant additional craniofacial and brain abnormalities, which is compatible with this patient's phenotype (data not shown).<sup>96–97</sup> However, the orodental phenotype in this syndrome has not been studied in detail. Our report suggests that patients with ID due to *CTNNB1* mutations may require a dental examination and management of hypodontia. Furthermore, this case highlights the benefit of an interdisciplinary approach to patient care and the potential utility of a full dental examination in syndromes with craniofacial involvement.

### Dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia

Among the six independent cases of isolated dentin disorders, we identified the causative mutation in five. All patients carried mutations in *DSPP*, the only gene implicated thus far in isolated DD/DGI.<sup>2</sup> The majority of mutations were present in the repeat-rich exon 5 that is often refractory to Sanger sequencing and hence until now excluded from routine diagnostic sequencing.<sup>98</sup> We achieved an average coverage of 771× and 408× over exon 5 of *DSPP* with v1.0 and v2.0, respectively. Hence, our assay provides an effective means to screen for mutations in the last exon of *DSPP*. Our bioinformatic pipeline detected the majority of mutations; however, one mutation (c.3682\_3686del) was missed due to the difficulty of calling variants in structurally complex regions (personal communication, MKP, Broad Institute GATK Team), but was detected upon visual inspection of the reads. We also identified a novel frameshift-inducing deletion in *COL1A1* in a family segregating AD osteogenesis imperfecta with DGI.

### Otodental dysplasia

We identified a heterozygous deletion of the first exon of *FGF3* in a family segregating suspected AD otodental dysplasia, which is characterised by globodontia and hearing loss, sometimes segregating with colobomas, most likely due to the deletion of the adjacent *FADD* gene.<sup>99</sup> This deletion was validated by qPCR on genomic DNA, which showed the presence of the deletion in patient V2.03 as well as in his affected father (see online supplementary figure S38).

## DISCUSSION

We have developed a targeted NGS assay for the diagnosis and discovery of mutations underlying rare genetic disorders with orodental manifestations. We achieved high sequencing coverage in the targeted regions, 179× average coverage with 97.2% of the targeted region covered at  $\geq 20\times$  with V2.0. In a cohort of 101 unrelated patients with a variety of orodental genetic disorders of unknown genetic aetiology, we were able to detect the underlying pathogenic mutation in 39 cases (39%) in known genes.

Targeted NGS gene panels are being widely used for the diagnosis of a variety of genetic disorders, including ID, mitochondrial disorders and neuromuscular diseases.<sup>42–44</sup> However, to the best of our knowledge, this is the first report of a targeted NGS gene panel for orodental disorders. Therefore, this diagnostic tool responds to a veritable need within the dental genetics community. Furthermore, two concrete examples from our cohort suggest the utility of this tool to the wider medical genetics community. First, we were able to diagnose a mutation in *CTNNB1* in a patient with ID and tooth agenesis, suggesting the potential utility of our assay in screening for mutations in ID cases with orodental involvement. Second, the detection of a *CNNM4* mutation in a patient referred for isolated AI led to an ophthalmological investigation for cone-rod dystrophy and the confirmation of Jalili syndrome. These cases highlight how the oral consultation can be a port of entry for the diagnosis and management of patients with rare genetic diseases, especially in light of the involvement of the same genes in syndromic and isolated forms of orodental disease and the sometimes non-evident extra-oral signs associated with some diseases.

Our targeted NGS panel targets fewer genes than WES/WGS and may thus exclude potential disease-causing genes. Yet, it has several advantages in a clinical setting. First, it provides higher sequencing coverage in the targeted regions than WES/WGS. A comparison of the coverage of the same regions achieved with v2.0 of our gene panel and a commercially available WES kit demonstrates that the coverage from WES falls short of the requirements for confident molecular diagnosis, that is, only 89.09% of targets covered at  $\geq 20\times$  with WES vs 97.23% of targets covered at  $\geq 20\times$  with our panel (see online supplementary figure S46 and table S8). Second, due to the smaller number of variants identified by targeted sequencing (~2600 variants with our panel vs ~30 000 with WES), variant interpretation is relatively simpler. This is also true for CNVs—we were able to detect and validate a single exon deletion in *FGF3*. Finally, the cost, amount of time for data analysis and interpretation, and data storage requirements are lower with targeted NGS than with WES/WGS approaches, making it an attractive alternative for clinical implementation. Alternatively, our assay could serve as a primary mutation-screening tool to exclude mutations in known genes before performing WES/WGS.

We expected that the inclusion of candidate genes selected based on their expression in developing mouse teeth<sup>50</sup> and their implication in animal models of orodental disorders would permit the identification of novel genes mutated in these disorders. In order to identify potentially novel genes in patients lacking mutations in known genes, we performed a preliminary analysis focusing on rare loss-of-function variants (nonsense, invariant splice site and frameshift variants) that were present in the same gene in at least two independent families with the same phenotype. Such a strategy was previously used successfully to identify a novel gene, *SETD5*, in ID.<sup>100</sup> However, this preliminary analysis did not yield any positive findings. Indeed, this analysis was limited in that it did not consider missense mutations whose effect is less clear and was complicated by the lack of information regarding the mode of inheritance in the majority of cases. Also, in this analysis patients were regrouped by disease category (all mutation-negative AI patients, all mutation-negative STHAG patients) without subclassification based on fine phenotype (eg, hypoplastic vs hypomineralised AI and severity of STHAG), which may be important to include in order to overcome the difficulties posed by genetic heterogeneity.<sup>101</sup> Furthermore, the rarity of mutations in some genes may also necessitate much larger cohorts. Indeed, future analyses of this cohort will try to address these limitations.



Among the 50 unrelated patients with confirmed isolated AI in our cohort, we had a molecular diagnosis rate of 27%. This is slightly lower than the diagnostic rates reported by other studies that performed candidate gene sequencing in large AI cohorts. By performing Sanger sequencing of six genes (*FAM83H*, *ENAM*, *AMELX*, *MMP20*, *KLK4* and *WDR72*) in 71 families, Wright *et al*<sup>75</sup> identified mutations in 26 families (37%). By sequencing the same six genes in an independent cohort of 39 AI kindreds, Chan *et al*<sup>102</sup> identified mutations in 19 kindreds (49%). In the latter study, the diagnostic rate was shown to be dependent on the mode of transmission: X-linked>AD>AR>simplex cases. In our study, the majority of cases were simplex cases (31 cases), which may explain to a degree our lower diagnostic rate despite the inclusion of a larger number of known AI genes. Furthermore, the 50 patients selected for this study belong to a larger AI cohort of 71 patients, a part of which (including patients in this study) had been previously sequenced by candidate gene Sanger sequencing and in which mutations were identified in 11 patients<sup>103</sup> (online supplementary table S3 and unpublished data). Therefore, the overall diagnostic rate in the 71-patient cohort is 35% (25 patients), which is closer to published diagnostic rates. In further contrast to the above-mentioned studies where *FAM83H* was the most frequently mutated gene in ADAI, *COL17A1* was the most frequently mutated gene in ADAI in our cohort, with 8% of our AI cohort carrying deleterious mutations in *COL17A1*. Additionally, we demonstrate that the presence of unlinked mutations in *COL17A1* and *LAMA3* can modify the severity of AI, suggesting a digenic mode of AI inheritance associated with mutations in the hemidesmosomal components. Therefore, our findings are novel in demonstrating the frequency of *COL17A1* mutations in ADAI. Finally, the large number of AI patients without mutations in known genes suggests that the genetic and allelic heterogeneity underlying AI is yet to be fully unravelled.

The diagnostic rate in syndromic AI was low in our cohort (7%). This is likely because of the inclusion of patients without a clear clinical diagnosis. These cases likely represent novel phenotypes with mutations in novel genes. Thus, WES may be better suited for such cases. Yet, the identification of a single de novo pathogenic mutation in *GALNS* in patient V2.49 can inform genetic counselling in this family. Similarly, the identification of one pathogenic and one potentially pathogenic mutation in *GALNS* in patient V2.15 permits an evidence-based investigation of MPS IVA by assaying leucocyte *GALNS* activity.<sup>104</sup> Therefore, although sequencing did not provide a definitive molecular diagnosis in these cases, the results of this assay can contribute to orienting clinical investigations/counselling.

Among the 21 cases of isolated STHAG, we identified the causative mutation in 15 (71%). This diagnostic rate is comparable to that reported in the literature. By screening *WNT10A*, *MSX1*, *PAX9*, *IRF6* and *AXIN2* by Sanger sequencing in 34 patients with isolated hypodontia, van den Boogaard *et al*<sup>77</sup> were able to identify the underlying mutation in 71% of cases. Similar to other reports, *WNT10A* accounted for the majority of mutations in our cohort (52%) and were also associated with ectodermal dysplasia (patient V2.54), with F228I, similar to other reports, being the most commonly mutated allele in our cohort, consistent with its population frequency (2.4% in European-Americans) and the prevalence of STHAG in this population (4.2%).<sup>77–79 105 106</sup>

In conclusion, we have developed the first targeted NGS gene panel for the diagnosis and discovery of mutations in genetic disorders with orodental involvement. This panel can be reliably

used for the molecular diagnosis in known genes of a variety of genetic disorders and can serve as a primary screening tool before the application of WES/WGS. Additionally, this panel also provides the potential for the discovery of novel genes mutated in orodental disorders.

#### Author affiliations

- <sup>1</sup>Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM U1112, Institut de génétique médicale d'Alsace, FMST, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
- <sup>2</sup>Plateforme de Biopuces et Séquençage, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire and Cellulaire-Centre Européen de Recherche en Biologie et en Médecine, CNRS UMR7104, INSERM U964, Université de Strasbourg, Illkirch, France
- <sup>3</sup>Centre de Référence des Manifestations Odontologiques des Maladies Rares, Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), Strasbourg, France
- <sup>4</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
- <sup>5</sup>Evolution et Développement du Squelette-EDS, UMR7138-SAE, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
- <sup>6</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire and Cellulaire-Centre Européen de Recherche en Biologie et en Médecine, CNRS UMR7104, INSERM U964 Université de Strasbourg, Illkirch, France
- <sup>7</sup>Faculté de Médecine, CHU de Nancy, Université de Lorraine, Vandoeuvre-Les-Nancy, France
- <sup>8</sup>CHU de Nancy, Service d'Odontologie, Nancy, France
- <sup>9</sup>Département d'Odontologie Pédiatrique, UFR d'Odontologie, Université de Nice Sophia-Antipolis, CHU de Nice, Nice, France
- <sup>10</sup>URB2i—EA 4462, Paris Descartes, Paris, France
- <sup>11</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Département d'Odontologie Pédiatrique, CHU Hotel Dieu, Service d'odontologie conservatrice et pédiatrique, Nantes, France
- <sup>12</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Département d'Odontologie Pédiatrique, Université Paris Descartes, Montrouge, France
- <sup>13</sup>Institute of Human Genetics, Heidelberg University, Heidelberg, Germany
- <sup>14</sup>Service de Consultations et Traitements Dentaires, Hospices Civils de Lyon, Faculté d'Odontologie, Université Claude Bernard Lyon1, Lyon, France
- <sup>15</sup>Service de Génétique Clinique, CHU de Rennes, Rennes, France
- <sup>16</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, CHU de Toulouse, Odontologie Pédiatrique, Université Paul Sabatier, Toulouse, France
- <sup>17</sup>Unité Fonctionnelle d'Odontologie pédiatrique, Service d'odontologie, CHRU de Lille, Lille, France
- <sup>18</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Service d'Odontologie Conservatrice et Endodontie, CHU Nantes, Université de Nantes, France
- <sup>19</sup>Service de Génétique, CHU Tours, Tours, France
- <sup>20</sup>Département d'Odontologie Pédiatrique, Université de Nice Sophia-Antipolis, CHU Nice, Nice, France
- <sup>21</sup>Service de Génétique Médicale, CHU Nice, Nice, France
- <sup>22</sup>Pôle de Médecine et de Chirurgie Bucco-dentaire, Hôpital Civil, HUS, Strasbourg, France
- <sup>23</sup>Faculty of Dental Medicine, Department of Pediatric Dentistry, University Mohammed V Rabat, Morocco
- <sup>24</sup>Pédiatrie 1, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France
- <sup>25</sup>Département de Pédiatrie, CHU de Lyon, Lyon, France
- <sup>26</sup>Service de génétique clinique Guy Fontaine, Centre Hospitalier Régionale Universitaire (CHRU) de Lille, Lille, France
- <sup>27</sup>Service de Génétique Médicale, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France
- <sup>28</sup>Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Universitäts Klinikum, Freiburg, Germany
- <sup>29</sup>Service de Génétique, Centre Hospitalier de Mulhouse, Mulhouse, France
- <sup>30</sup>Laboratoire de Physiopathologie Orale Moléculaire INSERM UMR 51138, Centre de Recherche des Cordeliers, Universités Paris-Diderot et Paris-Descartes, Paris, France
- <sup>31</sup>Centre de Référence des Malformations Rares de la Face et de la Cavité Buccale MAFACE, Hôpital Rothschild, Pôle d'Odontologie, Paris, France
- <sup>32</sup>Aix-Marseille Université, UMR 7268 ADES/EFS/CNRS, APHM, Hôpital Timone, Service Odontologie, Marseille, France
- <sup>33</sup>Service de Génétique Médicale, Centre de Référence pour les Affections Rares en Génétique Ophtalmologique, HUS, Strasbourg, France

**Acknowledgements** The authors would like to thank all patients and their families for participating in this study. They also thank Ms Vanessa Stoehr for administrative help, Dr Mathilde Huckert and Jorel Salomon for technical assistance, Drs Elise Schaefer and Sophie Scheidecker for help with obtaining clinical data, and Dr Yaumara Perdomo-Trujillo for the electroretinography examination. They would like to thank Drs Alain Verloes, Jean-Yves Sire, Jean-Pierre Clavert, Béatrice Walter, Patrick Lutz, André Nirrengarten, Isabelle Rian, Thibault Sibert, Laurence Lustig-Grimm, Daniel Jasiak, James Lespinasse, Jacques Hassid, Smail Hadj-Rabia, Gabriel Dominici, Laurent Riguet, Dan Lipsker, Jean Luc Alessandri, Florence Rousselet, Philippe Schoenlaub, François Serres, Etienne Mornet, Thomas Edouard,



## Methods

Bertrand Baumann, Klaus Dietrich, Yves Bolender, Sandra Mercier, Elisabeth Steichen-Gersdorf, Jean-Gabriel Chillès, Hadrien Bonomi Dunoyer, Philippe Jonveaux, Supawich Morkumed, Patimaporn Pungchanchaikul, Sameh Mabrouk, Noora Zouari, Ilhame Mamouni, Alicia Rossa, Caroline Delfosse, Sylvie Goldmann, Esther Levy, Pierre Wahl, Jean-Claude Schoeffler, François Charton, Pascale Meng, Pierre-Emile Spaeth, Marie-Claude Addor, Rene Serfaty, Anthony Kurtz, Renaud Rinkenbach, Alain Duret, Jehan Figier, Denys Chaigne, Marc Hildwein, Florence Jouanet, Olivier Grison, Marie-Noelle Duffard, Gautier Jouvenet Gilquin, François Undreiner, Gabrielle Bayer, Isabelle Zumsteeg, Cloé Vorpahl, Alain Burtcher, Michel Kretz, Cyrielle Marc, Jean-Pierre Strauss, Elise Pilavayn, Pierre Bonnaure, and Celine Benarroch-Leininger, Rémy Mathis, William Bacon, Marie-Rose Javier, Bilal Ahmed and Elia Sfeir for referring patients. Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the 'France Génomique' consortium (ANR-10-INBS-0009).

**Contributors** Study concept and design: MKP, HD and AB-Z. Patient inclusion: MS, BL, DD, AD, AL, BG, MM-B, SLC, MM, SJ, FO, VV, J-LD, TD-B, A-SK, UM, BR, J-JM, J-PD, SO, IB-F, MMR, LM, AT, CJ, FG, J-CD, AC, MEA, SL, SS, NG, AD, BD, SF, EG, BF, MDM, YA, CT, FC, AB, MCM, HD and AB-Z. Data generation, analysis and interpretation: MKP, VG, SV, BJ, MD, SLG, VL-H, BG, MP, CS and AB-Z. Drafting of the manuscript: MKP and AB-Z. Critical reading of the manuscript: UM, AB and HD.

**Funding** This work was supported by grants from the French Ministry of Health (National Program for Clinical Research, PHRC 2008 N°4266 Amelogenesis imperfecta), the University Hospital of Strasbourg (API, 2009–2012, 'Development of the oral cavity: from gene to clinical phenotype in Human') and the EU-funded project (ERDF) A27 'Oro-dental manifestations of rare diseases,' supported by the RMT-TMO Offensive Sciences initiative, INTERREG IV Upper Rhine programme. <http://www.genosmile.eu>

**Competing interests** None declared.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** French Ministry of Higher Education and Research (MESR).

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Data sharing statement** All PCR primers and protocols are available upon request from the corresponding author.

**Open Access** This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## REFERENCES

- 1 Polder BJ, Van't Hof MA, Van Der Linden FP, Kuijpers-Jagtman AM. A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004;32:217–26.
- 2 de La Dure-Molla M, Philippe Fournier B, Berdal A. Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: revision of the classification. *Eur J Hum Genet* 2015;23:445–51.
- 3 Brook AH. A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size. *Arch Oral Biol* 1984;29:373–8.
- 4 Brook AH, Smith JM. The aetiology of developmental defects of enamel: a prevalence and family study in East London, UK. *Connect Tissue Res* 1998;39:151–6; discussion 87–94.
- 5 Alaluusua S, Lukinmaa PL. Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds—a review. *Int Dent J* 2006;56:323–31.
- 6 Koch G. Prevalence of enamel mineralisation disturbances in an area with 1–1.2 ppm F in drinking water. Review and summary of a report published in Sweden in 1981. *Eur J Paediatr Dent* 2003;4:127–8.
- 7 Bloch-Zupan A, Sedano H, Scully C. *Dento/oro/craniofacial anomalies and genetics*. 1st edn. Boston, MA: Elsevier, 2012.
- 8 Cobourne MT, Sharpe PT. Diseases of the tooth: the genetic and molecular basis of inherited anomalies affecting the dentition. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2013;2:183–212.
- 9 Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:17.
- 10 Hennekam RCM, Allanson JE, Krantz ID, Gorlin RJ. *Gorlin's syndromes of the head and neck*. 5th edn. Oxford; New York: Oxford University Press, 2010.
- 11 Bergendal B, Klar J, Stecksén-Blicks C, Norderyd J, Dahl N. Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD, AXIN2, MSX1, and PAX9 genes. *Am J Med Genet A* 2011;155A:1616–22.
- 12 Lammi L, Arte S, Somer M, Järvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *Am J Hum Genet* 2004;74:1043–50.
- 13 Noor A, Windpassinger C, Vitcu I, Orlic M, Arshad Rafiq M, Khalid M, Nasir Malik M, Ayub M, Alman B, Vincent JB. Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF-beta binding protein 3. *Am J Hum Genet* 2009;84:519–23.
- 14 Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 2000;24:18–19.
- 15 Tao R, Jin B, Guo SZ, Qing W, Feng GY, Brooks DG, Liu L, Xu J, Li T, Yan Y, He L. A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia. *J Hum Genet* 2006;51:498–502.
- 16 Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996;13:417–21.
- 17 Monreal AW, Zonana J, Ferguson B. Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations. *Am J Hum Genet* 1998;63:380–9.
- 18 Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S, Bal E, Chassaing N, Vincent M-C, Viot G, Clauss F, Manière M-C, Toupenay S, Le Merrer M, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Falvre L, De Prost Y, Munnich A, Bonnefont J-P, Bodemer C, Smahi A. Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases. *Hum Mutat* 2011;32:70–2.
- 19 Jumlongras D, Bei M, Stimson JM, Wang W-F, Depalma SR, Seidman CE, Felbor U, Maas R, Seidman JG, Olsen BR. A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. *Am J Hum Genet* 2001;69:67–74.
- 20 Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeck PA, Zonana J. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat Genet* 1999;22:366–9.
- 21 Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 2001;10:1673–7.
- 22 El-Sayed W, Parry DA, Shore RC, Ahmed M, Jafri H, Rashid Y, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal-recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2009;85:699–705.
- 23 Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, Wright JT. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2004;41:545–9.
- 24 Lagerström M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Bäckman B, Landegren U, Pettersson U. A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics* 1991;10:971–4.
- 25 Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, Hu JC. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet* 2005;42:271–5.
- 26 Kim JW, Lee SK, Lee ZH, Park J-C, Lee K-E, Lee M-H, Park J-T, Seo B-M, Hu J-C-C, Simmer JP. FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2008;82:489–94.
- 27 Poulter JA, Murillo G, Brookes SJ, Smith CEL, Parry DA, Silva S, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 2014;23:5317–24.
- 28 Poulter JA, Brookes SJ, Shore RC, Smith CEL, Abi Farraj I, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. A missense mutation in ITGB6 causes pitted hypomineralized amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 2014;23:2189–97.
- 29 Parry DA, Poulter JA, Logan CV, Brookes SJ, Jafri H, Ferguson CH, Anwari BM, Rashid Y, Zhao H, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ. Identification of mutations in SLC24A4, encoding a potassium-dependent sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2013;92:307–12.
- 30 Parry DA, Brookes SJ, Logan CV, Poulter JA, El-Sayed W, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Sayed J, Raif EM, Shore RC, Dashash M, Barron M, Morgan JE, Carr IM, Taylor GR, Johnson CA, Aldred MJ, Dixon MJ, Wright JT, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. Mutations in C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2012;91:565–71.
- 31 Huckert M, Stoetzel C, Morkmued S, Laugel-Haushalter V, Geoffroy V, Muller J, Clauss F, Prasad MK, Obry F, Raymond JL, Switala M, Alembik Y, Soskin S, Mathieu E, Hemmerle J, Weickert J-L, Dabovic BB, Rifkin DB, Dheedene A, Boudin E, Caluserio O, Cholette M-C, Mcleod R, Antequera R, Gelle M-P, Coeuriot J-L, Jacquelin L-F, Bailleul-Forestier I, Maniere M-C, Van Hul W, Bertola D, Dolle P, Verloes A, Mortier G, Dollfus H, Bloch-Zupan A. Mutations in the Latent TGF-beta Binding Protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet* 2015;24:3038–49.
- 32 O'Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, Urquhart JE, Barron MJ, Bhaskar SS, Martelli-Júnior H, dos Santos Neto PE, Mansilla MA, Murray JC, Coletta RD, Black GCM, Dixon MJ. Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome. *Am J Hum Genet* 2011;88:616–20.
- 33 Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, Bloch-Zupan A, Carlos R, Carr IM, Downey LM, Blain KM, Mansfield DC, Shahabi M, Heidari M,



- Aref P, Abbasi M, Michaelides M, Moore AT, Kirkham J, Inglehearn CF. Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2009;84:266–73.
- 34 Schossig A, Wolf NI, Fischer C, Fischer M, Stocker G, Pabinger S, Dander A, Steiner B, Tönz O, Kotzot D, Haberlandt E, Amberger A, Burwinkel B, Wimmer K, Fauth C, Grond-Ginsbach C, Koch MJ, Deichmann A, von Kalle C, Bartram CR, Kohlschütter A, Trajanoski Z, Zschocke J. Mutations in ROGDI Cause Kohlschütter-Tönz Syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;90:701–7.
- 35 Acevedo AC, Poulter JA, Alves PG, De Lima C, Castro L, Yamaguti P, Paula LM, Parry DA, Logan CV, Smith CEL, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ. Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations. *BMC Med Genet* 2015;16:8.
- 36 Wang S, Choi M, Richardson AS, Reid BM, Seymen F, Yildirim M, Tuna E, Gencay K, Simmer JP, Hu JC. STIM1 and SLC24A4 Are Critical for Enamel Maturation. *J Dent Res* 2014;93(7 Suppl):945–1005.
- 37 Mcgrath JA, Gatalica B, Li K, Dunnill MG, McMillan JR, Christiano AM, Eady RA, Utito J. Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication mutation in the type XVII collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition. *Am J Pathol* 1996;148:1787–96.
- 38 Poulter JA, El-Sayed W, Shore RC, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet* 2014;22:132–5.
- 39 Yuen WY, Pasmooij AM, Stellingsma C, Jonkman MF. Enamel defects in carriers of a novel LAMA3 mutation underlying epidermolysis bullosa. *Acta Derm Venereol* 2012;92:695–6.
- 40 Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu T, Escamilla M, Macdougall M. DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Am J Med Genet A* 2005;133A:138–41.
- 41 de La Dure-Molla M, Quentric M, Yamaguti PM, Acevedo A-C, Mighell AJ, Vikkula M, Huckert M, Bernal A, Bloch-Zupan A. Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:84.
- 42 Chae JH, Vasta V, Cho A, Lim BC, Zhang Q, Eun SH, Hahn SH. Utility of next generation sequencing in genetic diagnosis of early onset neuromuscular disorders. *J Med Genet* 2015;52:208–16.
- 43 DaRe JT, Vasta V, Penn J, Tran NT, Hahn SH. Targeted exome sequencing for mitochondrial disorders reveals high genetic heterogeneity. *BMC Med Genet* 2013;14:118.
- 44 Redin C, Gérard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, Masurel-Paulet A, Willems M, Lesca G, El-Chehadeh S, Le Gras S, Vicaire S, Philipps M, Dumas M, Geoffroy V, Feger C, Haumesser N, Alembik Y, Barth M, Bonneau D, Colin E, Dollfus H, Doray B, Delrue M-A, Drouin-Garraud V, Flori E, Fradin M, Francannet C, Goldenberg A, Lumbroso S, Mathieu-Dramard M, Martin-Coignard D, Lacombe D, Morin G, Poige A, Sukno S, Thauvin-Robinet C, Thevenon J, Doco-Fenzy M, Genevieve D, Sarda P, Ederly P, Isidor B, Jost B, Olivier-Faivre L, Mandel J-L, Piton A. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* 2014;51:724–36.
- 45 Redin C, Le Gras S, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent M-C, Chiurazzi P, Lacombe D, Ouertani I, Petit F, Till M, Verloes A, Jost B, Chaabouni HB, Dollfus H, Mandel J-L, Muller J. Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alström syndromes. *J Med Genet* 2012;49:502–12.
- 46 Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola J, Scherer S, Scheetz TE, Smith RJH. Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:21104–9.
- 47 Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. *Nat Rev Genet* 2013;14:295–300.
- 48 Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE, Mouse Genome Database G. The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Res* 2015;43(Database issue):D726–36.
- 49 Bradford Y, Conlin T, Dunn N, Fashena D, Frazer K, Howe DG, Knight J, Mani P, Martin R, Moxon SAT, Paddock H, Pich C, Ramachandran S, Ruef BJ, Ruzicka L, Bauer Schaper H, Schaper K, Shao X, Singer A, Sprague J, Sprunger B, Van Slyke C, Westerfield M. ZFIN: enhancements and updates to the Zebrafish Model Organism Database. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D822–9.
- 50 Laugel-Haushalter V, Paschaki M, Thibault-Carpentier C, Dembelé D, Dollé P, Bloch-Zupan A. Molars and incisors: show your microarray IDs. *BMC Res Notes* 2013;6:113.
- 51 Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010;26:589–95.
- 52 DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, Del Angel G, Rivas MA, Hanna M, McKenna A, Fennell TJ, Kernysky AM, Sivachenko AY, Cibulskis K, Gabriel SB, Altshuler D, Daly MJ. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet* 2011;43:491–8.
- 53 McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297–303.
- 54 Van Der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella KV, Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* 2013;11:11 10 1–11 10 33.
- 55 Cingolani P, Platts A, Wang Le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* 2012;6:80–92.
- 56 Geoffroy V, Pizot C, Redin C, Piton A, Vasli N, Stoetzel C, Blavier A, Laporte J, Muller J. VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. *PeerJ* 2015;3:e796.
- 57 Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA, 1000 Genomes Project Consortium. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56–65.
- 58 Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (accessed Feb 2015).
- 59 Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248–9.
- 60 Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009;4:1073–81.
- 61 Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014;11:361–2.
- 62 Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3568–71.
- 63 Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e67.
- 64 Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 2002;297:1007–13.
- 65 Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res* 2001;29:1185–90.
- 66 Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997;4:311–23.
- 67 Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 2004;11:377–94.
- 68 Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, Lyon E, Ward BE. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: revisions 2007. *Genet Med* 2008;10:294–300.
- 69 Kravtsov Y, Nekhaeva E, Chang C, Ebralidze K, Khrapko K. Analysis of somatic mutations via long-distance single molecule PCR. *DNA Amplif* 2004;97–110.
- 70 Ruano G, Kidd KK, Stephens JC. Haplotype of multiple polymorphisms resolved by enzymatic amplification of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6296–300.
- 71 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- 72 Seymen F, Lee KE, Tran Le CG, Yildirim M, Gencay K, Lee ZH, Kim J-W. Exonal deletion of SLC24A4 causes hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2014;93:366–70.
- 73 Darling TN, Mcgrath JA, Yee C, Gatalica B, Hametner R, Bauer JW, Pöhla-Gubo G, Christiano AM, Utito J, Hintner H, Yancey KB. Premature termination codons are present on both alleles of the bullous pemphigoid antigen 2/type XVII collagen gene in five Austrian families with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1997;108:463–8.
- 74 Mcgrath JA, Pulkkinen L, Christiano AM, Leigh IM, Eady RA, Utito J. Altered laminin 5 expression due to mutations in the gene encoding the beta3 chain (LAMB3) in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 1995;104:467–74.
- 75 Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, Hart PS, Hart TC. Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families. *Cells Tissues Organs* 2011;194:279–83.
- 76 Lee SK, Hu JC, Bartlett JD, Lee K-E, Lin BP-J, Simmer JP, Kim J-W. Mutational spectrum of FAM83H: the C-terminal portion is required for tooth enamel calcification. *Hum Mutat* 2008;29:E95–9.
- 77 van den Boogaard MJ, Créton M, Bronkhorst Y, Van Der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, Cune M, Ploos Van Amstel HK. Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases. *J Med Genet* 2012;49:327–31.
- 78 Bohring A, Stamm T, Spaich C, Haase C, Spree K, Hehr U, Hoffmann M, Ledig S, Sel S, Wieacker P, Röpke A. WNT10A mutations are a frequent cause of a broad spectrum of ectodermal dysplasias with sex-biased manifestation pattern in heterozygotes. *Am J Hum Genet* 2009;85:97–105.



## Methods

- 79 Plaisancié J, Bailleul-Forestier I, Gaston V, Vaysse F, Lacombe D, Holder-Espinasse M, Abramowicz M, Coubes C, Plessis G, Faivre L, Demeer B, Vincent-Delorme C, Dollfus H, Sigaudy S, Guillén-Navarro E, Verloes A, Jonveaux P, Martin-Coignard D, Colin E, Bieth E, Calvas P, Chassaing N. Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A* 2013;161:671–8.
- 80 Xiao S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L, Fu G, Qian M, Yang J, Shi Y, Hu L, Han B, Wang Z, Huang W, Liu J, Chen Z, Zhao G, Kong X. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet* 2001;27:201–4.
- 81 Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H, Huang S. Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. *J Hum Genet* 2010;55:534–40.
- 82 Cho SH, Seymen F, Lee KE, Lee S-K, Kweon Y-S, Kim KJ, Jung S-E, Song SJ, Yildirim M, Bayram M, Tuna EB, Gencay K, Kim J-W. Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Hum Mutat* 2012;33:91–4.
- 83 Kivirikko S, McGrath JA, Pulkkinen L, Uitto J, Christiano AM. Mutational hotspots in the LAMB3 gene in the lethal (Herlitz) type of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Mol Genet* 1996;5:231–7.
- 84 Ogawa T, Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A, Rezvi GMM, Sukegawa K, Kondo N, Suzuki Y, Shimozawa N, Orii T. Mucopolysaccharidosis IVA: screening and identification of mutations of the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene. *Hum Mol Genet* 1995;4:341–9.
- 85 Pasmooij AM, Pas HH, Jansen GH, Lemmink HH, Jonkman MF. Localized and generalized forms of blistering in junctional epidermolysis bullosa due to COL17A1 mutations in the Netherlands. *Br J Dermatol* 2007;156:861–70.
- 86 Murrell DF, Pasmooij AM, Pas HH, Marr P, Klingberg S, Pfendner E, Uitto J, Sadowski S, Collins F, Widmer R, Jonkman MF. Retrospective diagnosis of fatal BP180-deficient non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa suggested by immunofluorescence (IF) antigen-mapping of parental carriers bearing enamel defects. *J Invest Dermatol* 2007;127:1772–5.
- 87 Floeth M, Bruckner-Tuderman L. Digenic junctional epidermolysis bullosa: mutations in COL17A1 and LAMB3 genes. *Am J Hum Genet* 1999;65:1530–7.
- 88 Beyeler M, Schild C, Lutz R, Chiquet M, Trueb B. Identification of a fibronectin interaction site in the extracellular matrix protein ameloblastin. *Exp Cell Res* 2010;316:1202–12.
- 89 Zhang X, Diekwisch TG, Luan X. Structure and function of ameloblastin as an extracellular matrix protein: adhesion, calcium binding, and CD63 interaction in human and mouse. *Eur J Oral Sci* 2011;119(Suppl 1):270–9.
- 90 Polok B, Escher P, Ambresin A, Chouery E, Bolay S, Meunier I, Nan F, Hamel C, Munier FL, Thilo B, Mégarbané A, Schorderet DF. Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2009;84:259–65.
- 91 Mendelsohn NJ, Wood T, Olson RA, Temme R, Hale S, Zhang H, Read L, White KK. Spondyloepiphyseal dysplasias and bilateral legg-calvé-perthes disease: diagnostic considerations for mucopolysaccharidoses. *JIMD Rep* 2013;11:125–32.
- 92 Gardner DG. The dental manifestations of the Morquio syndrome (mucopolysaccharidosis type IV). A diagnostic aid. *Am J Dis Child* 1975;129:1445–8.
- 93 Levin LS, Jorgenson RJ, Salinas CF. Oral findings in the Morquio syndrome (mucopolysaccharidosis IV). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975;39:390–5.
- 94 Rølling I, Clausen N, Nyvad B, Sindet-Pedersen S. Dental findings in three siblings with Morquio's syndrome. *Int J Paediatr Dent* 1999;9:219–24.
- 95 Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, Yang SH, Lu M-M, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R, Taketo MM, Morrissey EE, Atit R, Dlugosz AA, Millar SE. Wnt/ beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol* 2008;313:210–24.
- 96 de Ligt J, Willemssen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-Van Silfhout AT, Koolen DA, De Vries P, Gillissen C, Del Rosario M, Hoischen A, Scheffer H, De Vries BBA, Brunner HG, Veltman JA, Vissers LELM. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* 2012;367:1921–9.
- 97 Tucci V, Kleefstra T, Hardy A, Heise I, Maggi S, Willemssen MH, Hilton H, Esapa C, Simon M, Buenavista M-T, McGuffin LJ, Vizzor L, Dodero L, Tsiftaris S, Romero R, Nillesen WN, Vissers LELM, Kempers MJ, Vulto-Van Silfhout AT, Iqbal Z, Orlando M, Maccione A, Lassi G, Farisello P, Contestabile A, Tinarelli F, Nieus T, Raimondi A, Greco B, Cantatore D, Gasparini L, Berdondini L, Bifone A, Gozzi A, Wells S, Nolan PM. Dominant beta-catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features. *J Clin Invest* 2014;124:1468–82.
- 98 McKnight DA, Suzanne Hart P, Hart TC, Hartfield JK, Wilson A, Wright JT, Fisher LW. A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human DSPP gene. *Hum Mutat* 2008;29:1392–404.
- 99 Gregory-Evans CY, Moosajee M, Hodges MD, Mackay DS, Game L, Vargesson N, Bloch-Zupan A, Ruschendorf F, Santos-Pinto L, Wackens G, Gregory-Evans K. SNP genome scanning localizes oto-dental syndrome to chromosome 11q13 and microdeletions at this locus implicate FGFG3 in dental and inner-ear disease and FADD in ocular coloboma. *Hum Mol Genet* 2007;16:2482–93.
- 100 Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O, Parker MJ, Archer H, Firth HV, Park S-M, Canham N, Holder SE, Wilson M, Hackett A, Field M, Floyd JAB, Hurles M, Raymond FL. De novo loss-of-function mutations in SETD5, encoding a methyltransferase in a 3p25 microdeletion syndrome critical region, cause intellectual disability. *Am J Hum Genet* 2014;94:618–24.
- 101 Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 2010;42:790–3.
- 102 Chan HC, Estrella NM, Milkovich RN, Kim JW, Simmer JP, Hu JC. Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds. *Eur J Oral Sci* 2011;119(Suppl 1):311–23.
- 103 Gasse B, Karayigit E, Mathieu E, Jung S, Garret A, Huckert M, Morkmued S, Schneider C, Vidal L, Hemmerle J, Sire J-Y, Bloch-Zupan A. Homozygous and compound heterozygous MMP20 mutations in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res* 2013;92:598–603.
- 104 Wood TC, Harvey K, Beck M, Burin MG, Chien Y-H, Church HJ, D'Almeida V, van Diggelen OP, Fietz M, Giugliani R, Harmatz P, Hawley SM, Hwu W-L, Ketteridge D, Lukacs Z, Miller N, Pasquali M, Schenone A, Thompson JN, Tylee K, Yu C, Hendriks CJ. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. *J Inherit Metab Dis* 2013;36:293–307.
- 105 Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, Nordenryd J, Dahl N. WNT10A mutations account for (1/4) of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations. *Am J Med Genet A* 2014;164A:353–9.
- 106 Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Dunin-Wilczynska I, Lianeri M, Jagodzinski PP. Nucleotide variants of genes encoding components of the Wnt signalling pathway and the risk of non-syndromic tooth agenesis. *Clin Genet* 2013;84:429–40.

**Supplementary Table 1. HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) gene symbols of genes included in the targeted next-generation sequencing assay**

<b>Genes included in the diagnostic sub-panel</b>
AIRE ALPL ALX3 AMBN AMELX AMELY AMTN ANKRD11 ANTXR1 APC ATR AXIN2 BCOR BLM BMP4 C4ORF26 CA2 CCBE1 CCDC8 CEP152 CFDP1 CHD7 CLCN7 CLDN1 CNNM4 COL17A1 COL1A1 COL1A2 COL5A1 COL5A2 COL7A1 COL9A1 COL9A2 COX7B CREBBP CRTAP CTNNB1 CTSC CTSK CUL7 CYP27B1 DLX3 DSP DSPP EDA EDAR EDARADD ELN ENAM EP300 EVC EVC2 EXT1 FAM20A FAM83H FERMT3 FGF10 FGF23 FGF3 FGF8 FGFR1 FGFR2 FGFR3 FKBP10 FOXC1 GALNT3 GAS1 GDF5 GJA1 GLA GLI2 GNAS GTF2I GTF2IRD1 IFT43 IKBKG IL11RA IRF6 KAL1 KANSL1 KDM6A KLK4 KMT2D KRT14 KRT5 LAMA3 LAMB3 LAMC2 LEF1 LEMD3 LEPRE1 LIMK1 LRP5 LTBP3 MID1 MMP1 MMP20 MSX1 MSX2 MUTYH NFKBIA NHS NSD1 OBSL1 ODAM OFD1 ORAI1 OSTM1 PAX9 PCNT PHEX PITX2 PLEC PLEKHM1 PLXNB2 POLR1C POLR1D POLR3A POLR3B PORCN PPIB PRKAR1A PROK2 PROKR2 PTCH1 PTCH2 PTH1R PVRL1 PVRL4 RAB23 RAI1 RASGRP2 RBBP8 RECQL4 RFC2 ROGDI ROR2 RUNX2 SALL4 SAT1 SATB2 SEC23A SERPINF1 SERPINH1 SH3BP2 SHH SIX3 SLC24A4 SLC26A2 SMARCAL1 SMOC2 SP6 SP7 SPARC SPARCL1 SUFU SUMO1 TBX22 TCIRG1 TCOF1 TGIF1 TNFRSF11A TNFRSF11B TP63 TRPS1 TSC1 TSC2 TUFT1 UBR1 VDR WDR72 WNT10A WNT5A WRN ZIC2
<b>Genes included in the discovery sub-panel</b>
ACVR1 ACVR2A ACVR2B ADAMTS10 ADAMTS2 ADARA AGPAT2 AGXT AHCY AIP ALDH3A2 ALKBH1 AMER1 ANKH AP2B1 AP3B1 APAF1 APCDD1 ARHGAP6 ARSB ASXL1 ATP6V0A2 ATP7A ATRIP ATRX B3GALT1 B3GAT3 B4GALT7 BANF1 BARX1 BCL11B BGLAP BGN BMP2 BMP7 BMPR1A BNC2 BOC BRAF CACNA1C CARD9 CASK CASP7 CCL2 CD96 CDC42 CDC6 CDH1 CDH23 CDH3 CDKN1A CDKN1C CDON CDSN CENPJ CHR1 CHST3 CHSY1 CHUK CIB2 CLCN5 CLEC7A COL10A1 COL11A1 COL11A2 COL2A1 COL3A1 COX4I2 CRISPLD2 CRK CSF1 CTGF DCAF17 DCN DFNB31 DHCR24 DHCR7 DHODH DKK1 DKK4 DLG1 DLL1 DLX1 DLX2 DLX4 DLX5 DLX6 DMP1 DPYSL4 DSC3 DSG4 EDNRB EFN1 EHMT1 EXT2 EXTL3 EYA1 FAM20C FBN1 FERMT1 FGD1 FGF13 FGF18 FGF20 FGF4 FGF9 FKBP6 FLNA FLNB FMOD FOS FOXE1 FOXF2 FOXO1 FRAS1 FREM2 FRZB FST FUZ FZD1 FZD2 FZD6 G6PC3 GAB1 GAD1 GALNS GDNF GJB6 GLB1 GLI1 GLI3 GNPTAB GORAB GPC3 GRB2 GSC GSK3B GUSB HAND1 HAND2 HCCS HDAC4 HGSNAT HHAT HOXC13 HOXD13 HR HRAS HYAL IBSP ICAM1 IDS IDUA IFT122 IFT88 IGF1 IHH IL17F IL17RA INHBA INHBB INPP5E INSR ISL1 ITGA11 ITGA6 ITGAV ITGB2 ITGB4 ITGB6 ITGB8 JAG1 JAG2 KAT6B KAZN KCNJ2 KIF7 KISS1 KISS1R KL KRAS KRT1 KRT10 KRT16 KRT17 KRT6A KRT6B KRT74 KRT83 KRT9 LAMA5 LHX6 LHX8 LIFR LIPH LMNA LOR LPAR6 LRP4 LRP6 LTBP2 LUM LUZP1 MAP2K1 MAP2K2 MAP3K11 MASP1 MBTPS2 MED12 MED25 MEPE MGP MITF MMP14 MMP16 MMP2 MMP3 MMP9 MN1 MNT MSC MVP MYO7A NAGLU NCOA2 NCOR1 NELF NF2 NFE2L2 NFIC NIPBL NKX2-3 NKX3-2 NLRP1 NOG NOP10 NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3 OCRL ORC1 OSR2 PAF1 PCDH15 PDGFA PDGFC PDGFRA PDS5A PDS5B PHC1 PIGL PITX1 PKDCC PKP1 PLCD1 PLG PLOD1 PLOD3 PLXNA1 PLXNA2 PLXNA3 PLXNA4 PLXNB1 PLXNB3 PLXNC1 PLXND1 POLD1 POSTN POU1F1 PRDM1 PRDM16 PRKCI PRRX1 PRRX2 PTHLH PTPN11 PTPRF PTPRS PVRL3 RAPSN RBL1 RBL2 RBM28 RFNG RGS2 RIN2 RMRP RPS6KA3 RSPO2 RSPO4 SCARF2 SFN SGSH SH3PXD2B SHOX2 SIM2 SLC20A2 SLC32A1 SLC34A2 SLC35B2 SLC35C1 SLC39A13 SLC4A2 SLC4A4 SLC4A5 SMAD2 SMAD3 SMAD5 SMG1 SMO SMPD3 SNAI1 SNAI2 SOS1 SOST SOSTDC1 SOX10 SOX11 SOX18 SOX2 SOX3 SOX5 SP3 SPP1 SPRY2 SPRY4 SQSTM1 SSTR5 ST14 STAG1 STAT1 STAT3 STIM1 SUOX TAB2 TACR3 TBCE TBX1 TBX10 TBX15 TBX2 TBX3 TCF21 TCP1 TERC TERT TFAP2A TFIP11 TGFA TGFB1 TGFB2 TGFB3 TGFB4 TGFB5 THRA TINF2 TMCO1 TMEM107 TNFRSF19 TNFSF11 TRAF6 TRIM37 TRIP11 TRPV3 TSHZ1 TWIST1 TWIST2 UBB USH1C USH1G USH2A WDR19 WDR35 WHSC1 WNT1 WNT10B WNT3 WNT4 WNT6 WNT7B ZEB1 ZEB2 ZMPSTE24 ZNF469
<b>Genes added to the discovery sub-panel in the screening assay</b>
ADAM10 AKAP9 ANTXR2 BAZ1B BBX BMP1 CHPF CSRP2BP FAM111A FAM111B FAM73B GALC HMX3 IFITM5 IFT20 ITGA3 ITGB1 KDM4B LTBP1 NSUN2 NTRK1 RHOBTB3 SLC25A21 TMEM38B UBE3B

**Supplementary Table 2. Details of the targeted capture design**

		<b>v1.0</b>	<b>v2.0</b>
<b>Number of loci targeted</b>	Total	560	585
	Diagnosis sub-panel	175	175
	Discovery sub-panel	385	410
<b>Size of targeted regions (Mb)</b>	Total	2.36	2.47
	Diagnosis sub-panel	0.81	0.81
	Discovery sub-panel	1.5	1.66

**Supplementary Table 2. Details of the targeted capture design**

		<b>v1.0</b>	<b>v2.0</b>
<b>Number of loci targeted</b>	Total	560	585
	Diagnosis sub-panel	175	175
	Discovery sub-panel	385	410
<b>Size of targeted regions (Mb)</b>	Total	2.36	2.47
	Diagnosis sub-panel	0.81	0.81
	Discovery sub-panel	1.5	1.66



**Supplementary Table 4. Sequencing statistics from v1.0 of the gene panel on samples V1.01-V1.16**

ID	Total sequenced nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides in targeted regions <sup>o</sup>	Mean coverage*			% bases ≥ 1X*			% bases ≥ 20X*			% bases ≥ 50X*			% bases ≥ 100X*		
				Total	Diag. sub-panel	Disc. sub-panel	Total	Diag. sub-panel	Disc. sub-panel	Total	Diag. sub-panel	Disc. sub-panel	Total	Diag. sub-panel	Disc. sub-panel	Total	Diag. sub-panel	Disc. sub-panel
V1.01	2529393600	1935516105	973675975	410.57	443.57	393.18	99.5	99.5	99.6	97.5	98.8	96.8	94.5	97.8	92.8	88.3	95	84.8
V1.02	2441063200	1869714700	937342410	395.32	433.5	375.19	99.6	99.3	99.7	97.9	98.8	97.5	95.6	98.2	94.3	90.1	95.9	87
V1.03	2152958600	1631544311	855687555	360.71	400.9	339.54	99.7	99.6	99.8	98.2	99.1	97.7	95.7	98.4	94.3	89.6	96.2	86.2
V1.04	1703053800	1303350887	686090778	289.28	325.36	270.27	99.6	99.5	99.7	97.7	98.9	97.1	94.4	98	92.5	86.2	94.4	82
V1.05	1641523000	1195222257	637282471	268.63	298.28	253.01	99.7	99.5	99.7	97.6	98.9	97	93.8	97.9	91.7	84.3	93.2	79.7
V1.06	2100703400	1579542394	853771624	360.02	398.63	339.67	99.6	99.3	99.8	98.1	98.9	97.6	95.7	98.2	94.4	89.9	96	86.7
V1.07	2869433600	2167359316	1072784699	452.21	503.56	425.16	99.7	99.4	99.8	98.5	99	98.2	96.9	98.6	96	93.2	97.5	90.9
V1.08	2550773800	1933898916	1026048161	432.66	472.66	411.58	99.6	99.4	99.7	98.1	98.9	97.7	95.9	98.3	94.7	90.7	96.3	87.8
V1.09	2354231600	1774468518	909271752	383.38	425.66	361.1	99.7	99.4	99.8	98.2	99	97.9	96.2	98.5	94.9	90.9	96.6	87.9
V1.10	1713496800	1283336880	691905675	291.67	321.11	276.16	99.7	99.5	99.8	97.6	99	96.9	93.9	97.9	91.8	85.2	93.8	80.7
V1.11	2530456400	1906056269	1009463211	425.6	476.94	398.54	99.7	99.5	99.8	98.5	99.1	98.1	96.7	98.6	95.6	92.2	97.2	89.6
V1.12	2486134200	1883955509	1032670398	435.41	491.12	406.05	99.7	99.5	99.8	98.4	99.1	98.1	96.7	98.7	95.7	92.5	97.3	89.9
V1.13	2182365400	1613504161	835260345	352.15	390.72	331.83	99.7	99.5	99.8	98.1	99	97.6	95.4	98.3	93.8	88.9	95.8	85.3
V1.14	2284365400	1691327624	866816596	365.33	407.21	343.26	99.7	99.5	99.8	98.3	99.1	97.8	95.9	98.5	94.6	90.2	96.5	86.8
V1.15	2281142800	1687807698	912197621	384.7	423.73	364.13	99.5	99.3	99.6	97.7	98.7	97.2	95.2	97.9	93.8	89.5	95.3	86.4
V1.16	1250639000	944935101	538571957	227.08	251.73	214.1	99.6	99.4	99.7	97.2	98.7	96.4	92.5	97.1	90	81.1	90.9	76
Mean	2191983413	1650096290	864927577	364.67	404.04	343.92	99.64	99.44	99.74	97.98	98.94	97.48	95.31	98.18	93.81	88.93	95.49	85.48

<sup>o</sup>targeted regions = baited regions + 15 bp on either side, \*includes only reads with MQ > 30, Diag. = Diagnostic, Disc. = Discovery

**Supplementary Table 5. Regions with an average per sample coverage <20X in v1.0 of the panel**

Chr	Region Start	Region End	%GC	Region Length	Average Coverage Per Individual	Gene	Position
<i>Diagnostic sub-panel</i>							
7	74150814	74151053	42.26%	239	0	<i>GTF2I</i>	exon18
7	74163577	74163816	45.61%	239	0	<i>GTF2I</i>	exon26
7	74168150	74168389	48.54%	239	0	<i>GTF2I</i>	exon30
X	153786686	153786925	61.51%	239	0	<i>IKBK</i>	exon4
X	153788578	153788817	73.22%	239	0	<i>IKBK</i>	exon5
X	153789831	153790070	59.41%	239	0	<i>IKBK</i>	exon6
X	153790977	153791216	62.76%	239	0	<i>IKBK</i>	exon7
X	153791725	153791964	63.18%	239	0	<i>IKBK</i>	exon8
X	153792115	153792294	63.13%	179	0	<i>IKBK</i>	exon9
7	74163305	74163484	37.99%	179	0.033170391	<i>GTF2I</i>	exon25
7	74165631	74165810	39.11%	179	0.065293296	<i>GTF2I</i>	exon27
7	74169765	74169944	32.96%	179	0.065293296	<i>GTF2I</i>	exon31
X	153792485	153792724	64.02%	239	0.132583682	<i>IKBK</i>	exon10/3'UTR
7	74143059	74143298	47.28%	239	0.484309623	<i>GTF2I</i>	exon13
7	74144510	74144689	35.75%	179	0.689944134	<i>GTF2I</i>	exon14
18	59992470	59992709	83.68%	239	0.966788703	<i>TNFRSF11A</i>	5'UTR/exon1
4	2819914	2820153	85.36%	239	1.021705021	<i>SH3BP2</i>	5'UTR/exon1
4	5713075	5713314	82.43%	239	2.111140167	<i>EVC</i>	5'UTR/exon1
11	68080108	68080347	82.01%	239	3.053870293	<i>LRP5</i>	5'UTR/exon1
17	17713200	17713379	73.74%	179	7.438896648	<i>RAI1</i>	exon6/3'UTR
9	137533968	137534207	82.01%	239	10.91082636	<i>COL5A1</i>	5'UTR/exon1
2	220417548	220417787	75.73%	239	13.43122385	<i>OBSL1</i>	exon17
1	110612916	110613275	78.33%	359	19.7992688	<i>ALX3</i>	5'UTR/exon1
<i>Discovery sub-panel</i>							
9	140513401	140513580	87.15%	179	0.061103352	<i>EHMT1</i>	5'UTR/exon1
14	105634635	105634814	86.59%	179	0.274790503	<i>JAG2</i>	5'UTR/exon1
8	42995507	42995806	81.27%	299	0.327759197	<i>HGSNAT</i>	5'UTR/exon1
1	15250815	15251114	83.61%	299	0.35451505	<i>KAZN</i>	5'UTR/exon1
18	72923762	72923941	82.12%	179	0.423882682	<i>TSHZ1</i>	intron1
9	139440118	139440297	78.21%	179	0.468924581	<i>NOTCH1</i>	5'UTR
9	101867416	101867655	84.10%	239	0.486401674	<i>TGFBR1</i>	5'UTR/exon1
X	153784336	153784635	62.54%	299	0.525710702	<i>IKBK</i>	exon3
12	112856833	112857012	77.10%	179	0.808659218	<i>PTPN11</i>	5'UTR/exon1
7	150760182	150760361	75.42%	179	0.992667598	<i>SLC4A2</i>	5'UTR/exon1
5	177027147	177027326	81.56%	179	1.301326816	<i>B4GALT7</i>	5'UTR/exon1
9	132428096	132428455	82.73%	359	1.313022284	<i>PRRX2</i>	5'UTR/exon1
9	140353399	140353638	81.17%	239	1.360355649	<i>NSMF</i>	5'UTR/exon1
1	3310967	3311146	69.83%	179	1.392458101	<i>PRDM16</i>	intron4
21	38119940	38120419	81.42%	479	1.4375	<i>SIM2</i>	exon11/3'UTR
3	38495750	38495929	81.56%	179	1.516061453	<i>ACVR2B</i>	5'UTR/exon1
1	22469257	22469496	82.01%	239	1.531380753	<i>WNT4</i>	5'UTR/exon1
9	96717167	96717466	78.60%	299	1.567934783	<i>BARX1</i>	5'UTR/exon1
1	110453575	110453754	83.80%	179	1.930865922	<i>CSF1</i>	5'UTR/exon1
5	134369367	134369606	76.99%	239	1.947437238	<i>PITX1</i>	5'UTR/exon1
6	44225052	44225231	78.77%	179	2.208100559	<i>SLC35B2</i>	5'UTR/exon1
18	10454568	10454747	78.77%	179	2.311452514	<i>APCDD1</i>	5'UTR
1	120534005	120534184	41.90%	179	2.470670391	<i>NOTCH2</i>	intron4

Chr	Region Start	Region End	%GC	Region Length	Average Coverage Per Individual	Gene	Position
17	78193949	78194188	77.82%	239	2.544979079	<i>SGSH</i>	5'UTR/exon1
6	132272190	132272369	79.33%	179	2.602304469	<i>CTGF</i>	5'UTR
20	10654018	10654257	77.41%	239	2.612186192	<i>JAG1</i>	5'UTR/exon1
4	980832	981071	79.50%	239	2.720188285	<i>IDUA</i>	5'UTR/exon1
11	130029795	130030034	78.66%	239	2.83289749	<i>ST14</i>	5'UTR/exon1
17	80009329	80009688	81.34%	359	2.934192201	<i>RFNG</i>	5'UTR/exon1
5	178772140	178772379	80.75%	239	2.951621339	<i>ADAMTS2</i>	5'UTR/exon1
11	46939815	46939994	78.21%	179	2.981494413	<i>LRP4</i>	5'UTR/exon2
19	7293733	7293972	78.66%	239	2.993723849	<i>INSR</i>	5'UTR/exon1
X	128674346	128674525	76.54%	179	3.069832402	<i>OCRL</i>	5'UTR/exon1
5	179248469	179248648	70.95%	179	3.455656425	<i>SQSTM1</i>	intron1
19	5229449	5229748	80.27%	299	3.777801003	<i>PTPRS</i>	exon15
X	20284626	20284805	77.65%	179	4.146997207	<i>RPS6KA3</i>	5'UTR
6	10412805	10413044	74.48%	239	4.197960251	<i>TFAP2A</i>	intron1
7	558517	558696	75.98%	179	4.499301676	<i>PDGFA</i>	5'UTR/exon1
17	73749801	73750100	78.93%	299	4.509824415	<i>ITGB4</i>	exon33
20	60941973	60942332	78.27%	359	4.547179666	<i>LAMA5</i>	5'UTR/exon1
19	15311541	15311780	80.33%	239	4.950052301	<i>NOTCH3</i>	5'UTR/exon1
7	74162283	74162522	35.98%	239	4.967573222	<i>GTF2I</i>	exon24
3	184098061	184098300	79.50%	239	5.02248954	<i>CHRD</i>	5'UTR/exon1
7	559571	559870	77.59%	299	5.138586957	-	upstream
15	68724290	68724469	76.54%	179	5.259078212	<i>ITGA11</i>	5'UTR/exon1
7	140624315	140624554	77.41%	239	5.379445607	<i>BRAF</i>	5'UTR/exon1
9	124990858	124991097	77.82%	239	5.442730126	<i>LHX6</i>	5'UTR/exon1
22	17565931	17566170	77.82%	239	5.686453975	<i>IL17RA</i>	5'UTR/exon1
17	40688242	40688721	79.12%	479	6.322286013	<i>NAGLU</i>	5'UTR/exon1
20	30946517	30946696	76.54%	179	6.405726257	<i>ASXL1</i>	5'UTR/exon1
19	41836916	41837155	74.06%	239	6.517259414	<i>TGFB1</i>	5'UTR/exon1
3	110790825	110791064	73.64%	239	6.552824268	<i>PVRL3</i>	5'UTR/exon1
13	31774167	31774346	77.65%	179	6.819832402	<i>B3GALTL</i>	5'UTR/exon1
7	74157704	74157943	34.73%	239	6.993200837	<i>GTF2I</i>	exon20
14	95235965	95236384	76.85%	419	7.16900358	<i>GSC</i>	5'UTR/exon1
5	1294845	1295144	79.60%	299	7.27132107	<i>TERT</i>	5'UTR/exon1
16	18900651	18900950	40.13%	299	7.477842809	<i>SMG1</i>	exon6
16	68771253	68771432	76.54%	179	7.535963687	<i>CDH1</i>	5'UTR/exon1
2	172291031	172291270	78.66%	239	7.769089958	<i>DCAF17</i>	5'UTR/exon1
2	174829087	174829326	73.22%	239	8.390167364	<i>SP3</i>	exon2
10	134000497	134000676	77.65%	179	8.491620112	<i>DPYSL4</i>	5'UTR/exon1
10	31608103	31608282	68.72%	179	8.50349162	<i>ZEB1</i>	5'UTR/exon1
6	132271871	132272170	74.58%	299	8.639423077	<i>CTGF</i>	exon2
2	174828430	174828669	76.99%	239	8.67834728	<i>SP3</i>	exon3
19	4123707	4123946	77.41%	239	8.754445607	<i>MAP2K2</i>	5'UTR/exon1
7	100860381	100860620	74.90%	239	8.780857741	<i>PLOD3</i>	5'UTR/exon1
11	65381392	65381571	73.18%	179	9.057960894	<i>MAP3K11</i>	5'UTR
19	8649739	8649978	72.38%	239	9.0666841	<i>ADAMTS10</i>	exon25
9	124989604	124989843	73.22%	239	9.203713389	<i>LHX6</i>	exon2
3	38070924	38071103	73.74%	179	9.818435754	<i>PLCD1</i>	5'UTR/exon1
20	60884342	60884581	69.87%	239	9.882060669	<i>LAMA5</i>	exon80
16	88923106	88923345	76.99%	239	9.935669456	<i>GALNS</i>	5'UTR/exon1
7	557977	558216	75.73%	239	10.41082636	<i>PDGFA</i>	intron1

Chr	Region Start	Region End	%GC	Region Length	Average Coverage Per Individual	Gene	Position
2	121103719	121104258	75.88%	539	10.43552876	<i>INHBB</i>	5'UTR/exon1
11	69589473	69589892	77.57%	419	10.58412888	<i>FGF4</i>	5'UTR/exon1
16	68679476	68679715	69.87%	239	10.76281381	<i>CDH3</i>	exon2
2	178129192	178129371	74.86%	179	10.77513966	<i>NFE2L2</i>	5'UTR/exon1
5	78280706	78281125	76.37%	419	10.91139618	<i>ARSB</i>	5'UTR/exon1
22	20791835	20792074	79.92%	239	11.20737448	<i>SCARF2</i>	5'UTR/exon1
2	219724681	219724920	76.15%	239	11.67651674	<i>WNT6</i>	5'UTR/exon1
16	53468439	53468738	73.91%	299	12.00585284	<i>RBL2</i>	5'UTR/exon1
22	20779637	20780596	76.12%	959	12.44584202	<i>SCARF2</i>	exon11/3'UTR
3	129159104	129159283	65.36%	179	13.49965084	<i>IFT122</i>	5'UTR/exon1
7	128828948	128829367	77.33%	419	13.60739857	<i>SMO</i>	5'UTR/exon1
20	60897644	60897883	69.87%	239	13.80334728	<i>LAMA5</i>	exon46
X	153991159	153991338	72.07%	179	13.82087989	<i>DKC1</i>	5'UTR/exon1
20	62680481	62680900	77.33%	419	14.07741647	<i>SOX18</i>	5'UTR/exon1
7	556959	557198	74.48%	239	14.16971757	<i>PDGFA</i>	exon2
4	996476	997004	78.03%	528	14.34824811	<i>IDUA</i>	exon9/10
22	46367956	46368195	75.31%	239	14.42024059	<i>WNT7B</i>	intron1
20	62679467	62680366	75.97%	899	15.1881257	<i>SOX18</i>	exon2/3'UTR
X	54521532	54521891	73.61%	359	17.47423398	<i>FGD1</i>	5'UTR/exon1
17	78187524	78187763	70.29%	239	17.77301255	<i>SGSH</i>	exon6
1	11994755	11994994	74.48%	239	17.78242678	<i>PLOD1</i>	5'UTR/exon1
18	10454840	10455079	75.00%	239	17.79550209	<i>APCDD1</i>	5'UTR/exon1
2	42275299	42276018	77.78%	719	17.81389082	<i>PKDCC</i>	5'UTR/exon1
5	52776544	52776783	72.50%	239	18.40115063	<i>FST</i>	5'UTR/exon1
19	5250930	5251109	58.89%	179	18.53840782	<i>PTPRS</i>	intron 9
1	2985752	2985931	70.00%	179	18.89385475	<i>PRDM16</i>	5'UTR/exon1
11	2905860	2906759	77.44%	899	18.92575083	<i>CDKN1C</i>	5'UTR/exon1
19	3366560	3366739	72.22%	179	19.40851955	<i>NFIC</i>	5'UTR/exon1
11	65374713	65375012	73.33%	299	19.76066054	<i>MAP3K11</i>	exon5

**Supplementary Table 6. Variant detection statistics in samples V1.01-V1.16 with v1.0 of the gene panel**

ID	Number of variants identified	Number of SNPs	Number of INDELS	Number of filtered* variants with allele frequency < 1% in dbSNP137, 1000G, EVS and in-house database	Number of filtered variants annotated as missense	Number of filtered variants annotated as frameshift	Number of filtered variants annotated as nonsense	Number of filtered variants annotated as splice mutations
V1.01	2547	2138	409	74	22	0	1	1
V1.02	2572	2127	445	64	16	3	0	0
V1.03	3059	2560	499	180	40	1	0	0
V1.04	2704	2260	444	68	19	0	1	1
V1.05	3077	2582	495	189	31	3	0	0
V1.06	2671	2225	446	79	28	0	0	0
V1.07	2553	2134	419	77	13	1	0	1
V1.08	2553	2144	409	72	20	0	0	1
V1.09	2622	2186	436	70	13	0	1	0
V1.10	2441	2018	423	69	22	0	0	0
V1.11	2701	2263	438	81	21	1	1	0
V1.12	2563	2130	433	69	16	0	0	0
V1.13	2581	2149	432	90	22	0	0	0
V1.14	2538	2091	447	76	18	0	1	0
V1.15	2588	2158	430	59	15	0	0	0
V1.16	2599	2188	411	72	14	0	1	0
<b>Mean</b>	<b>2648.06</b>	<b>2209.56</b>	<b>438.50</b>	<b>86.81</b>	<b>20.63</b>	<b>0.56</b>	<b>0.38</b>	<b>0.25</b>

\* filtered: variants that passed the following criteria: allele frequency < 1% in dbSNP137, 1000 genomes, Exome Variant Server, and in-house database; °includes only reads with MQ > 30

**Supplementary Table 7. Sequencing statistics for patients v2.01-v2.95 sequenced with v2.0 of the gene panel**

ID	Total sequenced nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides in targeted regions	Mean coverage	% bases $\geq 1X^{\circ}$	% bases $\geq 20X^{\circ}$	% bases $\geq 50X^{\circ}$	# variants	# SNP	# Indel	# filtered* variants	# filtered mis-sense	# filtered frame-shift	# filtered nonsense	# filtered splice
				Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total
V2.01	848050800	736028984	277592817	107.8	99.8	96	81.5	2780	2262	518	70	13	0	0	1
V2.02	960169200	860522137	327213166	127.05	99.8	96.4	85	2876	2364	512	83	14	3	0	0
V2.03	747160000	667348632	261857870	101.64	99.8	95.1	78.5	2642	2167	475	65	11	1	0	1
V2.04	800411200	725089453	282525424	109.54	99.8	95.4	80.3	2869	2349	520	74	11	0	0	0
V2.05	746819200	684586911	269867229	104.51	99.8	94.2	77.3	2670	2215	455	110	23	3	0	0
V2.06	692747000	634750100	264984723	102.61	99.7	93.5	75.7	2874	2357	517	128	19	5	1	0
V2.07	887134800	756202602	284776259	110.64	99.8	95.7	81.5	2726	2208	518	71	12	3	0	2
V2.08	922939800	823410379	320339971	124.17	99.8	96.2	83.5	2789	2284	505	86	12	0	0	0
V2.09	776923600	651158111	299181653	115.81	99.8	96	83.1	2741	2227	514	73	6	3	1	1
V2.10	644774400	545336576	262728853	101.82	99.7	95	79.1	2769	2278	491	72	15	0	0	2
V2.11	757023200	659217579	313145842	121.23	99.8	96.4	84.7	2790	2280	510	78	13	0	0	1
V2.12	855912600	779255895	359977159	139.45	99.9	96.9	87.4	2823	2316	507	41	2	0	0	1
V2.13	1502519800	1282612834	528188469	204.98	99.9	98.2	94	2846	2328	518	82	18	3	0	2
V2.14	1149269200	1015333953	438537896	169.99	99.8	97.8	91.6	2738	2234	504	77	15	0	0	2
V2.15	1004121800	895602006	407007571	157.78	99.9	97.6	90.3	2766	2265	501	71	13	3	0	1
V2.16	958794200	806152575	341959344	132.41	99.8	96.5	85.4	2759	2260	499	90	23	2	0	1
V2.17	2123494400	1875903407	809214774	313.75	99.9	98.9	96.4	3745	3122	623	128	26	0	0	2
V2.18	1048638000	926159642	403679470	156.47	99.9	97.5	89.4	2766	2271	495	70	19	0	1	0
V2.19	1059056800	945324906	402670360	156.13	99.8	97.1	88.6	2889	2366	523	71	14	0	0	1
V2.20	895689600	814345529	372856997	144.44	99.8	97.2	88.7	2802	2296	506	64	13	4	1	1
V2.21	2664350600	2397448572	1007063992	390.46	99.9	99.1	97.4	3725	3090	635	169	34	3	1	1
V2.22	1935887200	1685866367	758461285	293.93	99.9	98.9	96.7	3641	3018	623	101	17	2	0	1
V2.23	1188179000	1077109416	459677384	178.31	99.9	97.5	90.7	2792	2278	514	66	10	3	0	1
V2.24	1398400200	1213462486	510731305	198.47	99.9	98.3	94.2	2801	2288	513	87	19	3	0	1
V2.25	1495761200	1364107809	591255764	229.51	99.9	98.4	94.9	2722	2204	518	85	9	0	0	1
V2.26	988928400	870596072	399228912	154.73	99.9	97.5	89.6	2805	2286	519	73	9	0	1	3
V2.27	568525800	457626650	227965737	88.22	99.8	93.9	74.1	2673	2194	479	68	10	0	0	1
V2.28	1046138800	946606434	446714024	172.78	99.9	97.9	91.7	2781	2273	508	78	10	3	1	3
V2.29	574351000	513661968	244780596	94.79	99.8	95.2	78	2744	2251	493	70	11	3	0	1
V2.30	2313111600	2007376602	880783599	340.92	100	99	97	3792	3153	639	173	38	0	1	2
V2.31	773530600	681983651	334742156	129.78	99.8	97.1	88.2	2824	2294	530	56	8	0	0	1

ID	Total sequenced nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides in targeted regions	Mean coverage	% bases $\geq 1X^\circ$	% bases $\geq 20X^\circ$	% bases $\geq 50X^\circ$	# variants	# SNP	# Indel	# filtered* variants	# filtered mis-sense	# filtered frame-shift	# filtered nonsense	# filtered splice
V2.32	1107243800	952873442	432500622	167.53	99.8	97.7	91.3	2773	2251	522	78	15	3	0	2
V2.33	1262394400	1126406753	433938620	168.63	99.9	97.6	90.8	2868	2357	511	76	20	3	0	1
V2.34	729711600	644240049	262838572	102.14	99.8	95	78.8	2770	2256	514	77	21	0	0	1
V2.35	1088653800	995478858	399149335	154.88	99.8	97.2	89.1	2660	2153	507	66	14	1	0	1
V2.36	1402971000	1257523339	482424435	187.65	99.9	98	92.4	2942	2410	532	114	22	4	0	1
V2.37	1432402000	1286637761	483808260	188.06	99.8	97.9	92.5	2753	2249	504	78	13	3	0	1
V2.38	1185778400	1072343725	422060643	163.82	99.8	97.5	90.4	2842	2339	503	84	8	0	2	1
V2.39	798479800	710469922	311345177	120.66	99.9	96.3	83.8	2763	2267	496	65	11	1	0	1
V2.40	1501506200	1374930437	542011393	210.45	99.9	98.2	93.8	2825	2289	536	74	7	0	0	1
V2.41	755312000	668403887	283829802	110.19	99.7	94.9	80.1	2803	2277	526	76	15	0	1	1
V2.42	955305400	817563816	354413159	137.59	99.8	97.2	88.1	2894	2359	535	74	10	1	0	1
V2.43	960359000	871557783	371634147	144.17	99.8	97.1	88.1	2725	2243	482	63	9	0	0	1
V2.44	1504276200	1303262139	515070393	200.06	99.9	98.2	93.2	2772	2268	504	77	13	3	0	2
V2.45	1061382400	924381441	402600639	156.27	99.8	97.5	90	2695	2181	514	80	16	0	0	1
V2.46	1040252400	925302762	380872541	148.02	99.8	97.5	89.9	2768	2261	507	74	7	4	1	2
V2.47	1291747800	1145317180	447396501	173.76	99.8	97.8	91.7	2817	2303	514	91	15	3	0	4
V2.48	1333586800	1140100684	481154521	185.91	99.8	97.7	92.1	2784	2269	515	72	15	3	1	1
V2.49	1343604200	1196406787	480490318	186	99.8	97.9	92.7	2754	2230	524	79	15	0	1	1
V2.50	1026321600	910914613	390514110	151.06	99.9	97.3	89.2	2756	2253	503	88	17	1	0	2
V2.51	1084525800	921482358	387228819	149.66	99.8	97.4	89.9	2743	2238	505	84	21	2	0	1
V2.52	893392400	766979835	339596355	131.15	99.8	96.2	85.3	2748	2289	459	69	9	0	0	3
V2.53	1397405400	1283250012	519754347	201.22	99.8	97.6	92.2	2905	2383	522	73	16	0	0	1
V2.54	1619633800	1496266236	613038295	236.97	99.9	98.4	94.9	2771	2260	511	79	18	0	0	1
V2.55	1525109600	1409329796	565809153	218.73	99.8	98	93.7	2793	2301	492	69	10	1	0	1
V2.56	1080181600	963545575	407219662	157.32	99.8	97.4	90.2	2873	2386	487	62	12	0	0	1
V2.57	1719283000	1516114039	573781112	222.16	99.8	98.2	94.2	2784	2267	517	87	16	3	0	1
V2.58	1291547200	1099723443	446787037	172.49	99.9	97.8	91.5	2691	2220	471	81	14	1	1	1
V2.59	1056774800	958828432	402546525	155.55	99.8	97.5	90.6	2665	2172	493	68	16	2	0	1
V2.60	1386210000	1231985409	485313286	187.5	99.8	97.9	92.7	3061	2524	537	111	21	0	0	0
V2.61	1434162600	1325855516	508545342	196.55	99.8	97.6	92.5	3292	2734	558	230	40	3	0	1
V2.62	1311658400	1164036368	448507877	173.73	99.8	97.8	92.2	2842	2338	504	78	12	0	0	2
V2.63	784783800	612917519	276014895	106.25	99.8	93.8	77	2662	2214	448	85	23	0	1	0
V2.64	1477661800	1260260874	548548734	211.77	99.9	97.7	92.8	2822	2330	492	108	26	2	0	1
V2.65	1507305000	1331063062	558019554	216.29	99.8	97.8	93.2	2599	2161	438	56	10	2	1	1

ID	Total sequenced nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides	Total passed filter aligned nucleotides in targeted regions	Mean coverage	% bases $\geq 1X^\circ$	% bases $\geq 20X^\circ$	% bases $\geq 50X^\circ$	# variants	# SNP	# Indel	# filtered* variants	# filtered mis-sense	# filtered frame-shift	# filtered nonsense	# filtered splice
V2.66	1561032200	1301266158	553784231	213.92	99.8	97.5	92.3	2749	2285	464	42	9	2	0	1
V2.67	1845095000	1618692423	627804999	243.04	99.9	98	93.7	2801	2340	461	61	17	2	0	1
V2.68	2211562400	1953015892	735168165	285.02	99.9	98.5	95.8	2729	2229	500	55	4	3	0	1
V2.69	1365493200	1159701682	507692366	196.28	99.9	97.8	92.1	2641	2165	476	80	16	2	0	1
V2.70	2452899800	2205738567	871452465	337.39	99.9	98.3	95.7	2768	2294	474	62	9	2	1	1
V2.71	2757139800	2381482082	995840560	384.73	99.9	98.6	96.2	2808	2336	472	58	14	0	0	3
V2.72	722424400	644206852	295660531	114.65	99.8	95.3	81.4	2838	2370	468	78	18	2	0	1
V2.73	1041247000	935138556	401389849	155.98	99.8	97.2	89.4	2675	2219	456	49	12	1	0	1
V2.74	817505800	747780422	330902440	128.37	99.8	96.3	85	2667	2197	470	57	8	2	0	1
V2.75	1044084000	932546469	410852215	159.53	99.8	97	89.1	2677	2232	445	79	20	2	0	1
V2.76	1097412400	1007856644	411589046	159.73	99.8	97.4	89.6	2811	2330	481	63	14	2	0	1
V2.77	887949600	819098704	369027076	143.13	99.8	96.8	87.7	2725	2265	460	50	9	2	0	1
V2.78	1149476000	1036810860	452316293	175.16	99.8	97.4	90.9	2660	2206	454	56	14	0	0	1
V2.79	553319000	493066518	241368038	93.42	99.8	94.1	75.6	2647	2200	447	59	15	1	1	1
V2.80	1209526800	999910832	436988783	169.13	99.8	97.4	90.6	2568	2129	439	39	2	2	0	1
V2.81	848366200	739270269	340597891	132	99.8	96.9	87.2	2893	2410	483	72	15	1	2	2
V2.82	952025200	842805360	391452746	151.82	99.7	97	89.2	3263	2741	522	125	18	6	0	2
V2.83	1281135400	1159643658	485024670	188.02	99.8	97.4	91.2	2576	2143	433	49	16	3	0	1
V2.84	1642417600	1457576294	591501793	229.36	99.9	98.4	94.8	2755	2256	499	57	17	2	0	2
V2.85	1391188600	1239369834	534937296	207.52	99.8	98.1	93.9	2802	2334	468	80	11	0	0	1
V2.86	1498139000	1280633352	550946548	213.44	99.8	98	93.9	2780	2312	468	83	23	2	1	1
V2.87	2070727600	1871514233	738939121	286.94	99.9	98.6	95.9	2733	2255	478	63	13	3	1	1
V2.88	2083217200	1871302407	781453864	302.93	99.9	98.6	96.2	2825	2358	467	87	16	2	0	1
V2.89	1101851800	939454646	425625286	165.26	99.8	97.9	91.8	2835	2328	507	79	16	3	0	1
V2.90	1384881400	1233825394	538855687	208.95	99.9	98.2	93.7	2676	2220	456	68	18	2	1	2
V2.91	1933795600	1759986293	759672348	294.62	99.8	98.5	95.9	2598	2160	438	62	20	4	0	1
V2.92	1122398800	999746160	452635262	175.43	99.9	97.9	91.7	2783	2313	470	55	12	0	0	1
V2.93	901247800	798025190	378901767	146.81	99.9	97.1	88.4	2728	2259	469	64	15	3	1	1
V2.94	1181614200	1040532507	455503452	176.51	99.9	97.7	91.3	2703	2228	475	47	12	2	0	1
V2.95	1935740600	1749394743	743850497	288.45	99.9	98.6	96	2811	2317	494	52	11	0	0	1

\*filtered: variants that passed the following criteria: allele frequency < 1% in dbSNP137, 1000 genomes, Exome Variant Server, and in-house database; °includes only reads with MQ > 30



**Supplementary Table 8. Comparison of sequence coverage of the targeted regions achieved with v2.0 of our NGS gene panel and that of the same regions achieved by whole exome sequencing in 8 random samples with a similar capture/sequencing protocol and bioinformatics pipeline**

		<b>Targeted NGS gene panel (v2.0)</b>	<b>V5</b>
Mean coverage (X)	Overall	178.90	100.84
	Diagnosis sub-panel	211.17	102.62
	Discovery sub-panel	175.35	99.97
% reads >= 20X	Overall	97.23	89.09
	Diagnosis sub-panel	99.41	89.14
	Discovery sub-panel	96.65	89.06
% reads >= 50X	Overall	89.39	70.25
	Diagnosis sub-panel	97.01	70.96
	Discovery sub-panel	87.63	69.91

Coverage calculations include only high-quality mapped reads (MQ > 30); V5: Agilent SureSelect V5 (Agilent, Santa Clara, USA)

## REFERENCES

1. Huckert M, Stoetzel C, Morkmued S, et al. Mutations in the Latent TGF-beta Binding Protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. *Human molecular genetics* 2015 doi: 10.1093/hmg/ddv053 [published Online First: 2015/02/12].
2. Jaureguiberry G, De la Dure-Molla M, Parry D, et al. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations. *Nephron. Physiology* 2012;122(1-2):1-6 doi: 10.1159/000349989 [published Online First: 2013/02/26].
3. Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, et al. Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *American journal of human genetics* 2009;84(2):266-73 doi: 10.1016/j.ajhg.2009.01.009 [published Online First: 2009/02/10].

### III- Amelogenesis Imperfecta: 1 Family, 2 Phenotypes, and 2 Mutated Genes[3]

#### Résumé

Cet article décrit une famille marocaine consanguine de 8 membres atteints de différentes formes d'AI : 3 individus sont atteints d'AI hypoplasique et 3 d'AI hypomature.

Le génotype est exploré grâce à un outil de séquençage de nouvelle génération (NGS) ciblé sur les anomalies dentaires (article 2). L'analyse bioinformatique a permis d'identifier deux mutations hétérozygotes chez le patient participé dans le panel de diagnostic NGS [2] : Une mutation non sens dans le gène *COL17A1* et une délétion dans le gène *C4orf26*. La validation et la ségrégation familiale a été explorées par la suite.

Nous avons extrait l'ADN des échantillons salivaires pour chaque membre de la famille prélevées à l'aide du kit Oragene-DNA. Toutes les mutations trouvées ont été validées par le séquençage Sanger.

L'analyse des séquences obtenues a permis d'identifier une nouvelle mutation non-sens hétérozygote dans le gène *COL17A1* (c. 1873C> T, p.R625\*) qui ségrége avec le phénotype AI hypoplasique et une délétion homozygote (8 bp) dans le gène *C4orf26* (c.39\_46del, p.Cys14Glyfs\*18) associée au phénotype hypomature.

Notre étude souligne l'hétérogénéité phénotypique et génotypique de l'AI qui peut coexister au sein d'une même famille consanguine [2, 46, 50, 59, 67, 70, 79, 85-87, 90, 95, 97, 109, 110, 113, 121, 125, 132, 139, 144, 182, 194, 195, 227, 228, 230, 250, 258-268].

# Amelogenesis Imperfecta: 1 Family, 2 Phenotypes, and 2 Mutated Genes

M.K. Prasad<sup>1</sup>, S. Laouina<sup>2</sup>, M. El Alloussi<sup>2</sup>, H. Dollfus<sup>1,3</sup>,  
and A. Bloch-Zupan<sup>4,5,6</sup>

Journal of Dental Research  
1–7  
© International & American Associations  
for Dental Research 2016  
Reprints and permissions:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0022034516663200  
jdr.sagepub.com

## Abstract

Amelogenesis imperfecta (AI) is a clinically and genetically heterogeneous group of diseases characterized by enamel defects. The authors have identified a large consanguineous Moroccan family segregating different clinical subtypes of hypoplastic and hypomineralized AI in different individuals within the family. Using targeted next-generation sequencing, the authors identified a novel heterozygous nonsense mutation in *COL17A1* (c.1873C>T, p.R625\*) segregating with hypoplastic AI and a novel homozygous 8-bp deletion in *C4orf26* (c.39\_46del, p.Cys14Glyfs\*18) segregating with hypomineralized-hypoplastic AI in this family. This study highlights the phenotypic and genotypic heterogeneity of AI that can exist even within a single consanguineous family. Furthermore, the identification of novel mutations in *COL17A1* and *C4orf26* and their correlation with distinct AI phenotypes can contribute to a better understanding of the pathophysiology of AI and the contribution of these genes to amelogenesis.

**Keywords:** enamel, genetics, genomics, molecular genetics, enamel biomineralization/formation, tooth development

## Introduction

Enamel is the hardest and most mineralized tissue in the human body. It is composed primarily of calcium hydroxyapatite crystallites (96%) with a small amount of water (2%) and an organic matrix (2%). The organic matrix contains several proteins, such as amelogenin, ameloblastin, enamelysin, enamelin, tuftelin, and amelotin (Cobourne and Sharpe 2013). Enamel formation, or amelogenesis, is an intricate process that begins with the deposition of a thin layer of aprismatic enamel by secretory ameloblasts during the bell stage of tooth development. These cells then develop Tomes processes, which secrete enamel proteins along a mineralization front and control rod formation as the enamel crystals grow in length. Then, the ameloblasts lose their Tomes processes, lay a final layer of aprismatic enamel, and enter the maturation phase, during which they secrete proteases to degrade the enamel matrix, allowing the deposition of ions that is necessary for the hydroxyapatite crystallites to grow in size (Hu et al. 2007).

Defects in amelogenesis can lead to a group of hereditary diseases characterized by enamel defects called amelogenesis imperfecta (AI). The prevalence of AI varies between 1 in 700 to 1 in 14,000 depending on the population studied (Crawford et al. 2007). To date, mutations in 15 genes (*AMELX*, *ENAM*, *AMBN*, *KLK4*, *MMP20*, *WDR72*, *FAM83H*, *ITGB6*, *SLC24A4*, *C4orf26*, *LAMB3*, *LAMA3*, *COL17A1*, *DLX3*, and *STIM1*) have been shown to cause nonsyndromic AI (Lagerstrom et al. 1991; Rajpar et al. 2001; Hart et al. 2004; Dong et al. 2005; Kim et al. 2005; Murrell et al. 2007; Kim et al. 2008; El-Sayed et al. 2009; Parry et al. 2012; Yuen et al. 2012; Parry et al. 2013; Poulter et al. 2014a; Poulter et al. 2014b; Poulter et al.

2014c; Wang et al. 2014). Mutations in several additional genes have been demonstrated to cause various syndromic forms of AI, such as in *DLX3* (tricho-dento-osseous syndrome), *FAM20A* (enamel-renal syndrome), *CNNM4* (Jalili syndrome), *ROGDI* (Kohlschutter-Tonz syndrome), *LTBP3* (brachyolmia with AI), *PEX1* and *PEX6* (Heimler syndrome), and *CLDN16* (familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis) to name a few (Price et al. 1998; Parry et al. 2009;

<sup>1</sup>Laboratoire de Génétique Médicale, INSERM U1112, Institut de Génétique Médicale d'Alsace, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup>Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Mohammed V University, Rabat, Morocco

<sup>3</sup>Centre de Référence pour les Affections Rares en Génétique Ophtalmologique, Service de Génétique Médicale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>4</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>5</sup>Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Centre de Référence des Manifestations Odontologiques des Maladies Rares, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>6</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire and Cellulaire, CNRS UMR7104, INSERM U964, Centre Européen de Recherche en Biologie et en Médecine, Université de Strasbourg, Illkirch, France

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

## Corresponding Author:

A. Bloch-Zupan, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, 8 rue St Elisabeth, 67000 Strasbourg, France.  
Email: [agnes.bloch-zupan@unistra.fr](mailto:agnes.bloch-zupan@unistra.fr)



Jaureguiberry et al. 2012; Schossig et al. 2012; Bardet et al. 2015; Huckert et al. 2015; Rafbi et al. 2015).

The inheritance of isolated AI can be autosomal dominant (AD), autosomal recessive (AR), or X-linked depending on the underlying gene defect. Phenotypically, the disease is broadly classified into 1) hypoplastic AI, which is a quantitative defect characterized by very thin or no enamel, pitted enamel, or enamel with grooves and is caused by defects in enamel matrix secretion; and 2) hypomineralized AI, which is a qualitative defect characterized by soft enamel due to defects in enamel mineralization/maturation. This latter subtype can be further classified into hypocalcified AI, defined as reduced mineralization of enamel, and hypomature AI, caused by protein processing and enamel crystallite maturation defects. However, such a classification does not reflect the fact that both quantitative and qualitative defects can present in any one type of AI, thus rendering AI difficult to describe and classify at times.

In this study, we present genetic analyses in a large consanguineous Moroccan family segregating 2 AI phenotypes (hypoplastic only and hypoplastic + hypomineralized) in different individuals. Using a targeted next-generation sequencing (NGS) approach, we identified novel mutations in *COL17A1* and *C4orf26* segregating with the disease in different members of this family, with a clear genotype-phenotype correlation between the 2 forms of AI and the mutations identified.

## Materials and Methods

### Patient Inclusion

The family was recruited at the Faculty of Dental Medicine, Mohammed V University in Rabat, Morocco, and included in this study, which has been approved by the French Ministry of Higher Education and Research (MESR). It is registered at <https://clinicaltrials.gov> (NCT01746121 and NCT02397824) and with the MESR's Bioethics Commission as a biological collection ("Orofacial manifestations of rare diseases" DC-2012-1677 within DC-2012-1002). It was acknowledged by the CPP (Person Protection Committee; Est IV) on December 11, 2012. All patients or their legal guardians provided informed consent for clinical data collection, DNA extraction, and analysis. DNA was obtained from saliva samples (Oragene DNA; DNA Genotek). The patient phenotype was recorded using D[4]/Phenodent ([www.phenodent.org](http://www.phenodent.org)). Dental phenotyping was performed via clinical and X-ray examinations (panoramic radiography).

### Library Preparation, Sequencing, and Data Analysis

Targeted regions were captured using a custom SureSelectXT2 in-solution target enrichment kit (Agilent) as described previously (Prasad et al. 2016). Sequencing libraries were prepared for sequencing (2 × 100 bp) on the HiSeq 2500 (Illumina) following the manufacturers' instructions. Read alignment and variant calling and annotation were performed using standard methods as

previously described and detailed in the Appendix (Prasad et al. 2016).

### Mutation Validation

The mutations were validated, and segregation analysis was performed by polymerase chain reaction (PCR) followed by Sanger sequencing (GATC). Primer sequences for the amplification of the *COL17A1* mutation are the following: 5'-TTC CAGGGATGTCAGATGGG-3' and 5'-TCAAAGGGTCCACTCTGGCTT-3'; those for the amplification of the *C4orf26* mutation are the following: 5'-TGATCCCCAACTCTCCA CTG-3' and 5'-ATTGCTGAGACGAGGACCAA-3'. PCR reactions were set up with 50 ng genomic DNA, 0.5 μm each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM each dNTP, 1 U Taq polymerase (D1806; Sigma-Aldrich), and 1X PCR buffer (D1806; Sigma-Aldrich). Cycling conditions were as follows: 95°C for 5 min, 40 cycles of 95°C for 30 s, 63.9°C for 30 s, 72°C for 30 s, and 72°C for 10 min. The product sizes were 715 bp for the *C4orf26* amplicon and 501 bp for the *COL17A1* amplicon.

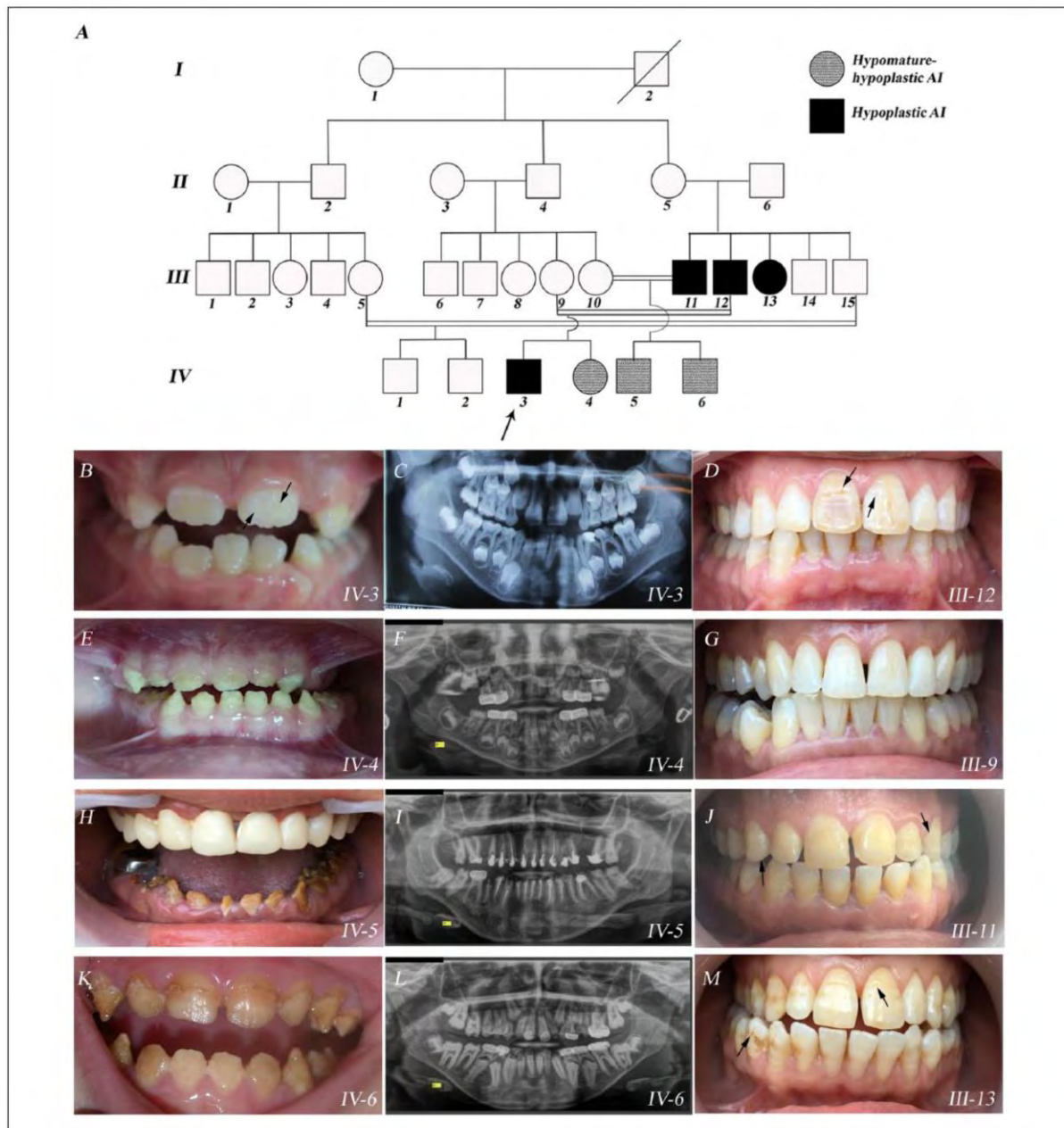
## Results

### Clinical Assessment of the Family Reveals Hypomineralized and Hypoplastic AI

We recruited a large highly consanguineous Moroccan family segregating AI in 2 branches of the family. The mutation identified in the index patient, IV-3, was recently reported by us as part of a large-scale diagnostic screen of patients with rare diseases with orofacial manifestations using a targeted NGS panel (Prasad et al. 2016). Here, we present an extended pedigree (Fig. 1A) with new clinical data on this patient as well as on additional members of his family. Furthermore, we also present genotypic analyses in additional family members and a novel mutation in a second gene segregating with AI in this family. Overall, we have clinically examined 9 members of the family and genotyped 8 members.

The index patient, IV-3, presented with thin hypoplastic enamel in the primary dentition and pitted enamel in erupting permanent teeth, which showed a rough surface (Fig. 1B). Dental radiograph findings were normal (Fig. 1C). His sister, IV-4, who was still in the primary dentition stage, presented with yellowish enamel and enamel hypoplasia in the incisors and molars (Fig. 1E). Enamel seemed to be present only at the tip of the cusps. Dental radiographs showed no contrast between dentin and enamel, both in erupted and nonerupted teeth, suggesting enamel hypomineralization (Fig. 1F). Their father, III-12, presented with discrete, thinner, pitted striae enamel (Fig. 1D) and a normal dental X-ray result (data not shown). The appearance of their mother's (III-9) teeth was clinically normal (Fig. 1G).

In the second branch of the family, the cousins of IV-3, that is, IV-5 and IV-6, also presented with AI. IV-5 was in his permanent dentition. In Figure 1H, we can notice that his mandibular teeth (before prosthodontic treatment) were dark brown and that the incisors were covered with calculus. Enamel

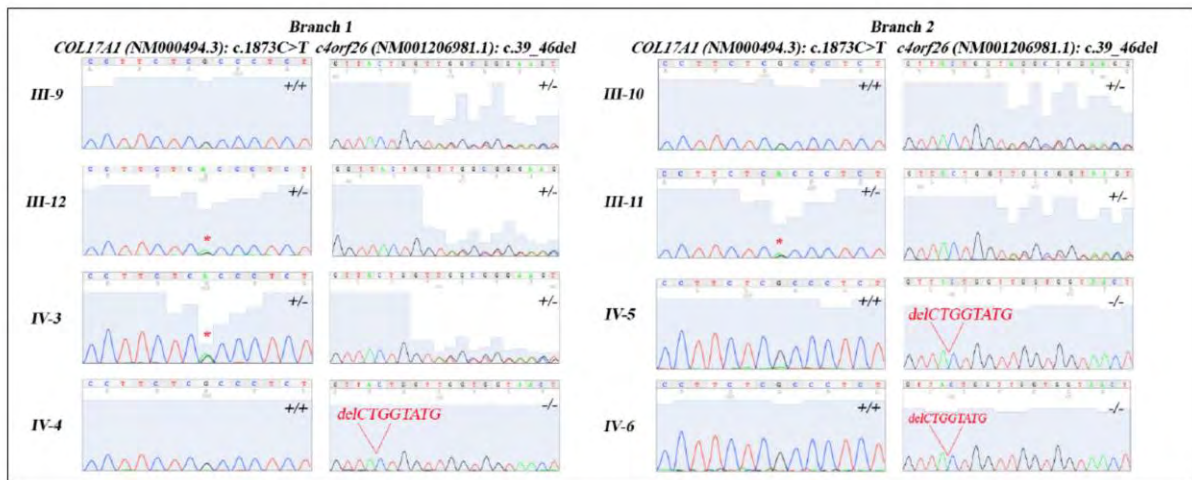


**Figure 1.** Family pedigree and clinical phenotype. **(A)** Pedigree of the family. The arrow marks the index patient who was investigated by targeted next-generation sequencing. **(B-M)** Dental intraoral photographs and radiographs of family members. **(B, D, G, M)** A hypoplastic amelogenesis imperfecta (AI) phenotype with thinner enamel, pits (marked by arrows), and striae anomalies is present in affected III-12, III-11, III-13, and IV-3 individuals with a heterozygous *COL17A1* mutation. **(G)** The normal dentition of a heterozygous carrier of the *C4orf26* mutation. **(H)** The maxillary teeth have undergone prosthodontic treatment, whereas the mandibular teeth demonstrate the hypomineralized AI phenotype for IV-5. This phenotype with yellow-brown hypomineralized enamel combined with hypoplastic defects is shared by IV-4 **(E)** and IV-6 **(K)** and is associated with a homozygous *C4orf26* mutation.

hypomineralization led to posteruptive breakdown, severe tooth wear, and loss of vertical bite dimension. IV-6, who was in his primary dentition stage, showed brown teeth with hypomineralized-hypoplastic enamel with signs of posteruptive enamel loss (Fig. 1K, L). On the panoramic radiograph, IV-4,

IV-5, and IV-6 displayed a similar absence of contrast between the mineralized tissues of the teeth, confirming the diagnosis of hypomineralized AI (Fig. 1F, I, L). Their father, III-11, the brother of III-12, showed thin enamel with diastema between the teeth (Fig. 1J). His teeth were slightly yellow in color. The





**Figure 2.** Segregation analysis of the *COL17A1* and *C4orf26* mutations. Sequence chromatograms demonstrate the presence/absence of the 2 mutations in the indicated family members. The heterozygous *COL17A1* c.1873C>T mutation is highlighted by a red asterisk, whereas the presence of the homozygous *C4orf26* c.39\_46del mutation is indicated in red.

mother of IV-5 and IV-6, III-10, who is also the sister of III-9, had clinically normal teeth (data not shown). The sister of III-11 and III-12, that is, III-13, also had a phenotype similar to her brothers: hypoplastic AI with pitted enamel (Fig. 1M).

The remaining family members were reported to have normal teeth. In spite of the consanguinity of the family, the disease shows an AD transmission in each affected branch of the family (branch 1: III-9, III-12, IV-3, and IV-4; branch 2: III-10, III-11, IV-5, and IV-6), with the fathers and all children being affected (Fig. 1A). However, the clinical phenotypes vary among affected individuals. IV-4, IV-5, and IV-6 all showed a similar phenotype with yellow or brown hypomineralized enamel with hypoplasia. III-11, III-12, and IV-3 showed a primarily hypoplastic enamel defect.

### Targeted NGS Reveals Mutations in 2 Genes

We performed targeted NGS in patient IV-3 as previously described (Prasad et al. 2016). Briefly, we sequenced 585 genes (2.7 Mb) that were either implicated in syndromic and nonsyndromic orodental diseases or were considered candidate genes for these diseases. We generated 1.2 Gb of sequence data. Of these, 4.3 million nucleotides passed filters and aligned within the targeted regions, providing a mean coverage of 169.13 $\times$ , with 97.4% of targeted nucleotides covered at  $\geq 20\times$ . We identified 2,568 variants, including 2,129 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 439 insertion/deletion variants (INDELS). In order to identify potential pathogenic variants, we filtered out variants that were present at an allele frequency  $\geq 1\%$  in the database of SNPs (dbSNP) and in the 1000 Genomes Project Consortium (1000 Genomes Project Consortium et al. 2015) and Exome Variant Server (EVS) (NHLBI GO Exome Sequencing Project 2015) databases, as well as our in-house database of control exomes. We further prioritized variants that caused a nonsynonymous splice site or

frameshift change in a protein-coding transcript. Owing to the consanguinity of the family, but the apparent dominant transmission of AI within each branch of the family, we considered all homozygous and heterozygous variants. This led to the identification of 2 heterozygous mutations: a nonsense mutation in *COL17A1* (NM\_000494.3:c.1873C>T, p.Arg625\*) and an 8-bp deletion in *C4orf26* (NM\_001206981.1:c.39\_46del, p.Cys14Glyfs\*18). Both mutations are absent in the 1000 Genomes Project Consortium and EVS databases and in our in-house database. The *C4orf26* mutation is also absent in the Exome Aggregation Consortium (ExAC) database, whereas the *COL17A1* mutation is present in 1 out of 121,206 chromosomes assayed (Lek et al. 2015). Both mutations were validated by Sanger sequencing (Fig. 2). Raw NGS data files and Sanger sequencing files will be made available upon request.

Previously, mutations in *COL17A1* have been shown to cause AD hypoplastic AI, whereas mutations in *C4orf26* have been shown to cause AR hypomineralized AI (Murrell et al. 2007; Parry et al. 2012). Manual inspection of sequencing reads aligning to *C4orf26* did not reveal any additional mutations in this gene in IV-3. Furthermore, we did not identify any heterozygous or homozygous deletions in this gene from NGS data, suggesting that the *COL17A1* mutation was responsible for AI in this patient.

Owing to the presence of protein-disrupting mutations in 2 known AI genes, we tested the segregation of both mutations in other family members. Segregation analysis demonstrated that the *COL17A1* mutation was inherited from the affected father, III-12, who was also heterozygous for the *C4orf26* mutation. The unaffected mother was also heterozygous for the *C4orf26* mutation but lacked the *COL17A1* mutation. Surprisingly, the affected sister, IV-4, was homozygous for the *C4orf26* variant and did not carry the *COL17A1* mutation. In the second branch of the family (i.e., III-10, III-11, IV-5, and IV-6), both affected children (IV-5 and IV-6) were homozygous for the *C4orf26*



mutation and lacked the *COL17A1* mutation. Their parents were both heterozygous for the *C4orf26* deletion. Their unaffected mother lacked the *COL17A1* mutation, whereas their affected father (III-11) was heterozygous for the *COL17A1* mutation. DNA was not available for any other family members. However, given the phenotype of III-13, it is likely that she is also a heterozygous carrier of the *COL17A1* mutation. The presence of this mutation in 3 siblings suggests that it was inherited from one of the parents, that is, II-5 or II-6. However, no clinical information was available on these 2 individuals, and no DNA was available either. Interestingly, the *COL17A1* mutation segregated with individuals with pitted hypoplastic AI, whereas the *C4orf26* mutation segregated with individuals with hypomineralized-hypoplastic AI.

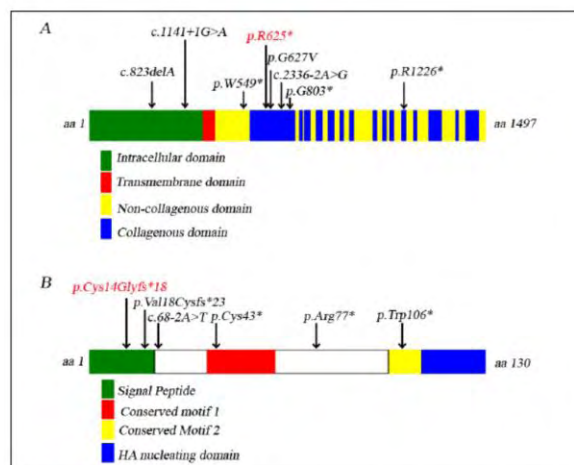
The *COL17A1* mutation introduces a premature termination codon (PTC) in the extracellular col15 domain, the largest collagenous domain in the protein. The PTC-containing transcript is expected to be degraded by nonsense-mediated decay (NMD), causing haploinsufficiency of the protein. If the transcript escapes NMD, the resulting protein would be expected to lack the C-terminal 873 aa of the protein. This protein may either be nonfunctional, causing haploinsufficiency of the gene, or may interfere with the formation of collagen trihelices, thus exerting a dominant negative effect on the wild-type protein. Although the precise mechanism is unclear, the mutation is expected to abrogate normal protein expression/function. The position of this mutation in the protein sequence of *COL17A1* is shown in Figure 3A with respect to those of previously reported mutations in the gene that were associated with an isolated enamel phenotype in the heterozygous state (McGrath et al. 1996; Floeth and Bruckner-Tuderman 1999; Vaisanen et al. 2005; Murrell et al. 2007; Prasad et al. 2016).

The *C4orf26* mutation is expected to cause a loss of function of the gene, similarly to previously reported mutations in this gene (Parry et al. 2012) (Fig. 3B). The deletion causes a frameshift that introduces a PTC at 32 aa of the 130 aa protein. If the RNA transcript is not degraded by NMD, the resulting protein is expected to be nonfunctional as it would lack important protein motifs (Fig. 3B).

Therefore, we posit that both mutations cause AI in this family in a mutually exclusive manner. The *COL17A1* mutation is responsible for hypoplastic AI in the heterozygous state, whereas the *C4orf26* mutation is responsible for hypomineralized-hypoplastic AI in the homozygous state. The presence of the *COL17A1* mutation in 1 individual in the heterozygous state in the ExAC database may either be a false-positive call from NGS data or may be an individual who was recruited in spite of their AI phenotype, which can sometimes be discrete.

## Discussion

We have identified 2 novel mutations in *COL17A1* and *C4orf26* responsible for AI in a single consanguineous family. Our study presents an unusual and rather unique family, highlighting the genetic and clinical heterogeneity of AI and the advantage of using an NGS approach for the molecular diagnosis of



**Figure 3.** Location of known *COL17A1* and *C4orf26* mutations implicated in nonsyndromic amelogenesis imperfecta. **(A)** Protein structure of *COL17A1* (adapted from Pasmojij et al. 2007) and annotated with mutations that have been described to cause enamel defects in the heterozygous state. The mutation described in this study is shown in red. The remaining mutations were described in Murrell et al. (2007) (c.823delA), Prasad et al. (2016) (c.1141+1G>A, p.W549\*, G803\*), McGrath et al. (1996) (G627V), Vaisanen et al. (2005) (c.2336-2A>G), and Floeth and Bruckner-Tuderman (1999) (p.R1226\*). **(B)** Protein structure of *C4orf26* (adapted from Parry et al. 2012) and annotated with known pathogenic mutations. The mutation described in this study is shown in red. The remaining mutations were described in Parry et al. (2012).

this group of diseases. Our article also exemplifies the phenotype-genotype correlation between certain forms of AI and the underlying genetic mutation.

Biallelic mutations in *COL17A1* are known to be responsible for junctional epidermolysis bullosa (JEB), non-Herlitz type, a very rare AR disorder characterized by skin and mucosal blistering, nail dystrophy, and enamel defects (McGrath et al. 1995). Some heterozygous carriers have been reported to manifest enamel defects (McGrath et al. 1996; Floeth and Bruckner-Tuderman 1999; Murrell et al. 2007). This is consistent with the finding that mutations in *LAMB3* and *LAMA3*, genes originally identified as responsible for AR JEB, were also identified in autosomal-dominant amelogenesis imperfecta (AD AI) (Yuen et al. 2012; Poulter et al. 2014b). We recently showed that *COL17A1* is likely a major gene responsible for AD AI, with 8% of our AI cohort carrying a heterozygous deleterious mutation in this gene (Prasad et al. 2016). *COL17A1*, *LAMB3*, and *LAMA3* all encode proteins that form components of the hemidesmosome, an important junctional adhesion structure that binds epithelial cells to the underlying mesenchyme (Borradori and Sonnenberg 1999). Studies in a mouse *Coll17a1* knockout model demonstrated that *Coll17a1* is expressed in presecretory, secretory, and maturation-stage ameloblasts (Asaka et al. 2009). Furthermore, ameloblasts from *Coll17a1*<sup>-/-</sup> showed reduced differentiation, lack of Tomes processes, and reduced enamel matrix secretion, leading to malformed enamel rods and an irregular enamel matrix (Asaka et al. 2009). This is consistent with the hypoplastic thin or pitted enamel phenotype



seen in our patients and previously described and illustrated by Murrell et al. (2007) and Prasad et al. (2016).

The molecular mechanism by which heterozygous mutations in *COL17A1* cause AI is unclear. Discovery of the G627V mutation, which destabilizes triple-helix folding in vitro, suggested a dominant negative effect (Tasanen et al. 2000). However, subsequent discovery of the c.823delA mutation that leads to a complete lack of gene products complicated this picture. Of the remaining *COL17A1* mutations identified to date to cause AD AI (Fig. 3), all are either nonsense or splice-site mutations. The nonsense mutations are expected to cause NMD of the mutated transcript, leading to haploinsufficiency of the gene product. However, if these transcripts escape NMD, they could be translated into incomplete protein fragments that may exert a dominant negative effect on homotrimer formation. For example, the c.2336-2A>G mutation is expected to cause in-frame exon deletion and the loss of 9 amino acids in the protein that is expected to disrupt the structure of the homotrimer (Chavanas et al. 1997), consistent with a dominant negative effect. Yet, a patient carrying a homozygous c.2336-2A>G mutation was found to have a complete lack of *COL17A1* mRNA (Chavanas et al. 1997), casting doubt once again on the pathogenic mechanism of this mutation. Similarly, the c.1141+ 1G>A mutation is expected to cause either in-frame skipping of exon 14 or retention of exon 14 with the introduction of a PTC (Prasad et al. 2016). Further molecular and biochemical studies in patient samples will be necessary to determine the precise molecular mechanism of the pathogenicity of heterozygous *COL17A1* mutations in AI.

Our study is only the second report of mutations in *C4orf26* in AI. Consistent with the observations of Parry et al. (2012), individuals in our study who were homozygous for the 8-bp deletion in *C4orf26* had a hypomineralized form of AI, with yellowish-brown and hypomineralized enamel with partial, mild developmental hypoplasia, whereas heterozygous carriers had normal dentition. Interestingly, although IV-5 and IV-6 carry the same homozygous mutation, the phenotype seems more severe in IV-5, whose enamel is very colored due to the absorption of extrinsic pigments and some posteruptive enamel breakdown (clearly visible in the lower incisors in Fig. 1H). This image was taken when the patient was in his permanent dentition stage. The photograph of IV-6, on the other hand, was taken when he was in his primary dentition stage (Fig. 1K). The lighter enamel coloration as compared to IV-5 may be due to reduced enamel thickness in the primary dentition. The panoramic radiograph (Fig. 1L), which was taken during the mixed dentition phase, demonstrates the absence of contrast between enamel and dentin, the hallmark of hypomineralized AI. Although the exact role of *C4orf26* in amelogenesis is unknown, it is thought to play a role in hydroxyapatite crystallite growth (Parry et al. 2012). This is consistent with the presence of hypomineralized enamel in patients with a mutation in this gene.

Disease transmission in a consanguineous family is usually assumed to be the result of mutations that are homozygous by descent. Therefore, the consanguineous family that we present here is very unusual and interesting because of the segregation of mutations in 2 different genes. Although such a situation is rather rare, there has been some precedent in the literature for

consanguineous families segregating mutations at different loci responsible for the same or similar disease. For example, a large consanguineous Lebanese family with multiple individuals from distinct sibships all affected with Bardet-Biedl syndrome, a rare pleiotropic ciliopathy, was found to be segregating 3 mutations in 2 different genes: *BBS2* and *BBS10* (Laurier et al. 2006). Similarly, a consanguineous nuclear family with multiple siblings affected with either nonsyndromic retinitis pigmentosa (RP) or RP associated with hearing loss was found to be segregating mutations in 2 genes: in *MYO7A* in individuals with syndromic RP and in *PDE6B* in individuals with nonsyndromic RP (Goldenberg-Cohen et al. 2013). The elucidation of the genetic cause of AI in the family presented herein was no doubt facilitated by the use of targeted NGS, as we were able to simultaneously screen all known genes responsible for this genetically and phenotypically extremely heterogeneous disease. To the best of our knowledge, this is the only reported consanguineous AI family segregating mutations at distinct loci. The now prevalent use of NGS-based analyses will likely reveal further such unusual cases.

In conclusion, we have used targeted NGS to dissect the genetics of AI in a large consanguineous family segregating different AI subtypes. In doing so, we have identified novel mutations in *COL17A1* and *C4orf26* that are responsible for distinct forms of AI.

#### Author Contributions

M.K. Prasad, contributed to conception, design, data acquisition, analysis, and interpretation, drafted the manuscript; S. Laouina, contributed to data acquisition, drafted the manuscript; M. El Alloussi, contributed to data acquisition and analysis, critically revised the manuscript; H. Dollfus, contributed to conception and design, critically revised the manuscript; A. Bloch-Zupan, contributed to conception, design, data acquisition, analysis, and interpretation, critically revised the manuscript. All authors gave final approval and agree to be accountable for all aspects of the work.

#### Acknowledgments

The authors thank the family members for their invaluable contribution and generous help throughout the investigations. They confirm that there are no conflicts of interest associated with this publication. This work was supported by grants from the French Ministry of Health (National Program for Clinical Research, PHRC 2008 N°4266 Amelogenesis imperfecta), the EU-funded project (ERDF; A27 "Oro-dental manifestations of rare diseases," supported by the RMT-TMO Offensive Sciences Initiative, INTERREG IV Upper Rhine program, and INTERREG V RARENET program), grant ANR-10-LABX-0030-INRT, and a French state fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir (ANR-10-IDEX-0002-02). This research was funded by the University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS) as part of a USIAS fellowship granted to A. Bloch-Zupan. The Moroccan-French collaboration is subsidized through INSERM/CNRS 2015/2016 joint agreement project "Phénotype/Génotype: amélogenèses imparfaites et familles marocaines." The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.



## References

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 526(7571):68–74.
- Asaka T, Akiyama M, Domon T, Nishie W, Natsuga K, Fujita Y, Abe R, Kitagawa Y, Shimizu H. 2009. Type xvii collagen is a key player in tooth enamel formation. *Am J Pathol*. 174(1):91–100.
- Bardet C, Courson F, Wu Y, Khaddam M, Salmon B, Ribes S, Thumfart J, Yamaguti PM, Rochefort GY, Figueres ML, et al. 2015. Claudin-16 deficiency impairs tight junction function in ameloblasts, leading to abnormal enamel formation. *J Bone Miner Res*. 31(3):498–513.
- Borradori L, Sonnenberg A. 1999. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol*. 112(4):411–418.
- Chavanas S, Gache Y, Tadini G, Pulkkinen L, Uitto J, Ortonne JP, Meneguzzi G. 1997. A homozygous in-frame deletion in the collagenous domain of bullous pemphigoid antigen bp180 (type xvii collagen) causes generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 109(1):74–78.
- Cobourne MT, Sharpe PT. 2013. Diseases of the tooth: the genetic and molecular basis of inherited anomalies affecting the dentition. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2(2):183–212.
- Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A. 2007. Amelogenesis imperfecta. *Orphanet J Rare Dis*. 2:17.
- Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu T, Escamilla M, MacDougall M. 2005. Dlx3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Am J Med Genet A*. 133A(2):138–141.
- El-Sayed W, Parry DA, Shore RC, Ahmed M, Jafri H, Rashid Y, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Kirkham J, Inglehearn CF, et al. 2009. Mutations in the beta propeller wdr72 cause autosomal-recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 85(5):699–705.
- Floeth M, Bruckner-Tuderman L. 1999. Digenic junctional epidermolysis bullosa: mutations in col17a1 and lamb3 genes. *Am J Hum Genet*. 65(6):1530–1537.
- Goldenberg-Cohen N, Banin E, Zalzstein Y, Cohen B, Rotenstreich Y, Rizel L, Basel-Vanagaite L, Ben-Yosef T. 2013. Genetic heterogeneity and consanguinity lead to a “double hit”: homozygous mutations of myo7a and pde6b in a patient with retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 19:1565–1571.
- Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, Wright JT. 2004. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet*. 41(7):545–549.
- Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP. 2007. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs*. 186(1):78–85.
- Huckert M, Stoetzel C, Morkmued S, Laugel-Haushalter V, Geoffroy V, Muller J, Clauss F, Prasad MK, Obry F, Raymond JL, et al. 2015. Mutations in the latent tgf-beta binding protein 3 (ltbp3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 24(11):3038–3049.
- Jaureguierry G, De la Dure-Molla M, Parry D, Quentric M, Himmerkus N, Koike T, Poulter J, Klootwijk E, Robinette SL, Howie AJ, et al. 2012. Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive fam20a mutations. *Nephron Physiol*. 122(1–2):1–6.
- Kim JW, Lee SK, Lee ZH, Park JC, Lee KE, Lee MH, Park JT, Seo BM, Hu JC, Simmer JP. 2008. Fam83h mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 82(2):489–494.
- Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, Hu JC. 2005. Mmp-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet*. 42(3):271–275.
- Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U, Pettersson U. 1991. A deletion in the amelogenin gene (amg) causes x-linked amelogenesis imperfecta (aih1). *Genomics*. 10(4):971–975.
- Laurier V, Stoetzel C, Muller J, Thibault C, Corbani S, Jalkh N, Salem N, Chouery E, Poch O, Licaire S, et al. 2006. Pitfalls of homozygosity mapping: an extended consanguineous Bardet-Biedl syndrome family with two mutant genes (bbs2, bbs10), three mutations, but no triallelism. *Eur J Hum Genet*. 14(11):1195–1203.
- Lek M, Karczewski K, Minikel E, Samocha K, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria A, Ware J, Hill A, Cummings B, et al. 2015. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. [accessed 2016 Jul 18]. <http://biorxiv.org/content/biorxiv/early/2015/10/30/030338.full.pdf>.
- McGrath JA, Gatalica B, Christiano AM, Li K, Owaribe K, McMillan JR, Eady RA, Uitto J. 1995. Mutations in the 180-kd bullous pemphigoid antigen (bpag2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (col17a1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat Genet*. 11(1):83–86.
- McGrath JA, Gatalica B, Li K, Dunnill MG, McMillan JR, Christiano AM, Eady RA, Uitto J. 1996. Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication mutation in the type xvii collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition. *Am J Pathol*. 148(6):1787–1796.
- Murrell DF, Pasmooij AM, Pas HH, Marr P, Klingberg S, Pfendner E, Uitto J, Sadowski S, Collins F, Widmer R, et al. 2007. Retrospective diagnosis of fatal bp180-deficient non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa suggested by immunofluorescence (if) antigen-mapping of parental carriers bearing enamel defects. *J Invest Dermatol*. 127(7):1772–1775.
- NHLBI GO Exome Sequencing Project. Exome Variant Server. [accessed 2015 Feb 01]. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
- Parry DA, Brookes SJ, Logan CV, Poulter JA, El-Sayed W, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Sayed J, Raif el M, Shore RC, et al. 2012. Mutations in C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 91(3):565–571.
- Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, Bloch-Zupan A, Carlos R, Carr IM, Downey LM, et al. 2009. Mutations in ennm4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 84(2):266–273.
- Parry DA, Poulter JA, Logan CV, Brookes SJ, Jafri H, Ferguson CH, Anwari BM, Rashid Y, Zhao H, Johnson CA, et al. 2013. Identification of mutations in slc24a4, encoding a potassium-dependent sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*. 92(2):307–312.
- Pasmooij AM, Pas HH, Jansen GH, Lemmink HH, Jonkman MF. 2007. Localized and generalized forms of blistering in junctional epidermolysis bullosa due to col17a1 mutations in the Netherlands. *Br J Dermatol*. 156(5):861–870.
- Poulter JA, Brookes SJ, Shore RC, Smith CE, Abi Farraj L, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. 2014a. A missense mutation in itgb6 causes pitted hypomineralized amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 23(8):2189–2197.
- Poulter JA, El-Sayed W, Shore RC, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. 2014b. Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in lamb3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta. *Eur J Hum Genet*. 22(1):132–135.
- Poulter JA, Murillo G, Brookes SJ, Smith CE, Parry DA, Silva S, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ. 2014c. Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 23(20):5317–5324.
- Prasad MK, Geoffroy V, Vicaire S, Jost B, Dumas M, Le Gras S, Switala M, Gasse B, Laugel-Haushalter V, Paschaki M, et al. 2016. A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orofacial involvement. *J Med Genet*. 53(2):98–110.
- Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. 1998. Identification of a mutation in dlx3 associated with tricho-dento-osseous (tdo) syndrome. *Hum Mol Genet*. 7(3):563–569.
- Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ. 2001. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum Mol Genet*. 10(16):1673–1677.
- Ratbi I, Falkenberg KD, Sommen M, Al-Sheqaih N, Guaoua S, Vandeweyer G, Urquhart JE, Chandler KE, Williams SG, Roberts NA, et al. 2015. Heimler syndrome is caused by hypomorphic mutations in the peroxisome-biogenesis genes pex1 and pex6. *Am J Hum Genet*. 97(4):535–545.
- Schossig A, Wolf NI, Fischer C, Fischer M, Stocker G, Pabinger S, Dander A, Steiner B, Tonz O, Kotzot D, et al. 2012. Mutations in rogd1 cause Kohlschutter-Tonz syndrome. *Am J Hum Genet*. 90(4):701–707.
- Tasanen K, Floeth M, Schumann H, Bruckner-Tuderman L. 2000. Hemizyosity for a glycine substitution in collagen xvii: unfolding and degradation of the ectodomain. *J Invest Dermatol*. 115(2):207–212.
- Vaisanen L, Has C, Franke C, Hurskainen T, Tuomi ML, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K. 2005. Molecular mechanisms of junctional epidermolysis bullosa: Col 15 domain mutations decrease the thermal stability of collagen xvii. *J Invest Dermatol*. 125(6):1112–1118.
- Wang S, Choi M, Richardson AS, Reid BM, Seymen F, Yildirim M, Tuna E, Gencay K, Simmer JP, Hu JC. 2014. Stim1 and slc24a4 are critical for enamel maturation. *J Dent Res*. 93(7 Suppl):94S–100S.
- Yuen WY, Pasmooij AM, Stellingma C, Jonkman MF. 2012. Enamel defects in carriers of a novel lama3 mutation underlying epidermolysis bullosa. *Acta Derm Venereol*. 92(6):695–696.

#### **IV- Enamel-renal syndrome with congenital heart defects and asthma: a rare association in a Moroccan child [4]**

##### Résumé

L'association entre l'AI et néphrocalcinose est appelée le syndrome email-rein (ERS). Ce syndrome regroupe des caractéristiques bucco-dentaires spécifiques : AI hypoplasique généralisée affectant la denture temporaire et permanente, un retard d'éruption, des calcifications intra-pulpaire, des follicules dentaires hyperplasiques, des rétentions dentaires, une hyperplasie gingivale.

Cet article décrit un patient de 11 ans issu d'une famille consanguine (1<sup>er</sup> degrés) qui présentait des anomalies congénitales du cœur (une dysplasie polyvalvulaire et bicuspidie), un retard d'éruption, une AI hypoplasique et un asthme. Les anomalies congénitales du cœur et le syndrome ERS représentent une rare association chez un enfant.

D'après la littérature, le diagnostic clinique suffit pour confirmer le syndrome ERS en attendant l'exploration de génotype pour le valider.

Les données médicales de patient ont permis de proposer un gène candidat *FAM20A*.

Nous avons extrait l'ADN de patient et de sa famille à partir des prélèvements salivaires. Nous avons commencé l'étude génétique et moléculaire de la famille, en attendant de recevoir les résultats de panel NGS et le séquençage Sanger pour confirmer le diagnostic [112, 269-274].

# Enamel-renal syndrome with congenital heart defects and asthma: a rare association in a Moroccan child

Samir Laouina<sup>a</sup>, Agnes Bloch Zupan<sup>b,c,d</sup> and Mustapha El alloussi<sup>a</sup>

Clinical Dysmorphology 2016, 00:000–000

AQ2

<sup>a</sup>Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dental Medicine Rabat, University Mohammed V Rabat, Rabat, Morocco, <sup>b</sup>Centre de Référence des Manifestations Odontologiques des Maladies Rares, Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), <sup>c</sup>Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France and <sup>d</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire and Cellulaire-Centre Européen de Recherche en Biologie et en Médecine, CNRS UMR7104, INSERM U964

Correspondence to Samir Laouina, Faculty of Dental Medicine Rabat, University Mohammed V Rabat, Rabat Instituts, Avenue Allal el Fassi, rue Mohammed Jazouli cité Al Irfane, BP 6212 Rabat, Morocco  
Tel: +212 661 113 040; e-mail: samirlaouina@gmail.com

AQ3

Received 3 June 2016 Accepted 26 July 2016

## List of key features

Enamel-renal syndrome  
Congenital heart defects  
Asthma

## Summary

Enamel-renal syndrome (ERS, OMIM 204690) is an autosomal recessive disorder characterized by severe enamel hypoplasia on the primary and secondary dentition, pulp stones, delayed or failed eruption of secondary dentition, gingival overgrowth, and nephrocalcinosis (Wang *et al.*, 2013). The clinical diagnosis of ERS in children is made on the basis of the presence of at least four major criteria (generalized thin hypoplastic or absent enamel, primary and permanent teeth affected, intrapulpal calcifications, and failed tooth eruption) (De la Dure-Molla *et al.*, 2014). Nephrocalcinosis in children may not appear until later in life and its detection requires further clinical investigation (Wang *et al.*, 2013). Several case reports have been published; however, congenital heart defects and asthma associated with ERS have never been reported. Here, we describe a rare association of ERS and heart defects in a Moroccan child.

An 11-year-old Moroccan boy was referred to the Department of Pediatric Dentistry with a complaint of discolored primary and permanent teeth, which showed some thermal sensitivity. A detailed medical and dental examination was performed and a social history was obtained.

The patient was the second child of a healthy consanguineous couple (first degree). Both parents have normal teeth. No dental problems were reported in other family members. A detailed medical, dental, and social history of the family was obtained. The medical history and general physical condition were unremarkable. The boy was born at term by cesarean delivery after a normal pregnancy. At the age of 5 years, he was hospitalized several times to investigate the cause of asthma, chest pains, and shortness of breath. He was small and thin,

with a mild facial dysmorphology (triangular face, tall forehead, almond-shaped eyes, and large nose), but in general, very average looking. An examination of his cardiovascular, respiratory system showed a prolapsed mitral and aortic bivalvular with bicuspid aortic valve.

## Investigations

At the age of 11 years, he experienced occasional episodes of shortness of breath and fatigue, and was re-investigated. Color Doppler echocardiogram confirmed dysplasia of the mitral, aortic, and tricuspid valves, with leaky bicuspid aortic valves. These changes resulted in regurgitations and a dilation of the left ventricle. Neither pulmonary arterial hypertension nor rheumatic fever was reported.

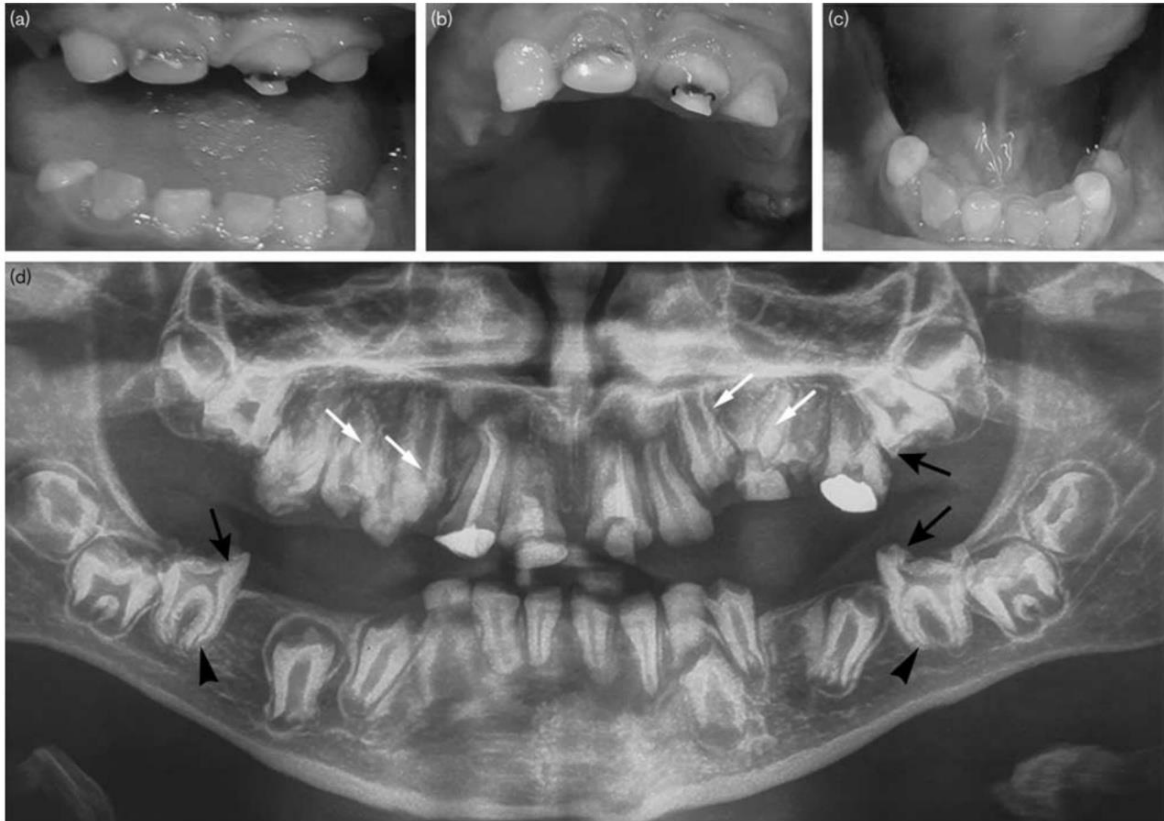
Treatment by angiotensin-converting enzyme inhibitors was prescribed.

Extraoral examination did not indicate any relevant findings. Intraoral examination showed that primary and permanent dentition were affected by hypoplastic amelogenesis imperfecta, with yellow to yellowish-brown teeth presenting rough surfaces, and conspicuous and irregular defects. The dentition had obvious gaps, the crowns were shorter, and the gums were enlarged. Enamel layer thickness was reduced, even sometimes absent, in both primary and permanent teeth (Fig. 1).

Radiographic examination showed deciduous teeth and incomplete permanent dentition with the delayed eruption of several teeth (premolar and molar teeth). Crown resorption of nonerupted teeth (third molar) was observed. No density difference was observed between enamel and dentin. The nonerupted teeth presented with complete root formation, and yet showed dilacerations and increased curvature. A mild taurodontism in permanent teeth was also observed. A diagnosis of hypoplastic amelogenesis imperfecta with delayed eruption of the permanent teeth was made. As this type of amelogenesis imperfecta can be associated with other



Fig. 1



AQ+

A frontal view (a), maxillary and mandibular occlusal views (b, c) showed that primary and permanent dentition are affected by hypoplastic amelogenesis imperfecta, with yellow to yellowish-brown teeth presenting rough surfaces, and a conspicuous and irregular defect. A panoramic radiograph (d) showed deciduous teeth and incomplete permanent dentition with the delayed eruption of several teeth (long white arrow), crown resorption of nonerupted teeth (long black arrows), and complete root formation with curvatures (short black arrows).

organ and metabolic abnormalities, further investigations were carried out (Fig. 1).

A renal ultrasound scan and a noncontrast computed tomography scan were normal and showed no evidence of nephrocalcinosis. Laboratory findings, including serum electrolytes, calcium, phosphate, urea, creatinine, alkaline phosphatase, and parathormone levels, were all normal. Blood pressure was also normal.

### Discussion

ERS has been described previously predominantly in children. Macgibbon (1972) reported a brother and sister with absent enamel, nephrocalcinosis, and apparently normal calcium metabolism. Wang *et al.* (2014) described two families, one of Irish and Norwegian descent and one of Mexican descent, with an autosomal recessive disorder characterized by severe enamel hypoplasia, delayed and failed tooth eruption, misshapen teeth, intrapulpal calcifications, and localized gingival hyperplasia. The 12-year-

old girl from family 1 tested negative for nephrocalcinosis, and members of family 2 declined kidney ultrasound analysis. Wang *et al.* (2014) noted that not much is known about the age of onset of nephrocalcinosis in this disorder

Recently, De la Dure-Molla *et al.* (2014) have established oral diagnosis criteria that include clinical, radiographic, and microscopic features characteristic of this syndrome, along with the presence of renal abnormalities. Almost all the findings in our case fulfill these criteria (generalized thin hypoplastic or absent enamel, primary and permanent teeth affected, delayed tooth eruption, root dilacerations of impacted teeth, and spaced teeth), except for a few mentioned below. Intrapulpal calcifications were absent and an abnormal pathway of eruption was not evident in the second molars. Thickening of the maxillary or nasal sinus lining was not observed. In light of the ERS clinical phenotype, our patient underwent a

renal evaluation by nephrology specialists. No renal abnormalities were observed.

Although the ERS clinical phenotype is evident in childhood, the renal involvement is clinically silent at this age and requires further investigation for detection. Using the orodental clinical features, the diagnosis of ERS can be made in children solely on the basis of enamel defects and radiographic features observed on panoramic radiographs (De la Dure-Molla *et al.*, 2014).

Thus, the present case was diagnosed with ERS, which underscores the fact that all such cases may not necessarily present with renal abnormalities, as reported earlier (Wang *et al.*, 2014). Interestingly, in all previously published cases of ERS, no heart abnormalities and asthma have been simultaneously reported. In our case, the patient was diagnosed clinically as ERS with polyvalvular dysplasia, bicuspid aortic valve, and asthma.

The combination of polyvalvular dysplasia and bicuspid aortic valve and other heart abnormalities in children has been reported (Bharati and Lev, 1973), as well as congenital heart defects (CHD). Various studies have shown the etiology of congenital heart defects and its pattern of inheritance to be of multifactorial origin (Nabulsi *et al.*, 2003). A review of the literature showed that consanguinity (Yunis *et al.*, 2006) and a variety of maternal ailments for example, infections, maternal smoking, and gestational diabetes mellitus play a major role in the development of CHD.

In our case, the clinical data, laboratory findings, and family history suggested that the consanguinity may be the underlying etiology of the CHD, but currently, there is insufficient evidence to confirm this supposition as the direct cause.

The clinical features appear to have some features of a hereditary condition. The mode of inheritance appeared to be autosomal recessive because of consanguinity and a negative family history for any bone or dental abnormalities.

#### Conclusion

The specific heart defects and ERS described here represent a rare association and further research is necessary to clarify the genetic defect responsible for this association.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the cooperation of the patient's family.

#### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

#### References

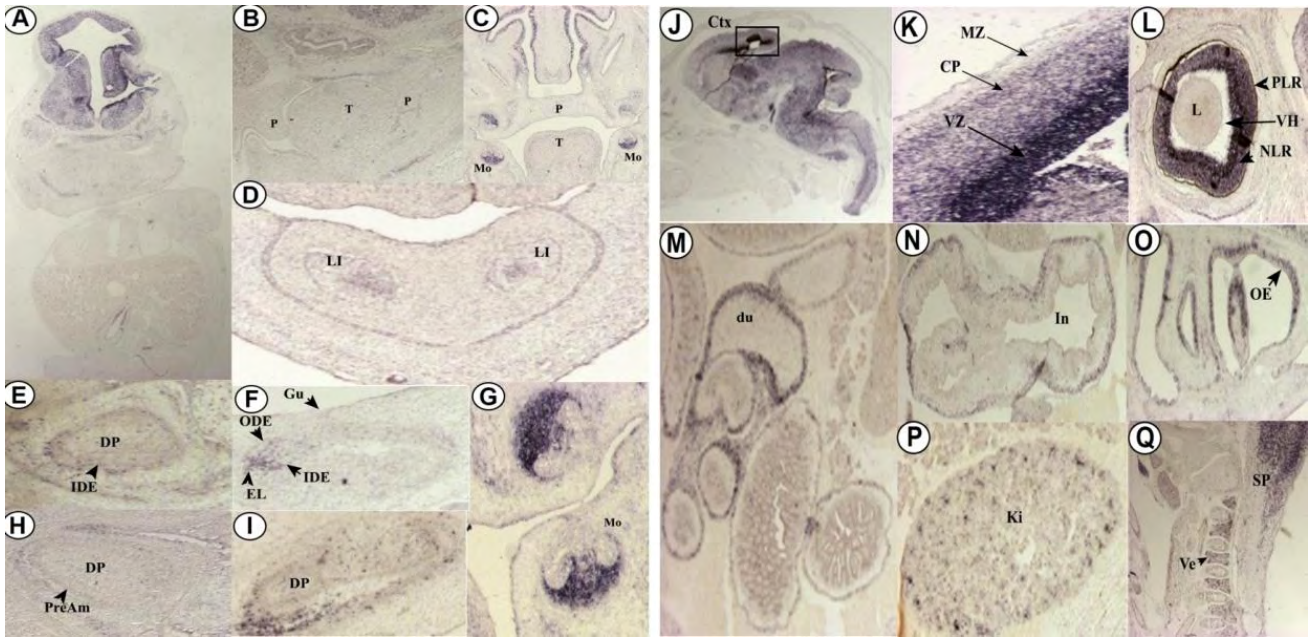
- Bharati S, Lev M (1973). Congenital polyvalvular disease. *Circulation* **47**:575–586.
- De la Dure-Molla M, Quentric M, Yamaguti PM, Acevedo AC, Mighell AJ, Vikkula M, *et al.* (2014). Pathognomonic oral profile of enamel renal syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations. *Orphanet J Rare Dis* **9**:84.
- Macgibbon D (1972). Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction. *Aust Dent J* **17**:61–63.
- Nabulsi MM, Tamim H, Sabbagh M, Obeid MY, Yunis KA, Bitar FF (2003). Parental consanguinity and congenital heart malformations in a developing country. *Am J Med Genet A* **116A**:342–347.
- Wang SK, Aref P, Hu Y, Milkovic RN, Simme JP, EL-Khateeb M, *et al.* (2013). FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS). *PLoS Genet* **9**: e1003302.
- Wang SK, Reid BM, Dugan SL, Roggenbuck JA, Read L, Aref P, *et al.* (2014). FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome. *J Dent Res* **93**:42–48.
- Yunis K, Mumtaz G, Bitar F, Chamseddine F, Kassab M, Rashkidi J, *et al.* (2006). Consanguineous marriage and congenital heart defects: a case-control study in the neonatal period. *Am J Med Genet A* **140**:1524–1530.

## V- Validation d'un nouveau gène

Les transcrits de gène *X* ont été détectés dans plusieurs tissus et organes en développement chez la souris.

L'expression a été observée au niveau des vertèbres dans le tronc (**Figure 21. Q.**) L'expression a été aussi détectée dans le cortex néopallium (future cortex cérébral), le ventricule et les zones sous ventriculaire des vésicules cérébrales en développement (**Figure 21 A, J et K**) et dans les cellules entourant la lumière du tube neural (le primordium de la moelle épinière). Une forte expression dans la couche neurale et la couche pigmentaire de la rétine (**Fig.L.**). Une expression a été détectée également dans l'épithélium olfactif (**Figure O.**) et dans la région corticale du rein gauche (**Figure 21 P**). Les transcrits de gène *X* ont été détectés dans l'intestin grêle et le gros intestin, avec une expression plus visible dans le compartiment du muscle (**Figure 21 M et N.**).

L'expression de gène *X* a été étudiée au cours de l'odontogenèse, les transcrits de gène *X* sont retrouvés dans le compartiment épithélial des dents (**Figure 21 B,C,D,E,F,G,H, et I**) au stade E12.5 dans l'ectoderme oral (faiblement) au niveau de palais et de la langue ; au stade E14.5 les transcrits étaient disséminés dans le mésenchyme dentaire avec un marquage fort au niveau du nœud de l'émail et le périchondre du cartilage de Meckel (MC) ; au stade E16.5 le marquage était restreint à la partie postérieure de l'incisive inférieure (section sagittale) et sur la première molaire inférieure à la papille dentaire mésenchymateuse et au stade E18.5 le signal détecté dans l'incisive était faible et pointillé, pour la première molaire inférieure le marquage était restreint à la papille dentaire mésenchymateuse et particulièrement vers la zone en face à la boucle épithéliale à partir de laquelle la racine se développe.



**Figure 21** : Analyse de la distribution des transcrits de gène X chez la souris par in situ hybridation.

Des sections sélectionnées illustrant les caractéristiques d'expression de gène X dans les vésicules cérébrales en développement, le rein et les viscères sont présentées dans les panneaux (A et J à Q), Tandis que les autres panneaux se concentrent sur les incisives (D, E et G) les molaires (C, F, I et H) développement dentaire. Les stades de développement et les plans de coupe sont: E12.5 frontal (A et B) E14.5 frontale (C, D et G), E16.5 sagittal (E, F, J et K); E18.5 sagittal (H, I, L, M, N, O, P et Q) sections. Ctx, cerebral cortex; CP, cortical plate; DP, dental papilla; EL, epithelial loop; Gu, gubernaculum; IDE, inner dental epithelium; In, intestine (duodenum); IZ, intermediate zone; Ki, kidney; L, lens; LI, lower incisor; MZ, marginal zone; Mo, molar; NC, neopallial cortex; NLR, neural layer of retina; NT, neural tube; ODE, outer dental epithelium; OE, olfactory epithelium; P, palatal shelves; PLR, pigment layer of retina; PreAm, préaméloblastes; SP, spinal cord; To, tongue; VB vitreous body Ve, vertebrae; VH, vitreous humour; VZ, ventricular zone. Scale bars: 10 µm (A et J); 40 µm (B-D et K-Q); 50 µm (E-I et K).



## DISCUSSION-PERSPECTIVES

Les amélogénèses imparfaites sont des affections génétiques rares présentant une grande variabilité d'expressions cliniques. Elles peuvent exister de manière isolée ou être associées à d'autres symptômes dans le cadre de syndromes, de maladies rares. La classification des AI a connu une évolution avec le temps pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients atteints de cette pathologie. En effet, plusieurs classifications sont proposées en se basant sur le phénotype clinique, le mode de transmission et les gènes impliqués. Etant donnée la variabilité clinique d'une part, et les connaissances génétiques limitées d'autre part, il semble important de réviser les critères de ces classifications.

La relation phénotype/génotype des AI est parfois floue, la frontière entre les AI isolées et les AI syndromiques n'est pas toujours évidente. D'une part, certains gènes sont à l'origine d'une AI isolée, ils peuvent se retrouver dans une AI syndromique (exemple : *AMELX*, *DLX3*). D'autre part, des gènes comme *LAMB3*, *LAMA3*, *COL17A1* sont responsables en cas des mutations homozygotes du syndrome de l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle. Ils peuvent également être à l'origine d'une AI hypoplasique isolée en cas des mutations hétérozygotes.

Dans la mesure où différents types des AI (hypoplasique, hypomature, hypominéralisée) peuvent coexister chez un même patient, voire sur une même dent, le diagnostic clinique est parfois difficile. Enfin, pour certaines pathologies, les données cliniques générales sont bien répertoriées or les informatiques bucco-dentaires sont limitées.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse sont tous inscrits dans le contexte d'une meilleure compréhension de la relation phénotype/ génotype des AI pour améliorer le diagnostic et la prise en charge de cette pathologie. Une étude clinique bien détaillée permet de déterminer le phénotype clinique. Ensuite des investigations génétiques et moléculaires seront nécessaires pour identifier les bases moléculaires et les gènes responsables des AI.

Le premier axe de ce travail de thèse a consisté à exploiter les résultats du panel NGS dans le cadre du projet Offensive Sciences Interreg IV Manifestations bucco-dentaires des maladies rares ([www.genosmile.org](http://www.genosmile.org)) ayant développé un outil de séquençage de nouvelle génération (NGS) ciblé sur les anomalies dentaires. Les outils de séquençage nouvelle génération sont des outils révolutionnaires pour la génétique humaine en diagnostic et en recherche. Grâce à cette technique, 21 nouveaux variants pathogènes ont été découverts et la mutation causale a été identifiée chez 39 patients dans les gènes connus (taux diagnostic global 39%). Parmi les 50 patients atteints d'AI isolée dans la cohorte étudiée et malgré l'inclusion d'un plus grand nombre de gènes connus des AI, le taux de diagnostic définitif est de 27%.

Ce pourcentage est légèrement inférieur aux taux de diagnostic rapportés par d'autres études qui ont effectué le séquençage de gènes candidats dans de grandes cohortes des AI [224, 242]. Ce taux de diagnostic inférieur peut être s'expliqué par le nombre de cas simplex recrutés dans l'étude (31 cas). Le taux de diagnostic des AI syndrome était faible dans l'étude (7%). Cela est probablement dû à l'inclusion de patients sans diagnostic clinique clair.

Pour les difficultés rencontrées et les limites des techniques NGS. L'analyse des données NGS est souvent difficile et elle ne donne pas toujours de résultat probant. Les variants sont très nombreux et de pathogénicité souvent incertaine. Le manque de couverture ou le mauvais « calling » de variants, qui peuvent conduire à la non-détection d'une mutation.

Par ailleurs, la quantité importante de résultats générés par les NGS pose un problème de gestion et de stockage ainsi une question éthique concernant l'archivage et l'utilisation future de ces résultats.

Dans le deuxième axe de ce travail, nous avons effectué une analyse génétique d'une famille consanguine qui ségrége avec 2 phénotypes cliniques (AI hypoplasique et AI hypoplasique avec hypominéralisée). En utilisant le panel NGS ciblé, nous avons identifié une nouvelle mutation non-sens hétérozygote dans le gène *COL17A1* (c. 1873C> T, p.R625\*) qui ségrége avec le phénotype AI hypoplasique et une délétion homozygote (8 bp) dans le gène *C4orf26* (c.39\_46del, p.Cys14Glyfs\*18) associée au phénotype hypomature. La validation des mutations et l'analyse de ségrégation ont été réalisées par PCR (polymerase chain reaction) suivi du séquençage Sanger (GATC, Konstanz, Germany).

Cette étude présente une famille inhabituelle et unique, mettant en évidence l'hétérogénéité génétique et la variabilité clinique des AI et l'avantage d'utiliser l'approche de panel NGS ciblé pour le diagnostic moléculaire de cette pathologie. En outre, elle illustre la corrélation phénotype-génotype entre certaines formes des AI et la mutation génétique sous-jacente.

Le mécanisme moléculaire par lequel les mutations hétérozygotes dans *COL17A1* causent les AI n'est pas clair. Alors d'autres études moléculaires et biochimiques dans des échantillons de patients seront nécessaires pour déterminer le mécanisme moléculaire précis de la pathogénicité des mutations hétérozygotes de *COL17A1* dans les AI.

Le rôle exact de *C4orf26* dans l'amélogenèse est inconnu, on pense qu'il joue un rôle dans la croissance des cristallites d'hydroxyapatite [85]. Cela est compatible avec la présence d'émail hypominéralisé chez les patients ayant une mutation dans ce gène.

Les difficultés rencontrées dans cette étude sont celles liées aux prélèvements biologiques surtout la quantité et la qualité de certains échantillons. Nous avons utilisé dans cette étude le

kit Oragene® DNA pour les prélèvements salivaires. Les avantages de ce kit sont nombreux : il n'est pas invasif (sécurité) et les conditions de conservation, de stockage longue durée (température ambiante) et de transport sont parfaites. La difficulté notable pour le kit standard, lors de l'extraction d'ADN de prélèvements des jeunes enfants, la concentration d'ADN est toujours moindre. Il faut utiliser des petites éponges pour éviter cette difficulté.

Concernant les difficultés liées à la technique de séquençage Sanger, certaines mises au point par gradient de température nécessitent d'être reprises de nombreuses fois afin de trouver les conditions idéales d'amplifications. Pour certains exons nous avons été contraints d'établir plusieurs couples d'amorces avant de pouvoir réaliser une PCR-patient.

Pour la famille consanguine présentée dans la publication 4, l'analyse de phénotype clinique et les données médicales du patient permettent de proposer un gène candidat *FAM20A*. En attendant les résultats de panel NGS et le séquençage de Sanger pour valider le diagnostic clinique et poursuivre les investigations.

Les investigations génétiques et moléculaires sont parfois freinées par les difficultés d'obtenir des échantillons salivaires pour le patient et sa famille (raisons de la distance et de la motivation). C'est le cas de la publication 1, en attendant de recevoir les échantillons de patient pour poursuivre les investigations afin de valider le diagnostic clinique.

Aussi, Il est parfois difficile d'avoir une histoire médicale détaillée pour continuer les investigations moléculaires surtout pour les 2 patients participés au panel NGS. En attendant de recevoir les données médicales complètes pour valider les mutations trouvées.

Le dernier axe de ce travail de thèse a consisté à exploiter les données d'hybridation in situ pour préciser le patron d'expression du gène *X* au cours de l'odontogenèse et l'organogenèse chez la souris.

Dans notre étude, les transcrits de gène *X* sont retrouvés au cours de l'odontogenèse depuis le stade de lame dentaire (faiblement) jusqu'au stade de cloche dentaire avancée à la fois dans le compartiment épithélial (en particulier au niveau de l'épithélium dentaire interne) et dans le compartiment mésenchymateux ; ceci aussi bien au niveau des molaires que des incisives.

Nous rapportons aussi l'expression de gène *X* dans divers tissus et des lignées cellulaires, principalement dans le cerveau, des vertèbres dans le tronc, les reins, les yeux et l'intestin grêle et le gros intestin.

L'expression de ce gène à différents stades du développement permet d'identifier et d'expliquer le rôle de ce gène candidat impliqué dans les anomalies dentaires et d'autres anomalies.

Enfin l'utilisation des approches qui combinent la biologie moléculaire, la biologie du développement, l'étude de modèles murins et l'analyse des phénotypes cliniques chez les patients concernés permet d'améliorer les connaissances en matière de développement bucco-dentaire, en comprenant les mécanismes d'action et interactions des gènes. Ces recherches permettront également une amélioration de diagnostic ainsi la prise en charge des patients atteints des amélogénèses imparfaites et de proposer de nouvelles thérapies (l'ingénierie tissulaire...)

Ces travaux s'inscrivent également dans le projet RARENET cofinancé par le FEDER de l'UE dans le cadre du programme INTERREG V Rhin supérieur ([www.rarenet.eu](http://www.rarenet.eu)).

## **Conclusion**

Les amélogénèses imparfaites sont des maladies génétiques rares présentant une grande variabilité d'expressions cliniques affectant généralement les deux dentures (temporaire et

permanente). Le diagnostic de ces maladies est basé sur des données aussi bien cliniques, radiographiques que familiales. Le diagnostic génétique n'est disponible à ce stade que dans le cadre d'un protocole de recherche.

Les anomalies bucco-dentaires et en particulier les amélogénèses imparfaites font partie des signes rencontrés dans plusieurs syndromes génétiques et peuvent être à l'origine de la découverte d'un syndrome. Ces anomalies doivent orienter le patient vers les services adéquats (médecin généraliste, pédiatre, radiologue, généticien...). Pour cette raison là, la France a adaptée deux plans nationaux des maladies rares (PNMR) ayant un but d'améliorer la prise en charge des patients atteints des maladies rares. En créant des réseaux de diagnostic pluridisciplinaires (dentiste, généticien, radiologue, pédiatre...) pour faciliter la communication entre les professionnels et réduire les délais diagnostiques.

Ce travail démontre l'utilité de la recherche translationnelle pour élucider la pathophysiologie des amélogénèses imparfaites et comprendre les corrélations phénotype-génotype de ces pathologies. La stratégie de recherche est centrée sur l'étude de familles informatives. En commençant par l'analyse du phénotype clinique des patients atteints des AI, puis un protocole de recherche est mis en place au laboratoire pour identifier les mutations dans les gènes connus et les nouveaux gènes.

Ce travail a permis aussi de montrer l'utilité des techniques de séquençage Sanger et surtout le séquençage haut débit ciblé en cas de phénotype clinique exceptionnel chez des familles consanguines afin d'identifier les gènes sous jacents.

Notre projet de recherche, soutenu par une collaboration Maroc-France subventionnée par CNRST et INSERM 2015/2016 « Phénotype/Génotype : Amélogénèse imparfaite et familles marocaines » a permis d'identifier l'hétérogénéité phénotypique et génotypique de l'AI qui peut coexister au sein d'une même famille.

Pour certaines familles, le travail entrepris n'a pas permis de valider la mutation causale ou de confirmer le diagnostic clinique.

La compréhension des mécanismes d'action et les interactions des gènes impliqués dans les AI nécessitent des approches et des investigations plus approfondies, en recrutant des grandes cohortes, et en utilisant des modèles cellulaires et animaux.

Ces recherches futures vont permettre une évolution de la classification des AI afin d'améliorer le diagnostic et la prise en charge convenable des AI.

## Résumé

**Introduction :** Les amélogénèses imparfaites (AI) constituent un groupe d'anomalies du développement affectant la structure et l'apparence clinique de l'émail. Le mode de transmission peut être autosomique dominant, récessif ou lié à l'X. Cette maladie génétique peut exister sous différentes formes (hypoplasique, hypominéralisée, hypomature) et de

manière isolée ou associée à des syndromes. Plusieurs gènes impliqués dans les AI ont été identifiés, cependant de nouvelles mutations et de nouveaux gènes restent à identifier.

Le but de ce travail est de combiner l'étude de phénotype clinique et la biologie moléculaire pour améliorer la compréhension de corrélation phénotype-génotype afin de déterminer les mécanismes étiopathogéniques impliqués dans les amélogenèses imparfaites.

**Méthodes :** La stratégie de recherche de ce travail repose sur une recherche translationnelle. Elle est centrée sur l'étude des familles informatives présentant des AI de type isolées ou syndromiques, puis un protocole de recherche (séquençage haut débit ciblé, séquençage Sanger, l'étude des modèles animaux...) est mis en place. Ces stratégies ont permis d'identifier de nouvelles mutations et nouveaux gènes.

**Résultats :** Ce travail a été rendu possible grâce au soutien financier du projet CNRST/INSERM 2015/2016 « Phénotype/Génotype : Amélogenèses imparfaites et familles marocaines ». Ce projet met en avant l'intérêt des collaborations internationales et le transfert des connaissances et de l'expertise entre les chercheurs marocains et français.

**Conclusion:** Le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients atteints des amélogenèses imparfaites reposent actuellement sur la compréhension des processus complexes cliniques et génétiques impliqués dans les amélogenèses imparfaites.

Enfin, des études futures plus approfondies seront nécessaires chez une cohorte importante, en adaptant les nouvelles technologies et les outils de séquençage de nouvelle génération.

**Mots clés :** Amélogenèses imparfaites-phénotype clinique- biologie moléculaire-diagnostic-familles-mutations

### **Abstract**

**Introduction:** Amelogenesis Imperfecta (AI) is a group of developmental abnormalities affecting the structure and clinical appearance of the enamel. The mode of inheritance can be autosomal dominant, recessive or X-linked. This genetic disease can exist in different forms (hypoplastic, hypocalcified and hypomaturation) and in isolation or in association with other



syndromes. Several genes involved in AI have been identified, however new mutations and new genes remain to be identified.

The aim of this work is to combine the study of clinical phenotype and molecular biology to improve the understanding of phenotype-genotype correlation in order to determine the etiopathogenic mechanisms involved in amelogenesis imperfecta.

**Methods:** The research strategy of this work is based on a translational research. It is centered on the study of informative families presenting isolated or syndromic AI, and then a research protocol (Targeted high throughput sequencing, Sanger sequencing, study of animal models, etc.) is put in place. These strategies have allowed the discovery of novel mutations and genes in AI.

**Results:** This work was made possible through the financial support of the project CNRST/INSERM 2015/2016 « phenotype/genotype: amelogenesis imperfecta and Moroccan families ». This project highlights the interest of the international collaborations and the transfer of knowledge and the expertise between Moroccan and French researchers.

**Conclusion:** The diagnosis and the treatment of patients with amelogenesis imperfecta are based currently on the understanding of the complex clinical and genetic processes involved in AI.

Finally, further in-depth studies will be required in a large cohort, adapting new technologies and next-generation sequencing tools.

**Key words:** Amelogenesis Imperfecta- Clinical phenotype- molecular biology-diagnosis-families-mutations.

### ملخص

**مقدمة :** تشكل تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة مجموعة من تشوهات النمو التي تؤثر على البنية والمظهر الخارجي السريري لميناء الأسنان. تكون كيفية انتقال هذا المرض إما سائد أو متنحي أو مرتبط بالجنس. يوجد هذا المرض الوراثي على عدة أشكال مختلفة (مصطبغ، ناقص النضج، ناقص التمعدن)

بشكل معزول أو مرتبط بمتلازمات أخرى. وقد تم تحديد عدة جينات متسببة في تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة، لكن لا تزال طفرات جديدة وجينات جديدة سوف يتم تحديدها فيما بعد.

الهدف من هذا العمل هو الجمع بين دراسة النمط الخارجي السريري والبيولوجيا الجزيئية لتحسين فهم علاقة التركيب النمط الخارجي- الوراثة وذلك من أجل تحديد الآليات الممرضة المتسببة في تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة.

**الطرق :** تقوم الإستراتيجية البحثية لهذا العمل على أبحاث متعددة. وهي تركز على الأسر المصابة بمرض تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة من النوع المعزول أو المتلازم، ويتم تطبيق بروتوكول البحث (التسلسل عالي الإنتاج المستهدف، تسلسل سنجر ودراسة النماذج الحيوانية...) وقد حددت هذه الاستراتيجيات طفرات جديدة وجينات جديدة.

**النتائج :** تم هذا العمل بفضل الدعم المالي لمشروع التعاون CNRST / INSERM لسنة 2015 و2016 بعنوان «النمط الخارجي-الوراثة : تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة و الأسر المغربية». هذا المشروع يسلط الضوء على الفائدة من التعاون ونقل المعرفة والخبرات بين الباحثين المغاربة والفرنسيين.

**خاتمة :** يعتمد حاليا التشخيص وعلاج المرضى المصابين بمرض تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة على فهم العمليات الوراثية والسريرية المعقدة التي تنطوي عليها تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة.

وأخيرا، سوف تكون هناك حاجة إلى دراسات مستقبلية أكثر تفصيلا على عينات مهمة، والتكيف مع التقنيات الجديدة والأدوات التسلسل من الجيل التالي.

**الكلمات الرئيسية :** تكوينات ميناء الأسنان الغير الكاملة- نمط خارجي- سريري- بيولوجيا جزيئية- تشخيص- أسر- طفرات.

## ANNEXES

Liste des abréviations

a : améloblaste

AD : autosomique dominant

ADN : acide désoxyribonucléique

AI : amélogénèse imparfaite

AIGFS : amélogénèse imparfaite et syndrome de fibromatose gingivale

AR : autosomique récessif

ARN : acide ribonucléique

BBP : bleu de bromo phénol

Bmp : bones morphogenetics proteins

CNV : copy number variation

d : dentine

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

e : matrice amélaire

EEC : dysplasie ectodermique avec ectrodactylie et fente palatine

er : prisme de l'émail

ERS : email rein syndrome F : forward ou sens

Fgf : fibroblasts growth factor

IGBMC : institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire

IR ou Interrod : émail interprismatique

JED : jonction émail-dentine

kb : kilo-bases

KTZS : syndrome de Kohlschütter-Tönz

LOC : syndrome Laryngo-onycho-cutané

M : mitochondrie

MAP : mitogen activating protein

MLS : microphthalmie avec stries linéaires cutanées

NF-kB : nuclear factor-kappa B

NGS : séquençage nouvelle génération

nu : noyau

o : odontoblastes

P : périkymaties

PCR : polymérase chain reaction

PNMR : Plan National Maladies Rares

R : reverse ou antisens

R ou Rod: prisme de l'émail

rER : reticulum Endoplasmique Rugueux

RNS : syndrome de Raine

RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction

Shh : sonic hedgehog homolog

SNP : single nucleotide polymorphism

SR : stries de Retzius

TDO : syndrome tricho-dento-osseux

TE : Tris-EDTA

Tgf : transforming growth factor

Tm : température de fusion (melting temperature)

TNF : tumor necrosis factor

Tp : prolongement de Tomes

TW : terminal web

UV : ultra-violet

X : chromosome X

## **FORMULAIRE DE CONSENTEMENT**

Le Professeur / Docteur

(Nom) \_\_\_\_\_ (Prénom) \_\_\_\_\_, m'a proposé de participer au projet de recherche intitulé "Amélogénèse imparfaite héréditaire : Etude clinique histologique et/ou génétique".

Après avoir reçu oralement et par écrit toutes les informations nécessaires pour comprendre l'intérêt de cette étude, ses contraintes et ses risques éventuels, ainsi que ce qui me sera demandé de faire dans le cadre de ma participation,

après avoir pu poser les questions que je souhaitais à propos de ce projet et de ses implications sur ma prise en charge et obtenu des réponses,

je sais que je peux retirer à tout moment mon consentement à ma participation à ce projet et cela quelles que soient mes raisons et sans supporter aucune responsabilité. Le fait de ne plus participer à ce projet ne portera pas atteinte à mes relations avec mon chirurgien dentiste qui me proposera, si besoin, une autre prise en charge,

Les données me concernant à l'occasion de ce projet, font l'objet d'un traitement informatique par les organisateurs du projet,

Ce projet est accrédité par l'université Mohamed V Rabat le.....

Mon droit d'accès et de rectification prévu par la loi peut s'exercer à tout moment auprès des responsables du projet. Les données de santé à caractère personnel peuvent m'être communiquées, selon mon choix, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin que je désignerai à cet effet,

Je peux à tout moment obtenir des informations complémentaires auprès de mon médecin dentiste traitant

J'autorise l'enregistrement des données non nominatives et des photos dans le registre  
oui  non

de mes origines ethniques (via la collecte du pays et de la ville de naissance) oui  non

Ces informations peuvent aussi être utilisées à des fins d'enseignement dans l'ensemble de la communauté scientifique, voire de publication oui  non

Pour les données photos, j'autorise la diffusion éventuelle de tous les clichés, oui  non

**Seulement** des clichés intra-buccaux oui  non

#### JE DONNE MON ACCORD POUR PARTICIPER A CET ETUDE

Ma signature atteste que j'ai clairement compris les renseignements concernant ma participation à cette étude Personne(s) donnant le consentement :

Signature patient ou du tuteur légale :

Signature praticien :

Ce document est à réaliser en 2 exemplaires originaux :

Un exemplaire à conserver par la personne donnant son consentement (ou par les titulaires de l'autorité parentale si mineur)

L'autre exemplaire à conserver par le praticien

### Lettre d'information

Vous êtes invité(e) à participer au projet de recherche intitulé

«Amélogénèse imparfaite héréditaire : Etude clinique histologique et/ou génétique»



Avant d'accepter d'y participer, il est important de lire, de comprendre les renseignements qui suivent. Le présent document vous renseigne sur les modalités de ce projet. S'il y a des mots que vous ne comprenez pas n'hésitez pas à poser des questions.

Ce projet de recherche est accrédité par l'université Mohamed V.

Afin d'éclairer votre décision concernant ce projet pour lequel nous souhaitons votre participation volontaire, vous devez avoir reçu et bien compris les informations suivantes :

Le projet vise à recueillir des données bucco-dentaires et médicales en rapport avec les anomalies dentaires. Ces informations sont obtenues après **un interrogatoire sur l'histoire familiale, médicale et dentaire, un examen clinique en bouche, un bilan radiographique s'il est utile au diagnostic et la prise de documents de référence comme des photos, des moulages**. Ces examens seront effectués chez des personnes présentant des anomalies dentaires ainsi que chez d'autres membres de la famille présentant ou non les mêmes défauts afin de poser un diagnostic différentiel.

Une étude génétique après un prélèvement sanguin ou salivaire pourra être réalisée par l'équipe des généticiens partenaire dans le projet.

Les options de traitement de ces anomalies dentaires qui font partie des associations syndromiques seront expliquées aux patients ou au tuteur légal, leurs réalisations ne font pas partie du projet de recherche.

Le but de la collecte de ces données est de constituer des groupes de patients plus importants pouvant participer à des projets de recherche, de faciliter le diagnostic et la compréhension de ces défauts dentaires et maladies rares et ainsi à terme d'améliorer la prise en charge de ces pathologies.

Les données recueillies restent anonymes et vont faire l'objet d'un traitement informatique par les membres de l'équipe.

La nature des études qui seront effectuées à partir de ces données, impliquent qu'elles peuvent s'étendre sur plusieurs années et que ces données seront conservées le temps nécessaire.

Les données nominatives ne seront connues que du praticien qui vous a invité à participer au projet et du coordinateur du projet le Pr. El alloussi M.

L'ensemble des données médicales vous concernant peut également vous être communiqué, selon votre choix, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin que vous désignerez à cet effet.

Les données recueillies demeureront strictement confidentielles. Elles ne pourront être consultées que par l'équipe médicale.

Vous pouvez à tout moment demander des informations à votre praticien.

Votre participation à ce projet est volontaire. Vous avez le droit de refuser d'y participer ou de vous en retirer en tout temps. Votre décision de cesser votre participation ne vous causera aucun préjudice et vous bénéficierez de la prise en charge adaptée à votre cas.

# Fiche d'enquête

## Identification du patient :

N° de dossier :

Nom:.....Prénom:.....Sexe :      féminin                      masculin

Date et lieu de naissance :...../.../.....à

Adresse :.....Ville :.....

Téléphone :.....Email :.....

Date de la 1<sup>ère</sup> consultation : .....Age le jour de la 1<sup>er</sup> consultation :.....

Préoccupation du patient :.....

## Histoire familiale :

Date de naissance :

- Père : ...../.../.....Mère : ...../.../.....

Consanguinité des parents :      Oui  Degré ?.....  
Non

Origine :

- Mère :.....
- Père :.....
- Grands-parents maternels :
  - Grand- père:.....
  - Grand-mère :.....
- Grands-parents<sup>2</sup> paternels :
  - Grand- père:.....
  - Grand-mère:.....

Antécédents familiaux :

Maladies :.....

Fausses couches:.....

## Histoire médicale :

Grossesse:

- Médications :.....
- Episode infectieux :      Oui  Non

Si oui : Maladie :.....

Période:.....

Accouchement :

- Souffrance néonatale :      Oui  Non

Etat général :

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> R.A.S.                        | <input type="checkbox"/> Affections neurologiques       |
| <input type="checkbox"/> Affections cardio-vasculaires | <input type="checkbox"/> Affections du système digestif |
| <input type="checkbox"/> Affections endocriniennes     | <input type="checkbox"/> Autres                         |
| <input type="checkbox"/> Affections pulmonaires :      |   |

Précisez : .....

Antécédents médicaux :      Oui       Non

Lesquels : .....

Antécédents chirurgicaux :      Oui       Non

Lesquels : .....

Historique dentaire :

.....  
.....

Examen clinique :

Aspect général :

- Retard staturo-pondéral : Oui  Non
- Dysmorphie cranio-facial : Oui  Non

Examen exo- buccal :

- Face :
  - Forme du visage : Rond  Ovale  Carré
  - Symétrie : Oui  Non
  - Hauteur des étages faciaux : Egaux  Non -égaux
- Profil : Concave  Convexe  Plat
- Etage inférieur : anormale de taille (micrognathie) et de position (rétrognathie/prognathie)
- Cheveux :
  - Implantation : Basse  Haute
  - Abondance : Rare  Normal  Abondant
- Cils et sourcils : Normal  Synophrys Autre
- Yeux : Normal  Hypertélorisme  Hypotélorisme
- Oreille :
  - Taille : Petite  Normal  Grande
  - Implantation : Basse  Normal  Haute  En arrière  En avant
  - Morphologie : Normal  Atypique
- Nez : Court  Normal  Allongé  Autre .....
- Lèvres : Minces  Ep  sses  Normal
- Philtrum : Absent  Profond  Normal
- Extrémités :
  - Mains :
  - Pieds :

Examen endobuccal :

- Muqueuse :
  - Gingivite : Oui  Non
  - Secteur : .....
  - Parodontite : Oui  Non
  - Autres (aphtes, éruptions,...) : .....
- Salive :
  - Qualité : Visqueuse  Aqueuse
  - Quantité : Normal  Abondante  Rare
- Palais :
- Langue :
- Freins :

		Normal	Absent	Hypertrophié	Insertion basse	Insertion haute
Maxillaire	Antérieure					
	Latéral droit					
	Latéral gauche					
Mandibulaire	Antérieure					
	Linguale					
	Latéral droit					
	Latéral gauche					

- 
- Formule dentaire :  

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

- Classe d'Angle :  
CI I                       CI II                       CI III   
Si subdivision, précisez: .....

- Anomalies de nombre :  
 Aucune  
 Dents surnuméraires : Lesquelles ?.....  
 Agénésies : lesquelles ?.....

- Anomalies de forme :  
 Microdontie :.....  
 Macrodontie :.....  
 Autre :.....

- Anomalies de structure :  
 Aucune :  
 Amélogénèse imparfaite  
 Dentinogénèse imparfaite  
 Odontogénèse imparfaite  
 Odontodysplasie régionale :  
 Fluorose :  
 MIH  
 Autres :.....

Dents atteintes ?.....

Dentitions atteintes ?

Temporaire seule       Permanente seule       Les deux dentitions

- Anomalies d'éruption :  
Précoce                       Retardée

Dents atteintes ?.....

**NOTE D'INFORMATION**  
**EN VUE DU PRELEVEMENT, DE LA CONSERVATION ET DE L'UTILISATION POUR LA**  
**RECHERCHE D'UNE COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES HUMAINS INTITULEE**  
**« MANIFESTATIONS BUCCO-DENTAIRES DES MALADIES RARES »**  
**PERSONNE MAJEURE**

Dans le cadre de votre suivi ou bien parce que vous êtes membre de la famille d'un patient suivi par le Centre de Référence des Manifestations Odontologiques de Maladies Rares de Strasbourg ou par un Centre de Compétence associé, nous souhaiterions prélever et conserver de la salive, éventuellement des dents et du sang, afin de constituer une collection d'échantillons biologiques qui pourraient être utilisés à des fins de recherches dans le domaine des maladies avec affections bucco-dentaires, dont le responsable scientifique est le Professeur Agnès BLOCH-ZUPAN.

Avant d'accepter, il est important que vous preniez le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent.  
S'il y a des mots que vous ne comprenez pas, n'hésitez pas à poser des questions.

Cette collection d'échantillons biologiques humains a reçu l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Est-IV le 11/12/12 et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche le 24/12/12.

**Finalité de la collection d'échantillons biologiques :**

Les échantillons biologiques issus de la collection serviront à des fins de recherches scientifiques dans le domaine des maladies rares avec affections bucco-dentaires.

S'il devait être envisagé une utilisation ultérieure des échantillons pour une étude non en rapport avec cette thématique, vous en serez informé et nous solliciterons de nouveau votre accord.

**Nature du prélèvement:**

Lors de votre visite de bilan au Centre de Référence ou Centre de compétence, nous souhaiterions prélever un peu de salive qui intégrera la collection d'échantillons biologiques, ainsi que les éventuelles dents de lait tombées que vous auriez conservées.

A titre exceptionnel si des dents devaient être extraites dans le cadre de votre prise en charge et traitement bucco-dentaire, nous souhaiterions également les inclure dans la collection.

De plus, dans le cadre de votre diagnostic et de votre visite auprès d'un médecin généticien, des échantillons sanguins pourraient être prélevés.

Si la totalité de ces prélèvements ne sont pas utilisés, nous souhaiterions en conserver les reliquats au lieu de les détruire.

**Risques prévisibles :**

Il n'y a aucun risque inhérent à la constitution de cette collection.

**Examen des caractéristiques génétiques :**

Dans les prélèvements de salive et de sang il sera extrait, par des techniques de laboratoire, une petite quantité d'ADN (acide désoxyribonucléique) qui est le support des informations génétiques propres à chaque individu.

Cet ADN sera analysé, à la recherche de mutations génétiques. Cette analyse fait appel à des techniques de biologie moléculaire, qui peuvent s'étendre sur plusieurs années compte-tenu notamment des évolutions de ces techniques et des connaissances sur les maladies rares que nous étudions.

**Lieu, durée de conservation et nom du responsable de la collection d'échantillons biologiques :**

Les échantillons seront conservés au laboratoire de génétique médicale INSERM U1112 de la Faculté de médecine de l'Université de Strasbourg, laboratoire dirigé par le Pr. Hélène DOLLFUS, aussi longtemps qu'ils seront utilisables pour la recherche (30 ans).



Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Le Pr. Hélène DOLLFUS est le responsable de la conservation de cette collection.

A tout moment, vous pouvez demander la destruction des échantillons stockés auprès du responsable scientifique de la collection, sans que cela ne vous porte préjudice. Vous continuerez à bénéficier de la prise en charge adaptée à votre cas.

La salive et le sang seront analysés prioritairement au laboratoire de génétique INSERM U1112 du Pr. DOLLFUS.

Les dents seront analysées à l'unité mixte INSERM-Université U1121 « Biomatériaux et Ingénierie Tissulaire » par le Dr. Joseph HEMMERLE (analyse microscopique et chimique des tissus dentaires). Les échantillons seront susceptibles d'être envoyés à d'autres chercheurs ou équipes hospitalières, travaillant dans des laboratoires privés ou publics, dans le cadre de collaborations scientifiques toujours dans le respect de votre personne et de votre anonymat.

### **Confidentialité :**

Chaque personne souhaitant déposer ces échantillons dans la collection « Manifestations bucco-dentaires des maladies » rares se verra attribuer un numéro d'anonymisation unique généré par la base de données D[4]/Phenodent.

Ce même numéro unique sera alloué aux échantillons ainsi qu'aux données associées correspondantes.

Une notice d'information ainsi qu'un consentement spécifique à D[4]/Phenodent vous sera fourni.

La constitution de cette base de données a reçu l'avis favorable du CCTIRS le 11.09.2008, et l'autorisation de la CNIL le 18/05/2009 (N° d'enregistrement 908416).

Le secret médical sera respecté et les données recueillies seront analysées en respectant l'anonymat.

Ainsi sont garantis aux personnes qui acceptent de déposer leurs échantillons à des fins de constitution d'une collection d'échantillons biologiques humains en vue de la recherche :

- l'anonymat selon les règles du Commission National de l'Informatique et des Libertés (art.40 de la Loi 78.17 du 6 janvier 1978 et loi n°2002-303 du 4 mars 2002 relative aux droits des malades)
- le droit d'accès, de rectification et d'opposition concernant les données médicales auprès du médecin qui vous suit dans le cadre de la consultation ou auprès des responsables de la collection ou de la conservation de la collection
- la possibilité de destruction des échantillons et des données associées sur simple demande auprès du Professeur Agnès BLOCH-ZUPAN.

## DOCUMENT D'INFORMATION

Vous êtes invité(e) à participer au projet de constitution d'un **registre informatique biomédical** intitulé  
« **DIAGNOSTIQUER LES DEFAUTS DENTAIRES, BASE DE DONNEES D[4]/PHENODENT** »

Avant d'accepter d'y participer, il est important que vous preniez le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent. Le présent document vous renseigne sur les modalités de ce projet. S'il y a des mots que vous ne comprenez pas, n'hésitez pas à poser des questions.

Vous devez être affilié à un régime de sécurité sociale.

La constitution de ce registre a reçu l'avis favorable du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) le 11/09/2008 et l'autorisation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) le 18/05/2009 (N° d'enregistrement 908416).

Afin d'éclairer votre décision concernant ce projet pour lequel nous souhaitons votre participation volontaire, vous devez avoir reçu et bien compris les informations suivantes :

Le projet D[4]/Phenodent vise à recueillir des données bucco-dentaires et médicales autour des anomalies dentaires. Ces informations sont obtenues après un **interrogatoire sur l'histoire familiale, médicale et dentaire, un examen clinique en bouche, un bilan radiographique s'il est utile au diagnostic et la prise de documents de référence comme des photos, des moulages**. Ces examens seront effectués chez des personnes présentant des anomalies dentaires ainsi que chez d'autres membres de la famille présentant ou non les mêmes défauts afin de poser un diagnostic différentiel.

Le but de la collecte de ces données est de constituer des groupes de patients plus importants pouvant participer à des projets de recherche, de faciliter le diagnostic et la compréhension de ces défauts dentaires et maladies rares et ainsi à terme d'améliorer la prise en charge de ces pathologies.

Toutes ces données sont anonymisées pour faire l'objet d'un traitement informatique par les organisateurs du projet.

La nature des études qui seront effectuées à partir de ces données, impliquent qu'elles peuvent s'étendre sur plusieurs années et que ces données seront conservées le temps nécessaire.

Les données nominatives ne seront connues que du centre (dont dépend le praticien qui vous a invité à participer au projet) et du responsable scientifique du registre D[4]/Phenodent, le Pr. Agnès BLOCH-ZUPAN.

Votre droit d'accès et de rectification prévu par la loi « Information et Liberté » s'exerce à tout moment auprès des responsables de l'étude.

L'ensemble des données médicales vous concernant peut également vous être communiqué, selon votre choix, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin que vous désignerez à cet effet.

Les données recueillies demeureront strictement confidentielles. Elles ne pourront être consultées que par l'équipe médicale.

Vous pouvez à tout moment demander des informations au Pr. Agnès BLOCH-ZUPAN, responsable du projet, au Centre de Référence des Manifestations Odontologiques de Maladies Rares, Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital Civil, 1 place de l'Hôpital, F-67100 Strasbourg Cedex France soit au n° de téléphone suivant : 03.88.11.69.10

soit par mail : [agnes.bloch@chru-strasbourg.fr](mailto:agnes.bloch@chru-strasbourg.fr) ou [cref-odonto@chru-strasbourg.fr](mailto:cref-odonto@chru-strasbourg.fr)

Votre participation à ce projet est volontaire. Vous avez le droit de refuser d'y participer ou de vous en retirer en tout temps. Votre décision de cesser votre participation ne vous causera aucun préjudice et vous bénéficierez de la prise en charge adaptée à votre cas.

## FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

Le Professeur / Docteur (Nom) \_\_\_\_\_ (Prénom) \_\_\_\_\_, m'a proposé de participer au projet de registre intitulé "Diagnostiquer les Défauts Dentaires base de Données D[4]/Phenodent".

- Après avoir reçu oralement et par écrit toutes les informations nécessaires pour comprendre l'intérêt de cette étude, ses contraintes et ses risques éventuels, ainsi que ce qui me sera demandé de faire dans le cadre de ma participation,
- après avoir pu poser les questions que je souhaitais à propos de ce projet et de ses implications sur ma prise en charge et obtenu des réponses,
- je sais que je peux retirer à tout moment mon consentement à ma participation à ce projet et cela quelles que soient mes raisons et sans supporter aucune responsabilité. Le fait de ne plus participer à ce projet ne portera pas atteinte à mes relations avec mon chirurgien dentiste qui me proposera, si besoin, une autre prise en charge,
- Les données me concernant à l'occasion de ce projet, font l'objet d'un traitement automatisé par les organisateurs du projet,
- La constitution de ce registre a reçu l'avis favorable du CCTIRS le 11.09.2008, et l'autorisation de la CNIL le 18/05/2009 (N° d'enregistrement 908416).
- Mon droit d'accès et de rectification prévu par la loi « Informatique et Libertés » peut s'exercer à tout moment auprès des responsables du projet. Les données de santé à caractère personnel peuvent m'être communiquées, selon mon choix, directement ou par l'intermédiaire d'un médecin que je désignerai à cet effet,
- Je peux à tout moment obtenir des informations complémentaires auprès du Pr. Agnès BLOCH-ZUPAN, responsable du projet, au Centre de Référence des Manifestations Odontologiques de Maladies Rares, Pôle de Médecine et Chirurgie Bucco-Dentaires, Hôpitaux Universitaires Strasbourg, Hôpital Civil, 1 place de l'Hôpital, F-67000 Strasbourg Cedex France au n° de tel. suivant : 03.88.11.69.10 ou par mail : agnes.bloch@chru-strasbourg.fr
- Je suis affilié à un régime de sécurité sociale.

J'autorise l'enregistrement des données non nominatives et des photos dans le registre oui  non   
de mes origines ethniques (via la collecte du pays et de la ville de naissance) oui  non

Ces informations peuvent aussi être utilisées à des fins d'enseignement dans l'ensemble de la communauté scientifique, voire de publication oui  non

Pour les données photos, j'autorise la diffusion éventuelle des clichés intra-buccaux oui  non   
de tous les clichés (visage, face, profil,...) oui  non

### JE DONNE MON ACCORD POUR PARTICIPER A CE REGISTRE

**Ma signature atteste que j'ai clairement compris les renseignements concernant ma participation à ce registre**

Praticien	Sujet	Personne(s) donnant le consentement :		
		Titulaire(s) de l'autorité parentale (si sujet mineur)		
		Père	Mère	Autre (préciser)
Nom :	Nom :	Nom :	Nom :	Nom :
Prénom :	Prénom :	Prénom :	Prénom :	Prénom :
Date :	Date :	Date :	Date :	Date :
Signature :	Signature :	Signature :	Signature :	Signature :

Ce document est à réaliser en 2 exemplaires originaux :

Un exemplaire à conserver par la personne donnant son consentement (ou par les titulaires de l'autorité parentale si mineur)

L'autre exemplaire à conserver 15 ans par le praticien (C. Comp. Odonto)

et à faxer **IMMEDIATEMENT** au responsable du projet (Pr. Bloch-Zupan, C. Ref. Odonto Strasbourg) **au 03.88.11.69.18**



**Formulaire de consentement éclairé pour participer à la constitution de la collection d'échantillons biologiques humains intitulée « Manifestations bucco-dentaires des maladies rares » Titulaires de l'autorité parentale**

Je, soussigné (nom) \_\_\_\_\_ (prénom) \_\_\_\_\_ et (nom) \_\_\_\_\_ (prénom) \_\_\_\_\_ certifie avoir reçu du Dr / Pr.(nom) \_\_\_\_\_ une information complète et compréhensible concernant le programme de recherche intitulé « **Manifestations bucco-dentaires des maladies rares** » auquel on souhaite la participation de l'enfant (nom) \_\_\_\_\_ (prénom) \_\_\_\_\_, né(e) le \_\_\_\_\_.

J'ai compris qu'une analyse génétique est proposée à partir d'un prélèvement de salive et/ou sanguin.

Les données personnelles recueillies en lien avec cette collection pourront être transmises dans le respect du secret professionnel au représentant du promoteur de l'étude et des autorités de santé dans un but de contrôle de conformité. Un traitement des données personnelles va être mis en œuvre. A cette fin, les données médicales concernant la personne mineure et les données relatives à ses habitudes de vie seront transmises au promoteur de la recherche ou aux personnes ou société(s) agissant pour son compte, en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par **un numéro unique généré par la base D[4]/Phenodent**. La constitution de cette base de données a reçu l'avis favorable du CCTIRS le 11.09.2008, et l'autorisation de la CNIL le 18/05/2009, N° d'enregistrement 908416. Conformément aux dispositions de loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, je dispose également d'un droit de rectification et d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de ce programme et d'être traitées. Je peux également accéder directement ou par l'intermédiaire du médecin de mon choix à l'ensemble de ses données médicales en application des dispositions de l'article L1111-7 du Code de la Santé Publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui s'occupe de l'enfant dans le cadre de son suivi et qui connaît son identité. Conformément aux lois en vigueur dans le domaine des recherches scientifiques, les prélèvements seront rendus anonymes par **le même numéro unique généré par la base D[4]/Phenodent**. Ceci assure une impossibilité pour les différents intervenants de l'identifier. Seul le **Pr. Agnès Bloch-Zupan** possèdera la liste associant son identité au code employé pour l'anonymisation. Cette liste permettra d'assurer la destruction de ses échantillons et de leurs données associées. En effet, je pourrai en obtenir la restitution ou la destruction à tout moment sur simple demande auprès du Professeur Agnès BLOCH-ZUPAN. Conformément à la loi (art.16-1 et 16-6 du code civil), ses prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial, ni donner lieu à une rémunération à mon bénéfice ou à celui de l'enfant. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés.

**J'exprime mon accord pour la participation de l'enfant en signant le présent document.**

**Mon consentement est révoquant à tout moment.**

J'accepte que ses échantillons biologiques (salive, sang, dents) ainsi que les données qui y sont associées soient prélevés, conservés et utilisés pour constitution de la collection intitulée « **Manifestations bucco-dentaires des maladies rares** »

*paraphe*

J'accepte qu'une analyse génétique soit effectuée dans le but de rechercher une origine génétique à la maladie

*paraphe*

J'accepte que ses résultats soient utilisés pour faciliter la réalisation de tests génétiques chez les membres de sa famille qui en feraient la demande

*paraphe*

Praticien:	Enfant, si apte à consentir :	Père / Mère / Premier titulaire autorité parentale	Père / Mère / Second titulaire autorité parentale
Nom :	Nom :	Nom :	Nom :
Prénom :	Prénom :	Prénom :	Prénom :
Date :	Date :	Date :	Date :
Signature :	Signature :	Signature :	Signature :



**Formulaire de consentement éclairé pour participer à la constitution de la collection d'échantillons biologiques humains intitulée « Manifestations bucco-dentaires des maladies rares »  
Personne majeure**

Je, soussigné(e) (nom) \_\_\_\_\_ (prénom) \_\_\_\_\_

Né(e) le \_\_\_\_\_ certifie avoir reçu du Dr / Pr. (nom) \_\_\_\_\_

(prénom) \_\_\_\_\_ une information complète et compréhensible concernant la collection intitulée « **Manifestations bucco-dentaires des maladies rares** ».

J'ai compris qu'une analyse génétique m'est proposée à partir d'un prélèvement de salive et/ou sanguin.

Les données personnelles recueillies en lien avec cette collection pourront être transmises dans le respect du secret professionnel au représentant du promoteur de l'étude et des autorités de santé dans un but de contrôle de conformité.

Un traitement de mes données personnelles va être mis en œuvre. A cette fin, les données médicales me concernant et les données relatives à mes habitudes de vie seront transmises au promoteur de la recherche ou aux personnes ou société(s) agissant pour son compte, en France ou à l'étranger. Ces données seront identifiées par **un numéro unique généré par la base D[4]/Phenodent**.

La constitution de cette base de données a reçu l'avis favorable du CCTIRS le 11.09.2008, et l'autorisation de la CNIL le 18/05/2009, N° d'enregistrement 908416.

Conformément aux dispositions de loi relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, je dispose également d'un droit de rectification et d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées dans le cadre de ce programme et d'être traitées.

Je peux également accéder directement ou par l'intermédiaire du médecin de mon choix à l'ensemble de mes données médicales en application des dispositions de l'article L1111-7 du Code de la Santé Publique. Ces droits s'exercent auprès du médecin qui me suit dans le cadre de mon suivi et qui connaît mon identité.

Conformément aux lois en vigueur dans le domaine des recherches scientifiques, les prélèvements seront rendus anonymes par **le même numéro unique généré par la base D[4]/Phenodent**. Ceci assure une impossibilité pour les différents intervenants de m'identifier. Seul le **Pr. Agnès Bloch-Zupan** possédera la liste associant mon identité au code employé pour l'anonymisation. Cette liste permettra d'assurer la destruction de mes échantillons et de leurs données associées. En effet, je pourrai en obtenir la restitution ou la destruction à tout moment sur simple demande auprès du Professeur Agnès BLOCH-ZUPAN.

Conformément à la loi (art.16-1 et 16-6 du code civil), mes prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial, ni donner lieu à une rémunération à mon bénéfice. Ils pourront être utilisés pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés.

**J'exprime mon accord pour participer en signant le présent document.**

**Mon consentement est révoquant à tout moment.**

J'accepte que mes échantillons biologiques (salive, sang, dents) ainsi que les données qui y sont associées soient prélevés, conservés et utilisés pour constitution de la collection intitulée « **Manifestations bucco-dentaires des maladies rares** »  
*paraphe*

J'accepte qu'une analyse génétique soit effectuée dans le but de rechercher une origine génétique à la maladie  
*paraphe*

J'accepte que mes résultats soient utilisés pour faciliter la réalisation de tests génétiques chez les membres de ma famille qui en feraient la demande  
*paraphe*

<b>Praticien:</b>	<b>Personne majeure</b>
Nom :	Nom :
Prénom :	Prénom :
Date :	Date :
Signature :	Signature :



## WEB RESSOURCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Références bibliographiques

1. Laouina S, El Alaoui SC, Amezian R, Al Bouzidi A, Sefiani A, El Alloussi M: **A rare association--amelogenesis imperfecta, platispondyly and bicytopenia: a case report.** *J Med Case Rep* 2015, **9**:245.
2. Prasad MK, Geoffroy V, Vicaire S, Jost B, Dumas M, Le Gras S, Switala M, Gasse B, Laugel-Haushalter V, Paschaki M *et al*: **A targeted next-generation sequencing assay for the molecular diagnosis of genetic disorders with orodental involvement.** *J Med Genet* 2016, **53**(2):98-110.
3. Prasad MK, Laouina S, El Alloussi M, Dollfus H, Bloch-Zupan A: **Amelogenesis Imperfecta: 1 Family, 2 Phenotypes, and 2 Mutated Genes.** *J Dent Res* 2016, **95**(13):1457-1463.
4. Laouina S, Bloch Zupan A, El Alloussi M: **Enamel-renal syndrome with congenital heart defects and asthma: a rare association in a Moroccan child.** *Clin Dysmorphol* 2016, **26**(2):114-116.
5. **Plateforme Maladies Rares: un centre de ressources unique.** Available from: <http://www.plateforme-maladiesrares.org/presentation/la-plateforme-maladiesrares.html>.
6. **Agency, E.M. Medicines for rare diseases.** Available from: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special\\_topics/general/general\\_content\\_000034.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000034.jsp).
7. Imai H, Osumi-Yamashita N, Ninomiya Y, Eto K: **Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos.** *Dev Biol* 1996, **176**(2):151-165.
8. Kontges G, Lumsden A: **Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny.** *Development* 1996, **122**(10):3229-3242.
9. Thesleff I, Aberg T: **Molecular regulation of tooth development.** *Bone* 1999, **25**(1):123-125.
10. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Jr., Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM: **Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis.** *Development* 2000, **127**(8):1671-1679.
11. Miletich I, Sharpe PT: **Neural crest contribution to mammalian tooth formation.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004, **72**(2):200-212.
12. Bei M: **Molecular genetics of tooth development.** *Curr Opin Genet Dev* 2009, **19**(5):504-510.
13. Tucker A, Sharpe P: **The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth.** *Nature reviews Genetics* 2004, **5**(7):499-508.
14. Laugel-Haushalter V: **Développement de la cavité buccale : du gène à l'expression clinique chez l'Homme.** Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2012. Français. <NNT : 2012STRAJ066>. <tel 00858740>.
15. Thesleff I, Mikkola M: **The role of growth factors in tooth development.** *Int Rev Cytol* 2002, **217**:93-135.
16. Diez-Roux G, Banfi S, Sultan M, Geffers L, Anand S, Rozado D, Magen A, Canidio E, Pagani M, Peluso I *et al*: **A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo.** *PLoS Biol* 2011, **9**(1):e1000582.
17. Balic A, Thesleff I: **Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal.** *Curr Top Dev Biol* 2015, **115**:157-186.
18. Davidson EH: **Later embryogenesis: regulatory circuitry in morphogenetic fields.** *Development* 1993, **118**(3):665-690.

19. Aberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashiro T, Bei M, Rice R, Ryoo HM, Thesleff I: **Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis.** *Dev Biol* 2004, **270**(1):76-93.
20. Bei M, Maas R: **FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development.** *Development* 1998, **125**(21):4325-4333.
21. Neubuser A, Peters H, Balling R, Martin GR: **Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation.** *Cell* 1997, **90**(2):247-255.
22. Thomas BL, Liu JK, Rubenstein JL, Sharpe PT: **Independent regulation of Dlx2 expression in the epithelium and mesenchyme of the first branchial arch.** *Development* 2000, **127**(2):217-224.
23. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I: **Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development.** *Cell* 1993, **75**(1):45-58.
24. Tucker AS, Sharpe PT: **Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place.** *J Dent Res* 1999, **78**(4):826-834.
25. Millar SE: **Molecular mechanisms regulating hair follicle development.** *J Invest Dermatol* 2002, **118**(2):216-225.
26. Haara O, Harjunmaa E, Lindfors PH, Huh SH, Fliniaux I, Aberg T, Jernvall J, Ornitz DM, Mikkola ML, Thesleff I: **Ectodysplasin regulates activator-inhibitor balance in murine tooth development through Fgf20 signaling.** *Development* 2012, **139**(17):3189-3199.
27. Kratochwil K, Galceran J, Tontsch S, Roth W, Grosschedl R: **FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in Lef1(-/-) mice.** *Genes Dev* 2002, **16**(24):3173-3185.
28. Jernvall J, Aberg T, Kettunen P, Keranen S, Thesleff I: **The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot.** *Development* 1998, **125**(2):161-169.
29. Gritli-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP: **Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization.** *Development* 2002, **129**(23):5323-5337.
30. Biggs LC, Mikkola ML: **Early inductive events in ectodermal appendage morphogenesis.** *Semin Cell Dev Biol* 2014, **25-26**:11-21.
31. Jiang TX, Widelitz RB, Shen WM, Will P, Wu DY, Lin CM, Jung HS, Chuong CM: **Integument pattern formation involves genetic and epigenetic controls: feather arrays simulated by digital hormone models.** *Int J Dev Biol* 2004, **48**(2-3):117-135.
32. Salazar-Ciudad I, Jernvall J: **A computational model of teeth and the developmental origins of morphological variation.** *Nature* 2010, **464**(7288):583-586.
33. Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT: **Death in the life of a tooth.** *J Dent Res* 2004, **83**(1):11-16.
34. Thesleff I, Keranen S, Jernvall J: **Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation.** *Adv Dent Res* 2001, **15**:14-18.
35. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T, Thesleff I: **Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis.** *Differentiation* 2007, **75**(5):452-462.

36. Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I: **Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation.** *Dev Cell* 2004, **7**(5):719-730.
37. Simmer JP, Hu JC: **Expression, structure, and function of enamel proteinases.** *Connect Tissue Res* 2002, **43**(2-3):441-449.
38. Shiyan H, Nanquan R, Shuhao X, Xiaobing L: **[Research progress on the cellular and molecular mechanisms of tooth eruption].** *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2016, **34**(3):317-321.
39. Alliot-Licht B. In.; Morphogenèse cranio-faciale et Odontogenèse. UE spécifique odontologie-PACES [en ligne] <<http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/spiral-files/download?mode=inline&data=1903402>> (consulté le 05 juin 2016), 2012.
40. Bei M: **Molecular genetics of ameloblast cell lineage.** *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009, **312B**(5):437-444.
41. Enamel: Composition F, and Structure, [en ligne] <http://pocketdentistry.com/7-enamel-composition-formation-and-structure/> (consulté le 05 juin 2016). In.
42. Nanci A: *Ten Cate's Oral Histology : Development, Structure and Function*, ed. Elsevier; 2012.
43. Robinson C: **Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias.** *Front Physiol* 2014, **5**:388.
44. McGuire JD, Walker MP, Dusevich V, Wang Y, Gorski JP: **Enamel organic matrix: potential structural role in enamel and relationship to residual basement membrane constituents at the dentin enamel junction.** *Connect Tissue Res* 2014, **55** Suppl 1:33-37.
45. Bartlett JD: **Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates.** *ISRN Dent* 2013, **2013**:684607.
46. Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP: **Enamel formation and amelogenesis imperfecta.** *Cells Tissues Organs* 2007, **186**(1):78-85.
47. Piette E GM: *La dent normale et pathologique*, ed. DeBoeck; 2001.
48. He LH, Swain MV: **Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics.** *J Mech Behav Biomed Mater* 2008, **1**(1):18-29.
49. Caruntu I. In.; Morfogeneza sistemului stomatognat and Histologia sistemului stomatognat. [en ligne] [http://iasi-medecine.weebly.com/uploads/5/4/8/2/5482113/email\\_fr.pdf](http://iasi-medecine.weebly.com/uploads/5/4/8/2/5482113/email_fr.pdf) (consulté le 24 août 2015), 2000 and 2001.
50. Crawford PJ, Aldred M, Bloch-Zupan A: **Amelogenesis imperfecta.** *Orphanet J Rare Dis* 2007, **2**:17.
51. Nusier M, Yassin O, Hart TC, Samimi A, Wright JT: **Phenotypic diversity and revision of the nomenclature for autosomal recessive amelogenesis imperfecta.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004, **97**(2):220-230.
52. Bailleul-Forestier I, Molla M, Verloes A, Berdal A: **The genetic basis of inherited anomalies of the teeth. Part 1: clinical and molecular aspects of non-syndromic dental disorders.** *Eur J Med Genet* 2008, **51**(4):273-291.
53. Bloch-Zupan A: *Les Amélogénèses Imparfaites.* **Clinic, 2010. 31: p. 512-16.**
54. Gadhia K, McDonald S, Arkutu N, Malik K: **Amelogenesis imperfecta: an introduction.** *Br Dent J* 2012, **212**(8):377-379.
55. Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, Sreenath T, Wright JT, Decker S, Piddington R *et al*: **Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype.** *J Biol Chem* 2001, **276**(34):31871-31875.

56. Salido EC, Yen PH, Koprivnikar K, Yu LC, Shapiro LJ: **The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes.** *Am J Hum Genet* 1992, **50**(2):303-316.
57. Hu JC, Chan HC, Simmer SG, Seymen F, Richardson AS, Hu Y, Milkovich RN, Estrella NM, Yildirim M, Bayram M *et al*: **Amelogenesis imperfecta in two families with defined AMELX deletions in ARHGAP6.** *PLoS One* 2012, **7**(12):e52052.
58. Iwase M, Kaneko S, Kim H, Satta Y, Takahata N: **Evolutionary history of sex-linked mammalian amelogenin genes.** *Cells Tissues Organs* 2007, **186**(1):49-59.
59. Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ: **Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**(16):1673-1677.
60. Hart TC, Hart PS, Gorry MC, Michalec MD, Ryu OH, Uygur C, Ozdemir D, Firatli S, Aren G, Firatli E: **Novel ENAM mutation responsible for autosomal recessive amelogenesis imperfecta and localised enamel defects.** *J Med Genet* 2003, **40**(12):900-906.
61. Seymen F, Lee KE, Koruyucu M, Gencay K, Bayram M, Tuna EB, Lee ZH, Kim JW: **ENAM mutations with incomplete penetrance.** *J Dent Res* 2014, **93**(10):988-992.
62. Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y: **Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene.** *J Biol Chem* 1996, **271**(8):4431-4435.
63. Poulter JA, Murillo G, Brookes SJ, Smith CE, Parry DA, Silva S, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ: **Deletion of ameloblastin exon 6 is associated with amelogenesis imperfecta.** *Hum Mol Genet* 2014, **23**(20):5317-5324.
64. Delsuc F, Gasse B, Sire JY: **Evolutionary analysis of selective constraints identifies ameloblastin (AMBN) as a potential candidate for amelogenesis imperfecta.** *BMC Evol Biol* 2015, **15**:148.
65. Kivirikko S, McGrath JA, Pulkkinen L, Uitto J, Christiano AM: **Mutational hotspots in the LAMB3 gene in the lethal (Herlitz) type of junctional epidermolysis bullosa.** *Hum Mol Genet* 1996, **5**(2):231-237.
66. Kim JW, Seymen F, Lee KE, Ko J, Yildirim M, Tuna EB, Gencay K, Shin TJ, Kyun HK, Simmer JP *et al*: **LAMB3 mutations causing autosomal-dominant amelogenesis imperfecta.** *J Dent Res* 2013, **92**(10):899-904.
67. Poulter JA, El-Sayed W, Shore RC, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ: **Whole-exome sequencing, without prior linkage, identifies a mutation in LAMB3 as a cause of dominant hypoplastic amelogenesis imperfecta.** *Eur J Hum Genet* 2014, **22**(1):132-135.
68. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J *et al*: **A new nomenclature for the laminins.** *Matrix Biol* 1994, **14**(3):209-211.
69. Phillips RJ, Atherton DJ, Gibbs ML, Strobel S, Lake BD: **Laryngo-onycho-cutaneous syndrome: an inherited epithelial defect.** *Arch Dis Child* 1994, **70**(4):319-326.
70. Yuen WY, Pasmooij AM, Stellingsma C, Jonkman MF: **Enamel defects in carriers of a novel LAMA3 mutation underlying epidermolysis bullosa.** *Acta Derm Venereol* 2012, **92**(6):695-696.
71. Baudoin C, Miquel C, Gagnoux-Palacios L, Pulkkinen L, Christiano AM, Uitto J, Tadini G, Ortonne JP, Meneguzzi G: **A novel homozygous nonsense mutation in the LAMC2 gene in patients with the Herlitz junctional epidermolysis bullosa.** *Hum Mol Genet* 1994, **3**(10):1909-1910.

72. Gostynska KB, Yan Yuen W, Pasmooij AM, Stellingsma C, Pas HH, Lemmink H, Jonkman MF: **Carriers with functional null mutations in LAMA3 have localized enamel abnormalities due to haploinsufficiency.** *Eur J Hum Genet* 2016, **25**(1):94-99.
73. Burgeson RE, Morris NP, Murray LW, Duncan KG, Keene DR, Sakai LY: **The structure of type VII collagen.** *Ann N Y Acad Sci* 1985, **460**:47-57.
74. Saito M, Masunaga T, Ishiko A: **A novel de novo splice-site mutation in the COL7A1 gene in dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB): specific exon skipping could be a prognostic factor for DDEB pruriginosa.** *Clin Exp Dermatol* 2009, **34**(8):e934-936.
75. Umemoto H, Akiyama M, Domon T, Nomura T, Shinkuma S, Ito K, Asaka T, Sawamura D, Uitto J, Uo M *et al*: **Type VII collagen deficiency causes defective tooth enamel formation due to poor differentiation of ameloblasts.** *Am J Pathol* 2012, **181**(5):1659-1671.
76. Franzke CW, Tasanen K, Schacke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch C, Zigrino P, Sunnarborg S, Lee DC, Fahrenholz F *et al*: **Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs.** *EMBO J* 2002, **21**(19):5026-5035.
77. Huckert M *et al*: **Épidermolyse bulleuse dystrophique, particularités de la prise en charge sous anesthésie générale RFOP.** 2011. 6(4): p. 170-174.
78. Nakamura H, Sawamura D, Goto M, Kida M, Ariga T, Sakiyama Y, Tomizawa K, Mitsui H, Tamaki K, Shimizu H: **Analysis of the COL17A1 in non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa and amelogenesis imperfecta.** *Int J Mol Med* 2006, **18**(2):333-337.
79. McGrath JA, Gatalica B, Li K, Dunnill MG, McMillan JR, Christiano AM, Eady RA, Uitto J: **Compound heterozygosity for a dominant glycine substitution and a recessive internal duplication mutation in the type XVII collagen gene results in junctional epidermolysis bullosa and abnormal dentition.** *Am J Pathol* 1996, **148**(6):1787-1796.
80. Vidal F, Aberdam D, Miquel C, Christiano AM, Pulkkinen L, Uitto J, Ortonne JP, Meneguzzi G: **Integrin beta 4 mutations associated with junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia.** *Nat Genet* 1995, **10**(2):229-234.
81. Yousef GM, Diamandis M, Jung K, Diamandis EP: **Molecular cloning of a novel human acid phosphatase gene (ACPT) that is highly expressed in the testis.** *Genomics* 2001, **74**(3):385-395.
82. Seymen F, Kim YJ, Lee YJ, Kang J, Kim TH, Choi H, Koruyucu M, Kasimoglu Y, Tuna EB, Gencay K *et al*: **Recessive Mutations in ACPT, Encoding Testicular Acid Phosphatase, Cause Hypoplastic Amelogenesis Imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2016, **99**(5):1199-1205.
83. Lee SK, Hu JC, Bartlett JD, Lee KE, Lin BP, Simmer JP, Kim JW: **Mutational spectrum of FAM83H: the C-terminal portion is required for tooth enamel calcification.** *Hum Mutat* 2008, **29**(8):E95-99.
84. Hart PS, Becerik S, Cogulu D, Emingil G, Ozdemir-Ozenen D, Han ST, Sulima PP, Firatli E, Hart TC: **Novel FAM83H mutations in Turkish families with autosomal dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta.** *Clin Genet* 2009, **75**(4):401-404.
85. Parry DA, Brookes SJ, Logan CV, Poulter JA, El-Sayed W, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Sayed J, Raif el M, Shore RC *et al*: **Mutations in C4orf26, encoding a peptide with in vitro hydroxyapatite crystal nucleation and growth activity, cause amelogenesis imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2012, **91**(3):565-571.
86. Parry DA, Poulter JA, Logan CV, Brookes SJ, Jafri H, Ferguson CH, Anwari BM, Rashid Y, Zhao H, Johnson CA *et al*: **Identification of mutations in SLC24A4, encoding a potassium-dependent sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2013, **92**(2):307-312.



87. Wang S, Choi M, Richardson AS, Reid BM, Seymen F, Yildirim M, Tuna E, Gencay K, Simmer JP, Hu JC: **STIM1 and SLC24A4 Are Critical for Enamel Maturation.** *J Dent Res* 2014, **93**(7 Suppl):94S-100S.
88. Wang SK, Choi M, Richardson AS, Reid BM, Lin BP, Wang SJ, Kim JW, Simmer JP, Hu JC: **ITGB6 loss-of-function mutations cause autosomal recessive amelogenesis imperfecta.** *Hum Mol Genet* 2014, **23**(8):2157-2163.
89. Seymen F, Lee KE, Koruyucu M, Gencay K, Bayram M, Tuna EB, Lee ZH, Kim JW: **Novel ITGB6 mutation in autosomal recessive amelogenesis imperfecta.** *Oral Dis* 2015, **21**(4):456-461.
90. Poulter JA, Brookes SJ, Shore RC, Smith CE, Abi Farraj L, Kirkham J, Inglehearn CF, Mighell AJ: **A missense mutation in ITGB6 causes pitted hypomineralized amelogenesis imperfecta.** *Hum Mol Genet* 2014, **23**(8):2189-2197.
91. Bartlett JD, Skobe Z, Nanci A, Smith CE: **Matrix metalloproteinase 20 promotes a smooth enamel surface, a strong dentino-enamel junction, and a decussating enamel rod pattern.** *Eur J Oral Sci* 2011, **119** Suppl 1:199-205.
92. Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, Bartlett JD: **Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype.** *J Biol Chem* 2002, **277**(51):49598-49604.
93. Papagerakis P, Lin HK, Lee KY, Hu Y, Simmer JP, Bartlett JD, Hu JC: **Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta.** *J Dent Res* 2008, **87**(1):56-59.
94. Gasse B, Karayigit E, Mathieu E, Jung S, Garret A, Huckert M, Morkmued S, Schneider C, Vidal L, Hemmerle J *et al*: **Homozygous and compound heterozygous MMP20 mutations in amelogenesis imperfecta.** *J Dent Res* 2013, **92**(7):598-603.
95. Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, Hu JC: **MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta.** *J Med Genet* 2005, **42**(3):271-275.
96. Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, Choi SJ, Ozdemir-Karatas M, Firatli E, Piesco N, Hart TC: **MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta.** *J Dent Res* 2005, **84**(11):1031-1035.
97. Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, Wright JT: **Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta.** *J Med Genet* 2004, **41**(7):545-549.
98. Katsura KA, Horst JA, Chandra D, Le TQ, Nakano Y, Zhang Y, Horst OV, Zhu L, Le MH, DenBesten PK: **WDR72 models of structure and function: a stage-specific regulator of enamel mineralization.** *Matrix Biol* 2014, **38**:48-58.
99. Lee SK, Seymen F, Lee KE, Kang HY, Yildirim M, Tuna EB, Gencay K, Hwang YH, Nam KH, De La Garza RJ *et al*: **Novel WDR72 mutation and cytoplasmic localization.** *J Dent Res* 2010, **89**(12):1378-1382.
100. Parry DA, Smith CE, El-Sayed W, Poulter JA, Shore RC, Logan CV, Mogi C, Sato K, Okajima F, Harada A *et al*: **Mutations in the pH-Sensing G-protein-Coupled Receptor GPR68 Cause Amelogenesis Imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2016, **99**(4):984-990.
101. Xu Y, Casey G: **Identification of human OGR1, a novel G protein-coupled receptor that maps to chromosome 14.** *Genomics* 1996, **35**(2):397-402.
102. Lacruz RS, Smith CE, Bringas P, Jr., Chen YB, Smith SM, Snead ML, Kurtz I, Hacia JG, Hubbard MJ, Paine ML: **Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling.** *J Cell Physiol* 2012, **227**(5):2264-2275.

103. Picard C, McCarl CA, Papolos A, Khalil S, Luthy K, Hivroz C, LeDeist F, Rieux-Laucat F, Rechavi G, Rao A *et al*: **STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity**. *N Engl J Med* 2009, **360**(19):1971-1980.
104. Bohm J, Chevessier F, Maues De Paula A, Koch C, Attarian S, Feger C, Hantai D, Laforet P, Ghorab K, Vallat JM *et al*: **Constitutive activation of the calcium sensor STIM1 causes tubular-aggregate myopathy**. *Am J Hum Genet* 2013, **92**(2):271-278.
105. Misceo D, Holmgren A, Louch WE, Holme PA, Mizobuchi M, Morales RJ, De Paula AM, Stray-Pedersen A, Lyle R, Dalhus B *et al*: **A dominant STIM1 mutation causes Stormorken syndrome**. *Hum Mutat* 2014, **35**(5):556-564.
106. Deutsch D, Palmon A, Young MF, Selig S, Kearns WG, Fisher LW: **Mapping of the human tuftelin (TUFT1) gene to chromosome 1 by fluorescence in situ hybridization**. *Mamm Genome* 1994, **5**(7):461-462.
107. Bashir MM, Abrams WR, Tucker T, Sellinger B, Budarf M, Emanuel B, Rosenbloom J: **Molecular cloning and characterization of the bovine and human tuftelin genes**. *Connect Tissue Res* 1998, **39**(1-3):13-24; discussion 63-17.
108. Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein GS, Stein JL, Lian JB: **Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene**. *Mol Cell Biol* 2004, **24**(20):9248-9261.
109. Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu T, Escamilla M, MacDougall M: **DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism**. *Am J Med Genet A* 2005, **133A**(2):138-141.
110. Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC: **Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome**. *Hum Mol Genet* 1998, **7**(3):563-569.
111. Nalbant D, Youn H, Nalbant SI, Sharma S, Cobos E, Beale EG, Du Y, Williams SC: **FAM20: an evolutionarily conserved family of secreted proteins expressed in hematopoietic cells**. *BMC Genomics* 2005, **6**:11.
112. de la Dure-Molla M, Quentric M, Yamaguti PM, Acevedo AC, Mighell AJ, Vikkula M, Huckert M, Berdal A, Bloch-Zupan A: **Pathognomonic oral profile of Enamel Renal Syndrome (ERS) caused by recessive FAM20A mutations**. *Orphanet J Rare Dis* 2014, **9**:84.
113. Jaureguiberry G, De la Dure-Molla M, Parry D, Quentric M, Himmerkus N, Koike T, Poulter J, Klootwijk E, Robinette SL, Howie AJ *et al*: **Nephrocalcinosis (enamel renal syndrome) caused by autosomal recessive FAM20A mutations**. *Nephron Physiol* 2012, **122**(1-2):1-6.
114. Kantaputra PN, Bongkochwilawan C, Lubinsky M, Pata S, Kaewgahya M, Tong HJ, Ketudat Cairns JR, Guven Y, Chairisookumporn N: **Periodontal disease and FAM20A mutations**. *Journal of human genetics* 2017.
115. Tagliabracci VS, Pinna LA, Dixon JE: **Secreted protein kinases**. *Trends Biochem Sci* 2012, **38**(3):121-130.
116. Simpson MA, Scheuerle A, Hurst J, Patton MA, Stewart H, Crosby AH: **Mutations in FAM20C also identified in non-lethal osteosclerotic bone dysplasia**. *Clin Genet* 2009, **75**(3):271-276.
117. Elalaoui SC, Al-Sheqaih N, Ratbi I, Urquhart JE, O'Sullivan J, Bhaskar S, Williams SS, Elaloussi M, Lyahyai J, Sbihi L *et al*: **Non lethal Raine syndrome and differential diagnosis**. *Eur J Med Genet* 2016, **59**(11):577-583.
118. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F: **p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities**. *Mol Cell* 1998, **2**(3):305-316.

119. Kantaputra PN, Matangkasombut O, Sripathomsawat W: **Split hand-split foot-ectodermal dysplasia and amelogenesis imperfecta with a TP63 mutation.** *Am J Med Genet A* 2012, **158A**(1):188-192.
120. Alves LU, Pardono E, Otto PA, Mingroni Netto RC: **A novel c.1037C > G (p.Ala346Gly) mutation in TP63 as cause of the ectrodactyly-ectodermal dysplasia and cleft lip/palate (EEC) syndrome.** *Genet Mol Biol* 2015, **38**(1):37-41.
121. Parry DA, Mighell AJ, El-Sayed W, Shore RC, Jalili IK, Dollfus H, Bloch-Zupan A, Carlos R, Carr IM, Downey LM *et al*: **Mutations in CNNM4 cause Jalili syndrome, consisting of autosomal-recessive cone-rod dystrophy and amelogenesis imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2009, **84**(2):266-273.
122. Polok B, Escher P, Ambresin A, Chouery E, Bolay S, Meunier I, Nan F, Hamel C, Munier FL, Thilo B *et al*: **Mutations in CNNM4 cause recessive cone-rod dystrophy with amelogenesis imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2009, **84**(2):259-265.
123. Cherkaoui Jaouad I, Lyahyai J, Guaoua S, El Alloussi M, Zrhidri A, Doubaj Y, Boulanouar A, Sefiani A: **Novel splice site mutation in CNNM4 gene in a family with Jalili syndrome.** *Eur J Med Genet* 2017.
124. Mory A, Dagan E, Illi B, Duquesnoy P, Mordechai S, Shahor I, Romani S, Hawash-Moustafa N, Mandel H, Valente EM *et al*: **A nonsense mutation in the human homolog of Drosophila rogd1 causes Kohlschutter-Tonz syndrome.** *Am J Hum Genet* 2012, **90**(4):708-714.
125. Schossig A, Wolf NI, Fischer C, Fischer M, Stocker G, Pabinger S, Dander A, Steiner B, Tonz O, Kotzot D *et al*: **Mutations in ROGDI Cause Kohlschutter-Tonz Syndrome.** *Am J Hum Genet* 2012, **90**(4):701-707.
126. Schossig A, Wolf NI, Kapferer I, Kohlschutter A, Zschocke J: **Epileptic encephalopathy and amelogenesis imperfecta: Kohlschutter-Tonz syndrome.** *Eur J Med Genet* 2012, **55**(5):319-322.
127. Huckert M, Mecili H, Laugel-Haushalter V, Stoetzel C, Muller J, Flori E, Laugel V, Maniere MC, Dollfus H, Bloch-Zupan A: **A Novel Mutation in the ROGDI Gene in a Patient with Kohlschutter-Tonz Syndrome.** *Mol Syndromol* 2014, **5**(6):293-298.
128. Tucci A, Kara E, Schossig A, Wolf NI, Plagnol V, Fawcett K, Paisan-Ruiz C, Moore M, Hernandez D, Musumeci S *et al*: **Kohlschutter-Tonz syndrome: mutations in ROGDI and evidence of genetic heterogeneity.** *Hum Mutat* 2013, **34**(2):296-300.
129. Inoue K, Zhuang L, Ganapathy V: **Human Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function.** *Biochemical and biophysical research communications* 2002, **299**(3):465-471.
130. Schossig A, Bloch-Zupan A, Lussi A, Wolf NI, Raskin S, Cohen M, Giuliano F, Jurgens J, Krabichler B, Koolen DA *et al*: **SLC13A5 is the second gene associated with Kohlschutter-Tonz syndrome.** *J Med Genet* 2017, **54**(1):54-62.
131. Oklu R, Hesketh R: **The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family.** *Biochem J* 2000, **352 Pt 3**:601-610.
132. Huckert M, Stoetzel C, Morkmued S, Laugel-Haushalter V, Geoffroy V, Muller J, Clauss F, Prasad MK, Obry F, Raymond JL *et al*: **Mutations in the latent TGF-beta binding protein 3 (LTBP3) gene cause brachyolmia with amelogenesis imperfecta.** *Hum Mol Genet* 2015, **24**(11):3038-3049.
133. Verloes A, Jamblin P, Koulischer L, Bourguignon JP: **A new form of skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta and platyspondyly.** *Clin Genet* 1996, **49**(1):2-5.
134. Bertola DR, Antequera R, Rodvalho MJ, Honjo RS, Albano LM, Furquim IM, Oliveira LA, Kim CA: **Brachyolmia with amelogenesis imperfecta: further evidence of a distinct entity.** *Am J Med Genet A* 2009, **149a**(3):532-534.

135. Dugan SL, Temme RT, Olson RA, Mikhailov A, Law R, Mahmood H, Noor A, Vincent JB: **New recessive truncating mutation in LTBP3 in a family with oligodontia, short stature, and mitral valve prolapse.** *Am J Med Genet A* 2015, **167**(6):1396-1399.
136. Noor A, Windpassinger C, Vitcu I, Orlic M, Rafiq MA, Khalid M, Malik MN, Ayub M, Alman B, Vincent JB: **Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF-beta binding protein 3.** *Am J Hum Genet* 2009, **84**(4):519-523.
137. Portsteffen H, Beyer A, Becker E, Epplen C, Pawlak A, Kunau WH, Dodt G: **Human PEX1 is mutated in complementation group 1 of the peroxisome biogenesis disorders.** *Nat Genet* 1997, **17**(4):449-452.
138. Zhang Z, Suzuki Y, Shimozawa N, Fukuda S, Imamura A, Tsukamoto T, Osumi T, Fujiki Y, Orii T, Wanders RJ *et al*: **Genomic structure and identification of 11 novel mutations of the PEX6 (peroxisome assembly factor-2) gene in patients with peroxisome biogenesis disorders.** *Hum Mutat* 1999, **13**(6):487-496.
139. Ratbi I, Falkenberg KD, Sommen M, Al-Sheqaih N, Guaoua S, Vandeweyer G, Urquhart JE, Chandler KE, Williams SG, Roberts NA *et al*: **Heimler Syndrome Is Caused by Hypomorphic Mutations in the Peroxisome-Biogenesis Genes PEX1 and PEX6.** *Am J Hum Genet* 2015, **97**(4):535-545.
140. Heimler A, Fox JE, Hershey JE, Crespi P: **Sensorineural hearing loss, enamel hypoplasia, and nail abnormalities in sibs.** *Am J Med Genet* 1991, **39**(2):192-195.
141. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J *et al*: **Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption.** *Science* 1999, **285**(5424):103-106.
142. Muller D, Kausalya PJ, Bockenbauer D, Thumfart J, Meij IC, Dillon MJ, van't Hoff W, Hunziker W: **Unusual clinical presentation and possible rescue of a novel claudin-16 mutation.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**(8):3076-3079.
143. Lee NP, Tong MK, Leung PP, Chan VW, Leung S, Tam PC, Chan KW, Lee KF, Yeung WS, Luk JM: **Kidney claudin-19: localization in distal tubules and collecting ducts and dysregulation in polycystic renal disease.** *FEBS Lett* 2006, **580**(3):923-931.
144. Bardet C, Courson F, Wu Y, Khaddam M, Salmon B, Ribes S, Thumfart J, Yamaguti PM, Rochefort GY, Figueres ML *et al*: **Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation.** *J Bone Miner Res* 2016, **31**(3):498-513.
145. Yamaguti PM, Neves FA, Hotton D, Bardet C, de La Dure-Molla M, Castro LC, Scher MD, Barbosa ME, Ditsch C, Fricain JC *et al*: **Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations.** *J Med Genet* 2017, **54**(1):26-37.
146. Takahashi C, Akiyama N, Matsuzaki T, Takai S, Kitayama H, Noda M: **Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-ras oncogene.** *Oncogene* 1996, **12**(10):2137-2146.
147. Suda N, Kitahara Y, Ohyama K: **A case of amelogenesis imperfecta, cleft lip and palate and polycystic kidney disease.** *Orthodontics & craniofacial research* 2006, **9**(1):52-56.
148. Aioub M, Lezot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G, Nefussi JR, Berdal A: **Msx2 -/- transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis.** *Bone* 2007, **41**(5):851-859.
149. Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C, Pibouin L, Orestes-Cardoso S, Papagerakis P, Maccougall M *et al*: **Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(13):7336-7341.

150. Witkop CJ, Jr., Brearley LJ, Gentry WC, Jr.: **Hypoplastic enamel, onycholysis, and hypohidrosis inherited as an autosomal dominant trait. A review of ectodermal dysplasia syndromes.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975, **39**(1):71-86.
151. Jumlongras D, Bei M, Stimson JM, Wang WF, DePalma SR, Seidman CE, Felbor U, Maas R, Seidman JG, Olsen BR: **A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome.** *Am J Hum Genet* 2001, **69**(1):67-74.
152. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL: **TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(9):648-657.
153. Nellist M, Verhaaf B, Goedbloed MA, Reuser AJ, van den Ouweland AM, Halley DJ: **TSC2 missense mutations inhibit tuberin phosphorylation and prevent formation of the tuberin-hamartin complex.** *Hum Mol Genet* 2001, **10**(25):2889-2898.
154. Harutunian K, Figueiredo R, Gay-Escoda C: **Tuberous sclerosis complex with oral manifestations: a case report and literature review.** *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 2011, **16**(4):e478-481.
155. Caricasole A, Ferraro T, Rimland JM, Terstappen GC: **Molecular cloning and initial characterization of the MG61/PORC gene, the human homologue of the Drosophila segment polarity gene Porcupine.** *Gene* 2002, **288**(1-2):147-157.
156. Wang X, Reid Sutton V, Omar Peraza-Llanes J, Yu Z, Rosetta R, Kou YC, Eble TN, Patel A, Thaller C, Fang P *et al*: **Mutations in X-linked PORCN, a putative regulator of Wnt signaling, cause focal dermal hypoplasia.** *Nat Genet* 2007, **39**(7):836-838.
157. Wright JT, Puranik CP, Farrington F: **Oral phenotype and variation in focal dermal hypoplasia.** *American journal of medical genetics Part C, Seminars in medical genetics* 2016, **172c**(1):52-58.
158. Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE *et al*: **Positional cloning of the APECED gene.** *Nat Genet* 1997, **17**(4):393-398.
159. Ferre EM, Rose SR, Rosenzweig SD, Burbelo PD, Romito KR, Niemela JE, Rosen LB, Break TJ, Gu W, Hunsberger S *et al*: **Redefined clinical features and diagnostic criteria in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy.** *JCI insight* 2016, **1**(13).
160. Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R *et al*: **CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry.** *Science* 2006, **312**(5777):1220-1223.
161. Lacruz RS, Feske S: **Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1.** *Ann NY Acad Sci* 2015, **1356**:45-79.
162. Zheng L, Zinn V, Lefkelidou A, Taqi N, Chatzistavrou X, Balam T, Nervina J, Papagerakis S, Papagerakis P: **Orai1 expression pattern in tooth and craniofacial ectodermal tissues and potential functions during ameloblast differentiation.** *Dev Dyn* 2015, **244**(10):1249-1258.
163. Tomatsu S, Orii KO, Vogler C, Nakayama J, Levy B, Grubb JH, Gutierrez MA, Shim S, Yamaguchi S, Nishioka T *et al*: **Mouse model of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (Galns<sup>-/-</sup>) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease.** *Hum Mol Genet* 2003, **12**(24):3349-3358.
164. de Almeida-Barros RQ, de Medeiros PF, de Almeida Azevedo MQ, de Oliveira Lira Ortega A, Yamamoto AT, Dornelas SK, Bento PM: **Evaluation of oral manifestations of patients with mucopolysaccharidosis IV and VI: clinical and imaging study.** *Clinical oral investigations* 2017.

165. HUCKERT M: **Identification de nouveaux gènes impliqués dans les anomalies crânio-faciales et bucco-dentaires.** *Génétique humaine.* Université de Strasbourg, 2015. Français. <NNT : 2015STRAJ033>. <tel-01363012>.
166. <http://www.dnagenotek.com/US/pdf/PD-PR-018.pdf>
167. <http://www.dnagenotek.com/US/pdf/PD-PR-015.pdf>
168. **Le séquençage a haut débit - méthodes et enjeux en médecine, pharmacologie et toxicologie - Concept paper (19/12/2011).**
169. LAUGEL V, LANGER A, RIPP R, CHOQUET P, CONSTANTINESCO A, MARRIE J, FRAULOUB V, SCHUHBAUR B, KOCH M, SCHMITTBUHL M *et al*: **Développement de la cavité buccale : Du gène à l'expression clinique chez l'homme.** *Lauréats de l'IFRO 2009, Les Cahiers de l'ADF*, 26, 13-21 2010.
170. Kirzioglu Z, Ulu KG, Sezer MT, Yuksel S: **The relationship of amelogenesis imperfecta and nephrocalcinosis syndrome.** *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 2009, **14**(11):e579-582.
171. Witkop CJ, Jr.: **Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited: problems in classification.** *Journal of oral pathology* 1988, **17**(9-10):547-553.
172. Aldred MJ, Savarirayan R, Crawford PJ: **Amelogenesis imperfecta: a classification and catalogue for the 21st century.** *Oral Dis* 2003, **9**(1):19-23.
173. Mukamel M, Karmazyn B, de Vries L, Horev G, Shohat M: **Brachyolmia and spinal stenosis.** *Am J Med Genet A* 2003, **120a**(2):272-275.
174. Cervenka J, Arthur D, Yasis C: **Mitomycin C test for diagnostic differentiation of idiopathic aplastic anemia and Fanconi anemia.** *Pediatrics* 1981, **67**(1):119-127.
175. Dundar B, Ercal D, Bober E, Berk T, Buyukgebiz A: **Amelogenesis imperfecta with growth hormone deficiency in a 12 year-old boy.** *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM* 2002, **15**(5):659-662.
176. Erlacher M, Strahm B: **Missing Cells: Pathophysiology, Diagnosis, and Management of (Pan)Cytopenia in Childhood.** *Frontiers in pediatrics* 2015, **3**:64.
177. Alaluusua S, Lukinmaa PL: **Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds--a review.** *International dental journal* 2006, **56**(6):323-331.
178. Bergendal B, Klar J, Stecksén-Blicks C, Norderyd J, Dahl N: **Isolated oligodontia associated with mutations in EDARADD, AXIN2, MSX1, and PAX9 genes.** *Am J Med Genet A* 2011, **155a**(7):1616-1622.
179. Bloch-Zupan A, Sedano H, C S: **Dento/oro/craniofacial anomalies and genetics;** 2012.
180. Brook AH: **A unifying aetiological explanation for anomalies of human tooth number and size.** *Arch Oral Biol* 1984, **29**(5):373-378.
181. Brook AH, Smith JM: **The aetiology of developmental defects of enamel: a prevalence and family study in East London, U.K.** *Connect Tissue Res* 1998, **39**(1-3):151-156; discussion 187-194.
182. Cobourne MT, Sharpe PT: **Diseases of the tooth: the genetic and molecular basis of inherited anomalies affecting the dentition.** *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology* 2013, **2**(2):183-212.
183. de La Dure-Molla M, Philippe Fournier B, Berdal A: **Isolated dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia: revision of the classification.** *Eur J Hum Genet* 2015, **23**(4):445-451.
184. Hennekam RCM, Allanson JE, Krantz ID, RJ G: **Gorlin's syndromes of the head and neck;** 2010.



185. Koch G: **Prevalence of enamel mineralisation disturbances in an area with 1-1.2 ppm F in drinking water. Review and summary of a report published in Sweden in 1981.** *European journal of paediatric dentistry : official journal of European Academy of Paediatric Dentistry* 2003, **4**(3):127-128.
186. Lammi L, Arte S, Somer M, Jarvinen H, Lahermo P, Thesleff I, Pirinen S, Nieminen P: **Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer.** *Am J Hum Genet* 2004, **74**(5):1043-1050.
187. Polder BJ, Van't Hof MA, Van der Linden FP, Kuijpers-Jagtman AM: **A meta-analysis of the prevalence of dental agenesis of permanent teeth.** *Community Dent Oral Epidemiol* 2004, **32**(3):217-226.
188. Cluzeau C, Hadj-Rabia S, Jambou M, Mansour S, Guigue P, Masmoudi S, Bal E, Chassaing N, Vincent MC, Viot G *et al*: **Only four genes (EDA1, EDAR, EDARADD, and WNT10A) account for 90% of hypohidrotic/anhidrotic ectodermal dysplasia cases.** *Hum Mutat* 2011, **32**(1):70-72.
189. Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J: **Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia.** *Nat Genet* 1999, **22**(4):366-369.
190. Monreal AW, Zonana J, Ferguson B: **Identification of a new splice form of the EDA1 gene permits detection of nearly all X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations.** *Am J Hum Genet* 1998, **63**(2):380-389.
191. Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI: **Mutation of PAX9 is associated with oligodontia.** *Nat Genet* 2000, **24**(1):18-19.
192. Tao R, Jin B, Guo SZ, Qing W, Feng GY, Brooks DG, Liu L, Xu J, Li T, Yan Y *et al*: **A novel missense mutation of the EDA gene in a Mongolian family with congenital hypodontia.** *Journal of human genetics* 2006, **51**(5):498-502.
193. Vastardis H, Karimbox N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE: **A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis.** *Nat Genet* 1996, **13**(4):417-421.
194. El-Sayed W, Parry DA, Shore RC, Ahmed M, Jafri H, Rashid Y, Al-Bahlani S, Al Harasi S, Kirkham J, Inglehearn CF *et al*: **Mutations in the beta propeller WDR72 cause autosomal-recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2009, **85**(5):699-705.
195. Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U, Pettersson U: **A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1).** *Genomics* 1991, **10**(4):971-975.
196. O'Sullivan J, Bitu CC, Daly SB, Urquhart JE, Barron MJ, Bhaskar SS, Martelli-Junior H, dos Santos Neto PE, Mansilla MA, Murray JC *et al*: **Whole-Exome sequencing identifies FAM20A mutations as a cause of amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia syndrome.** *Am J Hum Genet* 2011, **88**(5):616-620.
197. Acevedo AC, Poulter JA, Alves PG, de Lima CL, Castro LC, Yamaguti PM, Paula LM, Parry DA, Logan CV, Smith CE *et al*: **Variability of systemic and oro-dental phenotype in two families with non-lethal Raine syndrome with FAM20C mutations.** *BMC medical genetics* 2015, **16**:8.
198. Chae JH, Vasta V, Cho A, Lim BC, Zhang Q, Eun SH, Hahn SH: **Utility of next generation sequencing in genetic diagnosis of early onset neuromuscular disorders.** *J Med Genet* 2015, **52**(3):208-216.
199. DaRe JT, Vasta V, Penn J, Tran NT, Hahn SH: **Targeted exome sequencing for mitochondrial disorders reveals high genetic heterogeneity.** *BMC medical genetics* 2013, **14**:118.

200. Redin C, Le Gras S, Mhamdi O, Geoffroy V, Stoetzel C, Vincent MC, Chiurazzi P, Lacombe D, Ouertani I, Petit F *et al*: **Targeted high-throughput sequencing for diagnosis of genetically heterogeneous diseases: efficient mutation detection in Bardet-Biedl and Alstrom syndromes.** *J Med Genet* 2012, **49**(8):502-512.
201. Rehm HL: **Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic.** *Nature reviews Genetics* 2013, **14**(4):295-300.
202. Shearer AE, DeLuca AP, Hildebrand MS, Taylor KR, Gurrola J, 2nd, Scherer S, Scheetz TE, Smith RJ: **Comprehensive genetic testing for hereditary hearing loss using massively parallel sequencing.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(49):21104-21109.
203. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA: **An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes.** *Nature* 2012, **491**(7422):56-65.
204. Geoffroy V, Pizot C, Redin C, Piton A, Vasli N, Stoetzel C, Blavier A, Laporte J, Muller J: **VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants.** *PeerJ* 2015, **3**:e796.
205. **Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA.** <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> (accessed Feb 2015).
206. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR: **A method and server for predicting damaging missense mutations.** *Nature methods* 2010, **7**(4):248-249.
207. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR: **ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers.** *Nucleic acids research* 2003, **31**(13):3568-3571.
208. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C: **Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals.** *Nucleic acids research* 2009, **37**(9):e67.
209. Fairbrother WG, Yeh RF, Sharp PA, Burge CB: **Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes.** *Science* 2002, **297**(5583):1007-1013.
210. Kravtsov Y, Nekhaeva E, Chang C, Ebralidse K, K K: **Analysis of somatic mutations via long-distance single molecule PCR.** *DNA Amplif* 2004, **97-110**.
211. Kumar P, Henikoff S, Ng PC: **Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm.** *Nature protocols* 2009, **4**(7):1073-1081.
212. Pertea M, Lin X, Salzberg SL: **GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction.** *Nucleic acids research* 2001, **29**(5):1185-1190.
213. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D: **Improved splice site detection in Genie.** *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 1997, **4**(3):311-323.
214. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, Das S, Grody WW, Hegde MR, Lyon E, Ward BE: **ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007.** *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2008, **10**(4):294-300.
215. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D: **MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age.** *Nature methods* 2014, **11**(4):361-362.
216. Yeo G, Burge CB: **Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals.** *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 2004, **11**(2-3):377-394.
217. Bohring A, Stamm T, Spaich C, Haase C, Spree K, Hehr U, Hoffmann M, Ledig S, Sel S, Wieacker P *et al*: **WNT10A mutations are a frequent cause of a broad spectrum of**

- ectodermal dysplasias with sex-biased manifestation pattern in heterozygotes. *Am J Hum Genet* 2009, **85**(1):97-105.**
218. Darling TN, McGrath JA, Yee C, Gatalica B, Hametner R, Bauer JW, Pohla-Gubo G, Christiano AM, Uitto J, Hintner H *et al*: **Premature termination codons are present on both alleles of the bullous pemphigoid antigen 2/type XVII collagen gene in five Austrian families with generalized atrophic benign epidermolysis bullosa.** *J Invest Dermatol* 1997, **108**(4):463-468.
219. McGrath JA, Pulkkinen L, Christiano AM, Leigh IM, Eady RA, Uitto J: **Altered laminin 5 expression due to mutations in the gene encoding the beta 3 chain (LAMB3) in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa.** *J Invest Dermatol* 1995, **104**(4):467-474.
220. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic acids research* 2001, **29**(9):e45.
221. Ruano G, Kidd KK, Stephens JC: **Haplotype of multiple polymorphisms resolved by enzymatic amplification of single DNA molecules.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**(16):6296-6300.
222. Seymen F, Lee KE, Tran Le CG, Yildirim M, Gencay K, Lee ZH, Kim JW: **Exonal deletion of SLC24A4 causes hypomaturation amelogenesis imperfecta.** *J Dent Res* 2014, **93**(4):366-370.
223. van den Boogaard MJ, Creton M, Bronkhorst Y, van der Hout A, Hennekam E, Lindhout D, Cune M, Ploos van Amstel HK: **Mutations in WNT10A are present in more than half of isolated hypodontia cases.** *J Med Genet* 2012, **49**(5):327-331.
224. Wright JT, Torain M, Long K, Seow K, Crawford P, Aldred MJ, Hart PS, Hart TC: **Amelogenesis imperfecta: genotype-phenotype studies in 71 families.** *Cells Tissues Organs* 2011, **194**(2-4):279-283.
225. Beyeler M, Schild C, Lutz R, Chiquet M, Trueb B: **Identification of a fibronectin interaction site in the extracellular matrix protein ameloblastin.** *Experimental cell research* 2010, **316**(7):1202-1212.
226. Cho SH, Seymen F, Lee KE, Lee SK, Kweon YS, Kim KJ, Jung SE, Song SJ, Yildirim M, Bayram M *et al*: **Novel FAM20A mutations in hypoplastic amelogenesis imperfecta.** *Hum Mutat* 2012, **33**(1):91-94.
227. Floeth M, Bruckner-Tuderman L: **Digenic junctional epidermolysis bullosa: mutations in COL17A1 and LAMB3 genes.** *Am J Hum Genet* 1999, **65**(6):1530-1537.
228. Murrell DF, Pasmooij AM, Pas HH, Marr P, Klingberg S, Pfendner E, Uitto J, Sadowski S, Collins F, Widmer R *et al*: **Retrospective diagnosis of fatal BP180-deficient non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa suggested by immunofluorescence (IF) antigen-mapping of parental carriers bearing enamel defects.** *J Invest Dermatol* 2007, **127**(7):1772-1775.
229. Ogawa T, Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A, Rezvi GM, Sukegawa K, Kondo N, Suzuki Y, Shimozawa N, Oru T: **Mucopolysaccharidosis IVA: screening and identification of mutations of the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene.** *Hum Mol Genet* 1995, **4**(3):341-349.
230. Pasmooij AM, Pas HH, Jansen GH, Lemmink HH, Jonkman MF: **Localized and generalized forms of blistering in junctional epidermolysis bullosa due to COL17A1 mutations in the Netherlands.** *The British journal of dermatology* 2007, **156**(5):861-870.
231. Plaisancie J, Bailleul-Forestier I, Gaston V, Vaysse F, Lacombe D, Holder-Espinasse M, Abramowicz M, Coubes C, Plessis G, Faivre L *et al*: **Mutations in WNT10A are frequently involved in oligodontia associated with minor signs of ectodermal dysplasia.** *Am J Med Genet A* 2013, **161a**(4):671-678.

232. Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H, Huang S: **Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations.** *Journal of human genetics* 2010, **55**(8):534-540.
233. Xiao S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L, Fu G, Qian M, Yang J, Shi Y *et al*: **Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP.** *Nat Genet* 2001, **27**(2):201-204.
234. Zhang X, Diekwisch TG, Luan X: **Structure and function of ameloblastin as an extracellular matrix protein: adhesion, calcium binding, and CD63 interaction in human and mouse.** *Eur J Oral Sci* 2011, **119** Suppl 1:270-279.
235. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C *et al*: **Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability.** *N Engl J Med* 2012, **367**(20):1921-1929.
236. Gardner DG: **The dental manifestations of the Morquio syndrome (mucopolysaccharidosis type IV). A diagnostic aid.** *American journal of diseases of children (1960)* 1975, **129**(12):1445-1448.
237. Levin LS, Jorgenson RJ, Salinas CF: **Oral findings in the Morquio syndrome (mucopolysaccharidosis IV).** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975, **39**(3):390-395.
238. Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, Yang SH, Lu MM, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R *et al*: **Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis.** *Dev Biol* 2008, **313**(1):210-224.
239. Mendelsohn NJ, Wood T, Olson RA, Temme R, Hale S, Zhang H, Read L, White KK: **Spondyloepiphyseal dysplasias and bilateral legg-calve-perthes disease: diagnostic considerations for mucopolysaccharidoses.** *JIMD reports* 2013, **11**:125-132.
240. Rolling I, Clausen N, Nyvad B, Sindet-Pedersen S: **Dental findings in three siblings with Morquio's syndrome.** *International journal of paediatric dentistry* 1999, **9**(3):219-224.
241. Arzoo PS, Klar J, Bergendal B, Norderyd J, Dahl N: **WNT10A mutations account for (1/4) of population-based isolated oligodontia and show phenotypic correlations.** *Am J Med Genet A* 2014, **164a**(2):353-359.
242. Chan HC, Estrella NM, Milkovich RN, Kim JW, Simmer JP, Hu JC: **Target gene analyses of 39 amelogenesis imperfecta kindreds.** *Eur J Oral Sci* 2011, **119** Suppl 1:311-323.
243. Gregory-Evans CY, Moosajee M, Hodges MD, Mackay DS, Game L, Vargesson N, Bloch-Zupan A, Ruschendorf F, Santos-Pinto L, Wackens G *et al*: **SNP genome scanning localizes oto-dental syndrome to chromosome 11q13 and microdeletions at this locus implicate FGF3 in dental and inner-ear disease and FADD in ocular coloboma.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**(20):2482-2493.
244. Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O, Parker MJ, Archer H, Firth HV, Park SM, Canham N, Holder SE, Wilson M *et al*: **De novo loss-of-function mutations in SETD5, encoding a methyltransferase in a 3p25 microdeletion syndrome critical region, cause intellectual disability.** *Am J Hum Genet* 2014, **94**(4):618-624.
245. McKnight DA, Suzanne Hart P, Hart TC, Hartsfield JK, Wilson A, Wright JT, Fisher LW: **A comprehensive analysis of normal variation and disease-causing mutations in the human DSPP gene.** *Hum Mutat* 2008, **29**(12):1392-1404.
246. Mostowska A, Biedziak B, Zadurska M, Dunin-Wilczynska I, Lianeri M, Jagodzinski PP: **Nucleotide variants of genes encoding components of the Wnt signalling pathway and the risk of non-syndromic tooth agenesis.** *Clin Genet* 2013, **84**(5):429-440.
247. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC *et al*: **Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome.** *Nat Genet* 2010, **42**(9):790-793.

248. Tucci V, Kleefstra T, Hardy A, Heise I, Maggi S, Willemsen MH, Hilton H, Esapa C, Simon M, Buenavista MT *et al*: **Dominant beta-catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features.** *The Journal of clinical investigation* 2014, **124**(4):1468-1482.
249. Wood TC, Harvey K, Beck M, Burin MG, Chien YH, Church HJ, D'Almeida V, van Diggelen OP, Fietz M, Giugliani R *et al*: **Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA.** *Journal of inherited metabolic disease* 2013, **36**(2):293-307.
250. Bradford Y, Conlin T, Dunn N, Fashena D, Frazer K, Howe DG, Knight J, Mani P, Martin R, Moxon SA *et al*: **ZFIN: enhancements and updates to the Zebrafish Model Organism Database.** *Nucleic acids research* 2011, **39**(Database issue):D822-829.
251. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM: **A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3.** *Fly* 2012, **6**(2):80-92.
252. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, Philippakis AA, del Angel G, Rivas MA, Hanna M *et al*: **A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data.** *Nat Genet* 2011, **43**(5):491-498.
253. Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE: **The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease.** *Nucleic acids research* 2015, **43**(Database issue):D726-736.
254. Laugel-Haushalter V, Paschaki M, Thibault-Carpentier C, Dembele D, Dolle P, Bloch-Zupan A: **Molars and incisors: show your microarray IDs.** *BMC research notes* 2013, **6**:113.
255. Li H, Durbin R: **Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2010, **26**(5):589-595.
256. Redin C, Gerard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, Masurel-Paulet A, Willems M, Lesca G, El-Chehadeh S *et al*: **Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing.** *J Med Genet* 2014, **51**(11):724-736.
257. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J *et al*: **From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline.** *Current protocols in bioinformatics* 2013, **43**:11.10.11-33.
258. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR: **A global reference for human genetic variation.** *Nature* 2015, **526**(7571):68-74.
259. Asaka T, Akiyama M, Domon T, Nishie W, Natsuga K, Fujita Y, Abe R, Kitagawa Y, Shimizu H: **Type XVII collagen is a key player in tooth enamel formation.** *Am J Pathol* 2009, **174**(1):91-100.
260. Borradori L, Sonnenberg A: **Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes.** *J Invest Dermatol* 1999, **112**(4):411-418.
261. Chavanas S, Gache Y, Tadani G, Pulkkinen L, Uitto J, Ortonne JP, Meneguzzi G: **A homozygous in-frame deletion in the collagenous domain of bullous pemphigoid antigen BP180 (type XVII collagen) causes generalized atrophic benign epidermolysis bullosa.** *J Invest Dermatol* 1997, **109**(1):74-78.
262. Goldenberg-Cohen N, Banin E, Zalzstein Y, Cohen B, Rotenstreich Y, Rizel L, Basel-Vanagaite L, Ben-Yosef T: **Genetic heterogeneity and consanguinity lead to a "double hit": homozygous mutations of MYO7A and PDE6B in a patient with retinitis pigmentosa.** *Molecular vision* 2013, **19**:1565-1571.

263. Kim JW, Lee SK, Lee ZH, Park JC, Lee KE, Lee MH, Park JT, Seo BM, Hu JC, Simmer JP: **FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta.** *Am J Hum Genet* 2008, **82**(2):489-494.
264. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB *et al*: **Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans.** *Nature* 2016, **536**(7616):285-291.
265. McGrath JA, Gatalica B, Christiano AM, Li K, Owaribe K, McMillan JR, Eady RA, Uitto J: **Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa.** *Nat Genet* 1995, **11**(1):83-86.
266. **NHLBI GO Exome Sequencing Project. Exome Variant Server.** [accessed 2015 Feb 01]. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
267. Tasanen K, Floeth M, Schumann H, Bruckner-Tuderman L: **Hemizyosity for a glycine substitution in collagen XVII: unfolding and degradation of the ectodomain.** *J Invest Dermatol* 2000, **115**(2):207-212.
268. Vaisanen L, Has C, Franzke C, Hurskainen T, Tuomi ML, Bruckner-Tuderman L, Tasanen K: **Molecular mechanisms of junctional epidermolysis bullosa: Col 15 domain mutations decrease the thermal stability of collagen XVII.** *J Invest Dermatol* 2005, **125**(6):1112-1118.
269. Bharati S, Lev M: **Congenital polyvalvular disease.** *Circulation* 1973, **47**(3):575-586.
270. MacGibbon D: **Generalized enamel hypoplasia and renal dysfunction.** *Australian dental journal* 1972, **17**(1):61-63.
271. Nabulsi MM, Tamim H, Sabbagh M, Obeid MY, Yunis KA, Bitar FF: **Parental consanguinity and congenital heart malformations in a developing country.** *Am J Med Genet A* 2003, **116a**(4):342-347.
272. Wang SK, Aref P, Hu Y, Milkovich RN, Simmer JP, El-Khateeb M, Daggag H, Baqain ZH, Hu JC: **FAM20A mutations can cause enamel-renal syndrome (ERS).** *PLoS genetics* 2013, **9**(2):e1003302.
273. Wang SK, Reid BM, Dugan SL, Roggenbuck JA, Read L, Aref P, Taheri AP, Yeganeh MZ, Simmer JP, Hu JC: **FAM20A mutations associated with enamel renal syndrome.** *J Dent Res* 2014, **93**(1):42-48.
274. Yunis K, Mumtaz G, Bitar F, Chamseddine F, Kassab M, Rashkidi J, Makhoul G, Tamim H: **Consanguineous marriage and congenital heart defects: a case-control study in the neonatal period.** *Am J Med Genet A* 2006, **140**(14):1524-1530.



## Résumé

Les amélogénèses imparfaites (AI) constituent un groupe d'anomalies du développement affectant la structure et l'apparence clinique de l'émail. Le mode de transmission peut être autosomique dominant, récessif ou lié à l'X. Cette maladie génétique peut exister sous différentes formes (hypoplasique, hypominéralisée, hypomature) et de manière isolée ou associée à des syndromes. Plusieurs gènes impliqués dans les AI ont été identifiés, cependant de nouvelles mutations et de nouveaux gènes restent à identifier.

Le but de ce travail est de combiner l'étude de phénotype clinique et la biologie moléculaire pour améliorer la compréhension de corrélation phénotype-génotype afin de déterminer les mécanismes étiopathogéniques impliqués dans les amélogénèses imparfaites. La stratégie de recherche de ce travail repose sur une recherche translationnelle. Elle est centrée sur l'étude des familles informatives présentant des AI de type isolées ou syndromiques, puis un protocole de recherche (séquençage haut débit ciblé, séquençage Sanger, l'étude des modèles animaux...) est mis en place. Ces stratégies ont permis d'identifier de nouvelles mutations et nouveaux gènes. Ce travail a été rendu possible grâce au soutien financier du projet CNRST/INSERM 2015/2016 « Phénotype/Génotype : Amélogénèses imparfaites et familles marocaines ». Ce projet met en avant l'intérêt des collaborations internationales et le transfert des connaissances et de l'expertise entre les chercheurs marocains et français. Le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des patients atteints des amélogénèses imparfaites reposent actuellement sur la compréhension des processus complexes cliniques et génétiques impliqués dans les amélogénèses imparfaites. Enfin, des études futures plus approfondies seront nécessaires chez une cohorte importante, en adaptant les nouvelles technologies et les outils de séquençage de nouvelle génération.

**Mots clés :** Amélogénèses imparfaites-phénotype clinique- biologie moléculaire-diagnostic- familles-mutations

## Abstract

Amelogenesis Imperfecta (AI) is a group of developmental abnormalities affecting the structure and clinical appearance of the enamel. The mode of inheritance can be autosomal dominant, recessive or X-linked. This genetic disease can exist in different forms (hypoplastic, hypocalcified and hypomaturation) and in isolation or in association with syndromes. Several genes involved in AI have been identified, however new mutations and new genes remain to be identified. The aim of this work is to combine the study of clinical phenotype and molecular biology to improve the understanding of phenotype-genotype correlation in order to determine the etiopathogenic mechanisms involved in amelogenesis imperfecta. The research strategy of this work is based on a translational research. It is centered on the study of informative families presenting isolated or syndromic AI, and then a research protocol (Targeted high throughput sequencing, Sanger sequencing, study of animal models, etc.) is put in place. These strategies have allowed the discovery of novel mutations and genes in AI. This work was made possible through the financial support of the project CNRST/INSERM 2015/2016 « phenotype/genotype: amelogenesis imperfecta and Moroccan families ». This project highlights the interest of the international collaborations and the transfer of knowledge and the expertise between Moroccan and French researchers. The diagnosis and the treatment of patients with amelogenesis imperfecta are based currently on the understanding of the complex clinical and genetic processes involved in AI. Finally, further in-depth studies will be required in a large cohort, adapting new technologies and next-generation sequencing tools.

**Key words:** Amelogenesis imperfecta- clinical phenotype- molecular biology-diagnosis- families-mutations