

UNIVERSITE DE NANTES
U.F.R. D'ODONTOLOGIE

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANTES

Ecole doctorale Biologie-Santé
Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement le

18 Juin 2010

Par

Solmaz KHOSHNIAT

**MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LES
EFFETS DU PHOSPHATE SUR LA DIFFERENCIATION DES
CELLULES SQUELETTIQUES**

Devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

M. Joseph CAVERZASIO
M. David MAGNE

Professeur des Universités (Genève, Suisse)
Maître de Conférence des Universités (Boulogne/Mer)

Directeur de thèse :

M. Jérôme GUICHEUX

Directeur de recherche INSERM (Nantes)

Co-directeur de thèse :

M. Laurent BECK

Chargé de Recherche INSERM (Paris)

Examineurs :

M. Hervé KEMPF
M. Pierre MARIE
M. Pascal REBOUL
M. Pierre WEISS

Chargé de Recherche INSERM (Paris)
Directeur de recherche CNRS (Paris)
Maître de Conférence des Universités (Nancy)
Professeur des Universités (Nantes)

Publications:

1. S. KHOSHNIAT , M. JULIEN , A. LACREUSETTE, M. GATIUS, A. BOZEC, E. WAGNER, Y. WITTRANT, M. MASSON, P. WEISS, L. BECK, D. MAGNE, J. GUICHEUX (co first author) Phosphate dependent regulation of MGP in osteoblasts : role of ERK1/2 and Fra-1.

J Bone Miner Res, in press. Published online May 6, 2009:10.1359/jbmr.090508

2. S. KHOSHNIAT, M. JULIEN, A. BOURGINE, M. PETIT, T. ROUILLON, M. MASSON, M. GATIUS, P. WEISS, L. BECK, J. GUICHEUX Phosphate-dependent Stimulation of MGP and OPN Expression in Osteoblasts *via* the Erk1/2 Pathway is Modulated by Calcium
Cell Research, 2010 submitted

3. S. KHOSHNIAT, A. BOURGINE, M. JULIEN, P. WEISS, J. GUICHEUX , L. BECK (co last author) The emergence of phosphate as a specific signaling molecule
Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, submitted

4. V. LERAY, S. SERISIER, S. KHOSHNIAT, L. MARTIN, H. DUMON, P. NGUYEN
Adipose tissue gene expression in obese dogs after weight loss
J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2008 Jun;92(3):390-8

5. E. VERRON, M. MASSON, S. KHOSHNIAT, L. DUPLOMB, Y. WITTRANT, M. BAUD'HUIN, P. PILET, Z. BADRAN, P. WEISS, J.M. BOULER, J. GUICHEUX Gallium modulates osteoclastic bone resorption in vitro without affecting osteoblasts
Br J Pharmacol, in press

6. Y. WITTRANT, A. BOURGINE, S. KHOSHNIAT, B. ALLIOT-LICHT, M. MASSON, M. GATIUS, T. ROUILLON, , P. WEISS, L. BECK, J. GUICHEUX Inorganic phosphate regulates Glvr-1 and -2 expression: role of calcium and ERK1/2.
Biochem Biophys Res Commun. 2009, 381(2):259-63

7. A. BOURGINE, S. KHOSHNIAT , F. WAUQUIER, O. LISA, E. HUE, B. ALLIOT-LICHT, T. ROUILLON, , P. WEISS, L. BECK, J. GUICHEUX, Y. WITTRANT Inorganic Phosphate Stimulates Apoptosis in Odontoblastlike Cells
Journal of Dental Research, 2010 submitted

Abréviations

ADHR : rachitisme hypophosphatémique autosomal
AMPc : 3'-5' monophosphate cyclique
Ank : progressive ankylosis
Anx : Annexine
AP-1 : Activated Protein-1
ASARM : acidic serine-aspartate-rich MEPE associated motif
ASK1: Apoptosis Signal-Regulating Kinase
ATP : adénosine triphosphate
BCP : cristaux basiques de phosphate de calcium
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BSP : Bone Sialoprotéine
CA : corps apoptotique
CaBP : calcium binding protein
CaSR : Calcium Sensing Receptor, récepteur sensible au calcium
Cbfa-1 : Core binding factor alpha-1
Cbfb/Pebp2b : core binding factor b/polyoma enhancer binding protein 2 b
C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein
CPPD : calcium pyrophosphate dihydrate
C-Smad : Common mediator Smad
DAG : diacylglycérol
Dlv : dishevelled
Dlx-5: Distal-less homeobox-5
DMP-1 : dentin matrix protein 1
DPP : phosphoprotéine dentinaire
DSP : sialoprotéine dentinaire
DSPP : dentine sialophosphoprotéine
EGF : facteur de croissance épithélial
ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinase 1/2
FGF : facteur de croissance fibroblastique
FGFR : FGF Receptor

Fra-1 : Fos-related antigen-1

Fz : frizzled

GH: Growth Hormone, hormone de croissance

GSK-3 β : glycogen synthase kinase-3 β

lvr-1 : gibbon ape leukemia virus

Ihh : Indian Hedgehog

IP₃ : Inositol triphosphate

JNK: c-jun-N-terminal kinase

LRP : Low-density lipoprotein receptor-related protein

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MKP: MAPK Phosphatase

MEPE : Matrix extracellular phosphoglycoprotein

MGP : Matrix Gla Protein, Protéine Gla Matricielle

MMP : Métalloprotéase

Msx : Muscle segment homeobox gene

NFAT: nuclear factor of activated T-cells

NO: Monoxyde d'azote

NPP : Nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase

OF45 : Osteoblasts/osteocytes factor of 45kDa

OCN: Ostéocalcine

OPG: ostéoprotégérine

OPN : Ostéopontine

OSE-2: Osteoblast Specific Element-2

Phex : Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked

Pi : Phosphate inorganique

PIP₂ : Phosphoinositol diphosphate

PiT : Transporteur de phosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

PP2A : Protéine Phosphatase 2A

PMCA : Plasma Membrane Calcium-ATPase

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor γ

PPi : Pyrophosphate inorganique

PTH : Hormone parathyroïdienne
PTHrP : Hormone parathyroïdienne related peptide
PTHR1 : Parathyroid hormone receptor 1
Ram-1 : Amphoteric murine retrovirus
RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
R-Smad : receptor regulated Smad
Runx-2 : runt-related gene-2
sFRP-4 : secreted frizzled-related protein 4
SIBLING : small integrin binding ligand N-linked glycoproteins
STC-1: Stanniocalcine-1
TAK: Transforming Growth Factor beta Activated kinase
Tcf/Lef : T-Cell-Factor/Lymphocyte Enhancer-binding Factor
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TIO : ostéomalacie oncogénique
TNAP : Phosphatase alcaline tissu non spécifique
TNF : tumor necrosis factor
TRAIL: TNF related apoptosis induced ligand
VDR : Vitamin D Receptor
VM : Vésicule matricielle
VSMC : Cellules musculaires lisses de vaisseaux
Wnt : Wingless related
XLH : X-linked hypophosphatemia

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Structure d'un os long

Figure 2: Cellules du tissu osseux

Figure 3: Aspect histologique (coloration hematoxylin/eosin) et schématique de la plaque de croissance de tibia d'une souris âgée de deux semaines

Figure 4: Structure d'une dent

Figure 5: Schémas simplifiés des voies Wnt (a) non canonique et (b) canonique

Figure 6: Les voies de signalisation MAPK

Figure 7: Diagramme des facteurs proposés être impliqués dans la minéralisation

Figure 8: Formation des cristaux

Figure 9: Balance Pi/PPi

Figure 10: Mécanismes d'action hypothétique de la MGP sur l'activité ostéogénique de la BMP-2

Figure 11: Homéostasie du phosphate

Figure 12: Transport du phosphate au niveau dans le tubule proximal rénal

Figure 13: Transport du Pi dans les entérocytes

Figure 14: Représentation schématique des transporteur du Pi dans les ostéoblastes

Figure 15: Distribution du calcium dans l'organisme

Figure 16: Régulation de l'homéostasie du phosphate par les hormones calcitropes PTH et vitamine D

Figure 17: Régulation de l'homéostasie du calcium par les hormones calcitropes PTH et vitamine D

Figure 18: Régulation de l'homéostasie du phosphate par les facteurs phosphaturiques (phosphatonines)

Figure 19: Hybridations in situ sur des coupes de calvaria et d'os longs de souris, des lignées cellulaires murines et des ostéoblastes primaires

Figure 20: Rôles physiologiques hypothétiques de la protéine gla matricielle (MGP) dans les ostéoblastes en réponse au Pi

Tableau 1: Marqueurs des cellules du tissu minéralisé

Tableau 2: Liste non exhaustive des protéines composant la matrice extracellulaire osseuse

Tableau 3: Tableau récapitulatif des principales protéines régulatrices de la minéralisation

Tableau 4: Principales caractéristiques des transporteurs de phosphate sodium dépendants

Table des matières

Introduction	6
Chapitre I : Données bibliographiques	9
I. Les tissus calcifiés	10
1.1 Le tissu osseux	10
1.1.1 Fonctions	10
1.1.2 Morphologie	11
1.1.2.1 L'os cortical.....	11
1.1.2.2 L'os trabéculaire.....	12
1.1.3 Composition du tissu osseux	12
1.1.3.1 Les cellules du tissu osseux.....	12
a) Ostéoblastes.....	12
b) Cellules bordantes.....	13
c) Ostéocytes	13
d) Ostéoclastes.....	14
1.1.3.2 La matrice extracellulaire	14
a) Matrice extracellulaire organique	14
b) Matrice extracellulaire inorganique	15
1.2 Le cartilage de la plaque de croissance	15
1.2.1 Organisation de la plaque de croissance	16
1.2.2 Chondrocytes de la plaque de croissance	16
1.3 Le tissu dentaire	17
1.3.1 La dentine	17
1.3.1.1 Structure	17
1.3.1.2 Odontoblastes	18
1.3.2 L'émail	19
1.3.2.1 Structure	19
1.3.2.2 Améloblastes	19
1.3.3 Le ciment	19
1.3.3.1 Structure	19
1.3.3.2 Cellules du ciment	20
1.3.4 L'os alvéolaire.....	20
1.4 Développement et différenciation squelettiques	20
1.4.1 Ostéogenèse et dentinogenèse.....	20

Table des matières

1.4.2 Implication des facteurs de transcription	22
1.4.2.1 Runx-2	22
1.4.2.2 Osterix	24
1.4.2.3 Tcf/Lef - NFAT	24
1.4.2.4 AP-1	26
1.4.2.5 Dlx-5.....	28
1.4.2.6 Msx-1 et Msx-2	28
1.5 Implication des MAPK dans la différenciation squelettique	29
1.5.1 Généralités.....	29
1.5.2 Régulation de la différenciation des chondrocytes par les MAPK	31
1.5.3 Régulation de la différenciation des ostéoblastes par les MAPK	32
II. Processus de minéralisation.....	34
2.1 Minéralisation	34
2.1.1 Cristaux	35
2.1.2 Fibres de collagène.....	36
2.1.3 Nucléation et croissance cristalline	37
2.2 Régulation de la minéralisation.....	39
2.2.1 Protéines favorisant la minéralisation	40
2.2.1.1 Dentine Sialophosphoprotéine (DSPP)	40
2.2.1.2 Phosphatase alcaline tissu non spécifique (TNAP).....	41
2.2.1.3 Sialoprotéine osseuse	42
2.2.1.4 Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1).....	42
2.2.1.5 Ostéonectine	43
2.2.1.6 Annexin (Anx).....	43
2.2.1.7 Phospho-1	44
2.2.1.8 Stanniocalcine 1 (STC1)	45
2.2.2 Protéines inhibant la minéralisation	46
2.2.2.1 Fétuine-A.....	46
2.2.2.2 Matrix Gla Protein (MGP)	47
2.2.2.3 Ostéopontine (OPN).....	48
2.2.2.4 Ostéocalcine (OCN) ou Bone Gla Protein (BGP).....	49
2.2.2.5 Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP)	50
2.2.2.6 Progressive ankylosis (Ank).....	50
2.2.2.7 Ostéoprotégérine (OPG).....	51

Table des matières

2.3 Calcifications ectopiques	51
2.3.1 Défauts des inhibiteurs de la calcification.....	52
2.3.2 Excès des promoteurs de la calcification	52
III. Homéostasie phosphocalcique	55
3.1 Phosphate	55
3.1.1 Rôles du phosphate.....	55
3.1.2 Distribution, origine et apport journalier de phosphate.....	56
3.1.3 Transport du phosphate	56
3.1.3.1 Reins.....	57
3.1.3.2 Intestin	58
3.1.3.3 Os	58
3.2 Calcium	60
3.2.1 Distribution du calcium.....	60
3.2.2 Rôles.....	60
3.2.3 Organes principaux de l'homéostasie calcique.....	60
3.2.4 Transport et détection du calcium	61
3.2.4.1 Intestin.....	61
3.2.4.2 Rein	62
3.2.4.3 Os	62
3.3 Homéostasie phosphocalcique	63
3.3.1 Influence de l'apport alimentaire	63
3.3.2 Les hormones calciotropes	65
3.3.2.1 Hormone parathyroïdienne (PTH)	65
3.3.2.2 [1,25(OH) ₂ D ₃]	66
3.3.3 Les phosphatonines	68
3.3.3.1 Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) et Klotho.....	68
3.3.3.2 Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE).....	70
3.3.3.3 Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1).....	71
3.3.3.4 Secreted frizzled-related protein-4 (sFRP-4)	71
3.3.3.5 Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX).....	72
IV. Effets cellulaires et moléculaires du Pi	73
4.1 Article 1: The emergence of phosphate as a specific signaling molecule.....	73
4.2 Effets du Pi	74
4.2.1 Effets du Pi sur les ostéoblastes	74

Table des matières

4.2.2 Effets du Pi sur les autres cellules des tissus squelettiques.....	78
4.2.3 Effets du Pi sur les cellules des tissus non squelettiques	81
4.3 Implication du calcium dans les effets du Pi.....	82
4.4 Effets du phosphate et cristaux phosphocalciques	83
4.4.1 Sur les ostéoblastes.....	83
4.4.2 Sur les autres cellules	84
Chapitre II : Effets du phosphate inorganique sur la différenciation des cellules ostéoblastiques et analyse des mécanismes moléculaires impliqués	87
I. Problématique	88
1.1 Article 2 : Rôle de ERK1/2 et Fra-1 dans la stimulation de l'expression de la MGP par le phosphate dans les ostéoblastes.....	91
1.2 Article 3 : Modulation des effets stimulateurs du Pi sur l'expression de MGP et OPN par le calcium	93
II. Discussion.....	95
Chapitre III : Effets du phosphate inorganique sur la différenciation des cellules odontoblastiques et analyse des mécanismes moléculaires impliqués	104
I. Problématique	105
2.1 Article 4 : Le phosphate inorganique régule l'expression des transporteurs de phosphate sodium dépendants PiT-1 et PiT-2 : rôle du calcium et de ERK1/2.....	107
2.2 Article 5 : Le phosphate inorganique stimule l'apoptose dans les cellules odontoblastiques.....	108
II. Discussion.....	109
Conclusions et perspectives	113
Bibliographie.....	116

Introduction

Le tissu osseux revêt une importance capitale pour l'organisme tant sur le plan biomécanique que sur le plan métabolique. La présence d'une matrice extracellulaire minéralisée confère en effet à ce tissu une solidité et une rigidité qui permet la protection des organes vitaux de tous les vertébrés, ainsi que leur locomotion. En plus de ces propriétés de soutien et de protection, la fraction minérale du tissu osseux, composée essentiellement d'hydroxyapatite, permet au tissu osseux d'agir comme une réserve de calcium et de phosphate et ainsi de participer activement à l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme. Ces minéraux sont également retrouvés au sein du tissu dentaire, qui présente l'originalité de regrouper sur une petite surface quatre tissus minéralisés que sont l'os alvéolaire, la dentine, le ciment, et l'émail.

L'homéostasie du phosphate dans l'organisme est essentiellement sous le contrôle de l'activité des reins, de l'intestin et du tissu osseux. Un déséquilibre de cette homéostasie entraîne des hyper ou des hypophosphatémies, qui peuvent conduire à des anomalies de la calcification des tissus osseux (rachitisme ou ostéomalacie) ou extra-osseux (calcifications vasculaires, par exemple). Parallèlement à son rôle dans la minéralisation de la matrice extracellulaire, le phosphate est décrit depuis une dizaine d'années comme pouvant jouer le rôle de molécule de signalisation, permettant l'activation de voies intracellulaires et la régulation de l'expression de nombreux gènes dans différents types cellulaires dont les cellules squelettiques. Ainsi, à l'instar du calcium, le phosphate participe à de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la différenciation ou l'apoptose des cellules. Malgré l'ensemble des études qui décrivent le phosphate comme un facteur extracellulaire capable d'activer de nombreux processus cellulaires, les mécanismes mis en œuvre dans la régulation de ces processus restent peu décrits.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient d'apporter des éléments de réponse quant à l'effet des ions phosphate dans la différenciation des cellules des tissus squelettiques, ainsi que l'implication des ions calcium et des précipités de phosphate de calcium dans ces effets. L'étude de ces mécanismes est déterminante pour la compréhension des nombreuses pathologies pouvant affecter les tissus minéralisés mais également les tissus non calcifiés de l'organisme.

Dans un premier chapitre, nous exposerons les principales caractéristiques des tissus calcifiés que sont les tissus osseux, dentaire, et du cartilage de la plaque de croissance ainsi que les

connaissances actuelles relatives à la formation de ces tissus. Puis nous nous attacherons à décrire le processus de minéralisation ainsi que les molécules régulatrices de ce mécanisme en précisant les pathologies pouvant découler d'un contrôle défectueux de ce processus. Dans un troisième point, nous présenterons l'homéostasie phosphocalcique en mettant l'accent sur le métabolisme du phosphate et l'importance de sa régulation ainsi que sur les conséquences pouvant résulter de son déséquilibre. Enfin, nous terminerons en nous focalisant sur l'importance du rôle joué par les ions phosphate dans l'activité des cellules squelettiques et les mécanismes moléculaires impliqués, et nous ferons le point sur l'implication du calcium ou des cristaux dans ces mécanismes.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit sera consacré à la présentation de nos études expérimentales concernant l'implication du phosphate inorganique (Pi), des ions calcium et des précipités de phosphate de calcium dans la différenciation des cellules ostéoblastiques. Les mécanismes moléculaires responsables des effets des ions calcium, phosphate et des précipités de phosphate de calcium seront également décrits. Ces études visent à mieux comprendre le rôle de ces ions dans la régulation physiologique de l'activité des ostéoblastes. Le troisième chapitre de ce manuscrit consistera à présenter l'effet des ions phosphate et calcium sur la différenciation et l'apoptose des cellules odontoblastiques et s'attachera à décrire les mécanismes impliqués.

Enfin, le dernier chapitre présentera les conclusions de cette thèse et ouvrira de nouvelles perspectives quant à la suite de ces travaux.

Chapitre I : Données bibliographiques

I. LES TISSUS CALCIFIES

Bien que les études menées au cours de cette thèse se soient principalement focalisées sur les mécanismes intracellulaires au sein de cellules ostéoblastiques murines, il est intéressant de décrire, outre le tissu osseux et son développement, le tissu dentaire et le cartilage de la plaque de croissance. En effet, chez les mammifères supérieurs, ces tissus ont la propriété d'être minéralisés ou de se calcifier au cours de leur développement. Les tissus osseux et dentaire présentent des similitudes quant à leur composition biochimique. En effet, leur matrice extracellulaire est composée majoritairement de collagène de type I et de cristaux d'apatite. Cependant il existe des différences entre ces deux tissus. Ainsi, contrairement à l'os, la dentine ne subit pas de remaniements, n'est pas vascularisée, présente une innervation limitée aux couches internes et son aspect histologique est très différent de celui du tissu osseux. En ce qui concerne le cartilage de la plaque de croissance, il dérive de cellules souches mésenchymateuses. Ce tissu est transitoire et présente la particularité de se calcifier, à la différence des autres cartilages (fibreux ou élastique) présents dans l'organisme.

1.1 Le tissu osseux

1.1.1 Fonctions

L'os est un tissu conjonctif squelettique hautement spécialisé caractérisé par sa matrice extracellulaire minéralisée. Il possède un rôle de protection des organes vitaux et est également le support mécanique essentiel du squelette, permettant la locomotion. Ce tissu est une structure dynamique en perpétuel remaniement : il est continuellement produit par les ostéoblastes et résorbé par les ostéoclastes (1). Ce remodelage lui confère la capacité de se régénérer, d'adapter sa masse, sa forme, et ses propriétés intrinsèques à des modifications d'ordre biomécanique. Ce remaniement permanent lui permet aussi de contribuer dans une large mesure (conjointement avec l'intestin et les reins) au maintien de l'homéostasie ionique par la libération ou le stockage de sels minéraux, en particulier des ions calcium et des ions phosphate. Enfin, le tissu osseux a une fonction hématopoïétique par le biais de la moelle osseuse. En effet, les cellules souches de la moelle sont à l'origine des trois lignées de cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes, thrombocytes). De plus, la moelle renferme des cellules souches multipotentes capables de se différencier en diverses lignées cellulaires (ostéoblastes,

chondrocytes, adipocytes,...) (2). Enfin de manière très intéressante, une nouvelle fonction endocrine a récemment été attribuée à l'os, qui interviendrait dans le métabolisme énergétique de l'organisme en modulant l'insulinosécrétion et l'insulinosensibilité (3, 4).

1.1.2 Morphologie

Il existe différents types d'os : les os longs (exemple : fémur), courts (exemple : phalange) ou plats (exemple : scapula). Tous ces os sont entourés de périoste, constitué par une couche externe de tissu conjonctif fibreux et une couche interne de cellules ostéoprogénitrices, excepté au niveau du cartilage articulaire. La cavité centrale des os longs, appelée canal médullaire et contenant la moelle osseuse, est bordée par l'endoste. L'endoste est constitué de tissu conjonctif contenant cellules ostéoprogénitrices et cellules bordantes (Figure 1).

Le tissu osseux est un tissu innervé et vascularisé, qui sous sa forme adulte, est qualifié de lamellaire, car la matrice osseuse est disposée en lamelles superposées où les fibres de collagène sont disposées régulièrement. Chez le fœtus et l'enfant, ainsi qu'en cas de fracture, la trame de collagène produite par les ostéoblastes est irrégulière et le tissu osseux est transitoirement non-lamellaire (os tissé).

Selon l'arrangement des lamelles, le tissu osseux se présente sous deux aspects distincts : l'os cortical et l'os trabéculaire (Figure 1) (5).

1.1.2.1 L'os cortical

L'os cortical, autrement appelé compact ou haversien, constitue 75% des surfaces osseuses et forme principalement la diaphyse des os longs et l'enveloppe de l'épiphyse des os longs, courts et plats. Le tissu osseux cortical est composé de systèmes de Havers (également appelés ostéones ou ostéons), constitués de lamelles osseuses concentriques disposées autour du canal de Havers. Au sein de ces ostéones se situent les ostéocytes. Les canaux de Havers sont traversés par des capillaires sanguins et des fibres nerveuses et sont reliés entre eux, avec la cavité médullaire et la surface de l'os par des canaux transversaux appelés canaux de Volkmann (Figure 1). Cette disposition confère à l'os compact sa résistance aux contraintes mécaniques.

1.1.2.2 L'os trabéculaire

L'os trabéculaire ou os spongieux représente 25% des surfaces osseuses et constitue l'essentiel des os courts ou plats et les épiphyses des os longs (Figure 1). Il est constitué de trabécules de tissu osseux, anastomosées et ramifiées, délimitant des espaces communicants occupés par de la moelle osseuse et des vaisseaux.

1.1.3 Composition du tissu osseux

Le tissu osseux est constitué d'une matrice extracellulaire et de différents types cellulaires (Figure 2).

1.1.3.1 Les cellules du tissu osseux

Les cellules bordantes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont les cellules ostéoformatrices, tandis que les ostéoclastes sont les cellules ostéorésorbantes. Nous nous focaliserons essentiellement sur les ostéoblastes car ces cellules constituent le principal modèle utilisé au cours de ce travail de thèse.

a) Ostéoblastes

Les ostéoblastes dérivent de cellules souches mésenchymateuses (7). Ces cellules souches mésenchymateuses s'engagent vers la voie ostéoblastique principalement sous le contrôle de facteurs de transcription tels que le runt-related gene-2 (Runx-2) (8, 9) ou osterix (10). Ces cellules de 20 à 30 μm sont mononucléées, et sont situées à la surface externe et interne de l'os en croissance. Elles émettent des prolongements cytoplasmiques leur permettant de communiquer entre elles et avec les ostéocytes via la formation de jonction de type gap (11). Elles expriment dans un premier temps le collagène de type I, la phosphatase alcaline non spécifique (TNAP) ou l'ostéopontine (OPN), puis des marqueurs tardifs de la différenciation telles que l'ostéocalcine (OCN) ou la protéine gla matricielle (MGP) (Tableau 1). Les ostéoblastes ont deux fonctions majeures : la synthèse de la matrice extracellulaire osseuse et

sa minéralisation. Ces cellules contribuent également à la différenciation des ostéoclastes en sécrétant notamment des cytokines comme le receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL). L'ostéoblaste est contrôlé de façon complexe par différentes hormones comme l'hormone parathyroïdienne (PTH), l'hormone de croissance (GH), la vitamine D₃, les corticoïdes et les stéroïdes sexuels, ainsi que par des facteurs locaux tels que le Transforming Growth Factor β (TGF- β) et les Bone Morphogenetic Proteins (BMP) (13). Lorsque l'ostéoblaste a terminé la déposition de la matrice, il peut évoluer vers trois voies distinctes : soit devenir un ostéocyte (14), soit devenir une cellule bordante, soit mourir par apoptose, ce qui semble advenir à plus de 80% des ostéoblastes (15 , 16).

b) Cellules bordantes

Les cellules bordantes sont des ostéoblastes ayant une activité métabolique réduite (13). Elles revêtent la surface osseuse au niveau de l'endoste et du périoste. Il a été montré que sous l'influence de stimuli, ces cellules soient capables de redevenir des ostéoblastes actifs (17).

c) Ostéocytes

Dix à 20% des ostéoblastes deviennent des ostéocytes emmurés dans la matrice extracellulaire minéralisée dans une logette appelée ostéoplaste. Ces ostéocytes communiquent entre eux par un réseau de canalicules contenant leurs prolongements cytoplasmiques et au travers duquel circulent nutriments et déchets. La transition entre ostéoblastes et ostéocytes est caractérisée par une diminution de l'expression du collagène de type I et de la TNAP et une expression augmentée de marqueurs tels que la dentin matrix protein 1 (DMP-1), la matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) ou la sclérostine (18 , 19) (Tableau 1). Les ostéocytes pourraient intervenir dans la régulation de la formation osseuse via la synthèse de la sclérostine (20). Ils joueraient également un rôle dans la transmission des variations de contraintes mécaniques appliquées au tissu osseux et participeraient ainsi au contrôle du remodelage osseux (21).

d) Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées d'origine hématopoïétique. Elles mesurent 20 à 100 µm de diamètre. La spécialisation des pro-monocytes en ostéoclastes se fait sous l'influence de facteurs de transcription et de facteurs de croissance dont les principaux sont le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), le RANKL et l'ostéoprotégérine (OPG). La fusion des cellules précurseurs entraîne la formation d'une cellule multinucléée.

Lorsque ces cellules sont activées, elles présentent une bordure en brosse à leur niveau apical, qui assure leur activité de résorption osseuse (13). Le pôle basolatéral de ces cellules se trouve au niveau de la moelle osseuse (22). Cette bipolarité morphologique est essentielle à leur fonction de résorption osseuse. L'ostéoclaste sécrète par sa bordure en brosse apicale des protons, qui acidifient le compartiment de résorption et permettent la dissolution et la résorption du minéral, et plusieurs types d'enzymes néosynthétisées, assurant quant à elles la dégradation de la phase organique. Il s'agit de phosphatases acides, d'arylsulfatases, de la β -glucuronidase, de la β -glycérophosphatase, de diverses cystéine-protéinases incluant les cathepsines B, C, D, L et K ainsi que des métalloprotéases (MMP) telles que les gélatinases et les collagénases de type I et IV (23). Ces enzymes, actives à pH acide, participent à la dégradation de la matrice extracellulaire. Quelques marqueurs ostéoclastiques sont présentés dans le tableau 1. L'ostéoclaste, très mobile, se déplace au cours de la résorption osseuse sur les travées osseuses et à l'intérieur des lacunes de résorption qu'elles créent, appelées « lacunes de Howship ». Après un nombre probablement déterminé de cycles « résorption-migration », l'ostéoclaste entre dans un processus d'apoptose (23).

1.1.3.2 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du tissu osseux peut être subdivisée en une partie organique (22%) et une partie inorganique (69%). La teneur en eau de cette matrice, d'environ 9%, est dépendante de l'âge et du degré de minéralisation du tissu.

a) Matrice extracellulaire organique

La matrice organique constitue la bordure ostéoïde synthétisée par les ostéoblastes et est composée pour 90% de fibres de collagène de type I. La substance interfibrillaire comprend

des glycosaminoglycannes, des protéoglycannes et de nombreuses protéines non collagéniques comme l'OCN, l'ostéonectine, l'OPN, la MGP et les sialoprotéines osseuses. Ces molécules, répertoriées dans le tableau 2, sont des régulateurs du métabolisme cellulaire, de la minéralisation, et du remodelage osseux (25).

b) Matrice extracellulaire inorganique

La matrice ostéoïde, synthétisée par les ostéoblastes, est progressivement minéralisée du fait de la présence de sels minéraux et plus particulièrement de calcium et de phosphate qui précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite qui seront détaillés dans la seconde partie de cette introduction. Ces cristaux se fixent sur et entre les fibres de collagène et confèrent sa rigidité au tissu osseux (26).

1.2 Le cartilage de la plaque de croissance

Bien que n'ayant pas fait l'objet d'études expérimentales au cours de cette thèse, il est important d'intégrer le cartilage de la plaque de croissance dans l'étude des tissus calcifiés car d'une part, il a la propriété unique parmi les différents types de cartilage de se minéraliser et d'autre part, il contribue à la formation des os via le mécanisme d'ossification endochondrale. Trois types de cartilage sont décrits au sein de l'organisme : le cartilage fibreux, élastique et hyalin. Le cartilage fibreux possède une structure qui lui confère une résistance aux compressions et aux tractions, c'est pourquoi il est retrouvé au niveau des zones d'insertion de certains tendons et des disques intervertébraux (27, 28). Le cartilage élastique est caractérisé par la présence de fibres élastiques qui lui confèrent une résistance à la flexion. Il est localisé quant à lui dans des zones anatomiques souples tels que l'oreille externe ou l'épiglotte (29). Le cartilage hyalin est le plus répandu. Il possède une matrice extracellulaire riche en collagène et en protéoglycannes. Cette composition confère au cartilage hyalin la capacité d'amortir les contraintes subies par l'articulation. Le cartilage est doté d'une faible capacité d'auto-régénération, c'est pourquoi des approches de thérapies cellulaires ont été développées afin de réparer des défauts cartilagineux (30, 31, 32). Le cartilage hyalin est subdivisé en cartilage articulaire et non articulaire (28). Le cartilage hyalin non articulaire entre dans la constitution de certains organes comme le larynx. Mais ce cartilage hyalin non articulaire

forme également l'ébauche cartilagineuse qui participe à la formation des os longs et est appelé cartilage de croissance (33). Seul ce dernier sera décrit dans ce manuscrit.

1.2.1 Organisation de la plaque de croissance

La plaque de croissance est la structure qui permet la croissance en longueur des os longs lors de l'ossification endochondrale ayant lieu chez le fœtus et l'enfant. Cet espace cartilagineux est situé entre la diaphyse et les épiphyses des os longs et est organisé en quatre zones distinctes (Figure 3) :

- La zone de réserve constituée de chondroprogéniteurs.
- La zone proliférative où les chondrocytes prolifèrent et s'ordonnent de manière longitudinale en formant des colonnes. Cette zone est primordiale pour la croissance en longueur des os.
- La zone hypertrophique où les chondrocytes se différencient en chondrocytes hypertrophiques et vont contribuer à la minéralisation de la matrice extracellulaire qu'ils ont synthétisée.
- La zone d'invasion vasculaire, ou zone d'ossification, qui est une zone de transition entre le cartilage et l'os.

Dans la plaque de croissance, la concentration de phosphate inorganique (Pi) et la concentration en oxygène croissent de la zone proliférative vers la zone hypertrophique (35 , 36). Ces éléments associés aux facteurs modulant la prolifération, la maturation et l'apoptose des chondrocytes tels que la Parathyroïd hormone related peptide (PTHrP), l'Indian Hedgehog (Ihh), l'hormone de croissance ou les BMP sont responsables de la croissance des os en longueur (37 , 38).

La plaque de croissance épiphysaire termine son ossification à la fin de la puberté chez l'homme. La croissance en longueur se termine avec la fermeture de la plaque de croissance épiphysaire.

1.2.2 Chondrocytes de la plaque de croissance

Les chondrocytes dérivent de cellules mésenchymateuses. Dans la zone de réserve, les cellules sont en phase de quiescence. Puis elles vont proliférer en formant des colonnes de

manière longitudinale. Ces cellules vont finalement se différencier en exprimant notamment du collagène de type II, IX et XI, ainsi que de l'aggrécane et des glycosaminoglycanes sulfatés. La différenciation terminale de ces chondrocytes conduit à leur hypertrophie. A ce stade, ces cellules expriment du collagène de type X, de la MGP, de la TNAP, de l'OPN, de l'OCN, et des MMP (Tableau 1) qui vont dégrader la matrice en place, ainsi que le facteur vascular endothelial growth factor (VEGF), qui va permettre la vasculogénèse de la zone hypertrophique. Parallèlement à cela, une diminution de l'expression du collagène de type II, IX et XI est observée (37). Le devenir des chondrocytes hypertrophiques reste encore un sujet de controverses. La majorité des études menées montre qu'ils meurent par apoptose (37). Ainsi il a été reporté une perte de leur potentiel membranaire mitochondrial (39) et une dégradation de leur ADN (40, 41). Cependant, d'autres études ont montré que ces chondrocytes subissaient une transdifférenciation vers un phénotype ostéoblastique (42) ou qu'une dernière division du chondrocyte hypertrophique donnait naissance à deux cellules filles dont l'une mourrait par apoptose et l'autre se transdifférençait en ostéoblaste (43, 44). Cependant, les données actuelles de la littérature privilégient la première hypothèse (37).

1.3 Le tissu dentaire

La structure de base de la dent est invariable et est définie par une couronne faisant saillie hors de la gencive et d'une ou de plusieurs racines implantées dans les os maxillaires et mandibulaires. Les principaux rôles des dents chez l'homme sont la mastication et la phonation, alors qu'elles jouent également un rôle de préhension et de défense chez les autres animaux. La dent est constituée de quatre principaux tissus que sont de l'intérieur vers l'extérieur la pulpe dentaire, la dentine, l'émail et le ciment (Figure 4). La pulpe dentaire est un tissu conjonctif non minéralisé, tandis que les trois autres tissus sont calcifiés.

1.3.1 La dentine

1.3.1.1 Structure

La dentine (ou ivoire) constitue le tissu dentaire le plus important par sa masse. Elle est recouverte dans les conditions normales par de l'émail dentaire au niveau de la couronne dentaire et par du ciment au niveau de la racine dentaire (Figure 4). La dentine, dont

composition est très proche de celle de l'os, entoure la pulpe dentaire. Elle est constituée d'une matrice extracellulaire composée d'une phase minérale (cristaux d'apatite, 70%), d'une phase organique (collagène de type I et protéines acides phosphorylées, 20%), d'eau (10%) ; et de cellules spécialisées qui la sécrètent: les odontoblastes (45). Elle est parcourue par de très nombreux ($50\ 000/\text{mm}^2$) canalicules (ou tubules dentinaires). Ceux-ci, perpendiculaires à la surface de la matrice, contiennent un fin prolongement cytoplasmique provenant des odontoblastes. La dentine est un tissu fortement innervé. Les terminaisons nerveuses sont en contact, en particulier via des jonctions de type gap, avec les odontoblastes et leurs prolongements cytoplasmiques, ce qui fait de la dentine un tissu très sensible aux stimuli thermiques, chimiques ou mécaniques (46). Trois types de dentine sont communément décrits dans la littérature : la dentine primaire, qui est la dentine initiale et dont la structure est régulière, la dentine secondaire formée tout au long de la vie et dont l'ordonnement s'altère suite à des contraintes fonctionnelles. Ces deux types de dentine sont produits de manière physiologique. En revanche, le dernier type de dentine décrit, la dentine tertiaire ou de réparation, se forme suite à des atteintes dentinaires et possède une structure désorganisée (47).

1.3.1.2 Odontoblastes

Les odontoblastes sont des cellules cylindriques issues des crêtes neurales. Leur noyau, situé au pôle basal, est allongé. La partie apicale des cellules se termine par un fin prolongement cytoplasmique qui s'étend dans un canalicule de la dentine. Ces prolongements, contenant mitochondries, éléments du cytosquelette et vésicules de sécrétion, jouent un rôle dans la synthèse des composants organiques de la matrice extracellulaire (48). Le phénotype odontoblastique est principalement caractérisé par la présence de deux molécules qui sont la phosphoprotéine dentinaire ou phosphophoryne (DPP) et la sialoprotéine dentinaire (DSP), dérivant du clivage d'une protéine commune : la dentine sialophosphoprotéine (DSPP), qui est également exprimée par l'os (49) (Tableau 1). L'odontoblaste exprime également DMP-1, DMP-2, et DMP-3, ainsi que des petites protéines non collagéniques retrouvées dans l'os telles que la MGP (50), l'OPN, la sialoprotéine osseuse, l'ostéonectine ou l'OCN (51).

1.3.2 L'émail

1.3.2.1 Structure

L'émail recouvre la dentine au niveau de la couronne. L'émail contient près de 99 % de sels minéraux avec moins de 1 % de matrice organique. L'émail mature est constitué de prismes d'émail séparés par de l'émail interprismatique. Les prismes de l'émail consistent en des groupes de longs et fins cristaux d'apatite de 4 à 8 μm disposés parallèlement, et qui sont recouverts par une couche superficielle de matrice organique. L'émail interprismatique est formé de cristaux semblables mais orientés dans une direction différente (52).

1.3.2.2 Améloblastes

Les améloblastes sont des cellules épithéliales d'origine ectodermique qui sécrètent l'émail pendant la vie intra-utérine. Au pôle apical de la cellule se trouve une large expansion cytoplasmique appelée fibre de Tomes, qui renferme de nombreuses vésicules sécrétoires ainsi que des microtubules. Ces vésicules libèrent en surface leur contenu destiné à la synthèse de la matrice organique (protéines et glycoprotéines dont amélogénine et améline) (Tableau 1), qui a la particularité de ne pas contenir de fibres de collagène (53 , 54). Les améloblastes dégèrent lors de l'éruption dentaire, après quoi l'émail ne peut plus être remplacé (55).

1.3.3 Le ciment

1.3.3.1 Structure

Le ciment recouvre la dentine au niveau de la racine de la dent (Figure 4). Il permet l'ancrage du ligament parodontal de l'os alvéolaire à la racine dentaire et joue un rôle de protection de la pulpe dentaire. Au niveau supérieur, le ciment est mince et acellulaire tandis qu'il s'épaissit et renferme des lacunes et des cellules dans la région inférieure. La composition minérale du ciment est semblable à celle du tissu osseux. Sa teneur en cristaux d'apatite est de 45%. Toutefois, à l'inverse de l'os, le ciment est avasculaire (56).

1.3.3.2 Cellules du ciment

Le ciment possède trois types de cellules : les cémentoblastes, les cémentocytes et les odontoclastes. Les cémentoblastes, analogues aux ostéoblastes, sont de larges cellules cuboïdes (57, 58) qui élaborent, pendant toute la vie de la dent, la matrice organique (collagène de type I, glycoprotéines et protéoglycannes) du ciment qui se minéralisera selon le même processus que pour l'os. Lors de la minéralisation, des cellules se retrouvent enfermées dans des lacunes dans la matrice extracellulaire et deviennent des cémentocytes (analogues aux ostéocytes) (58). Ces cémentocytes possèdent également des prolongements cytoplasmiques dans des canalicules. Au moment de la chute des dents de lait, des odontoclastes (analogues aux ostéoclastes) résorbent le ciment et la dentine de la racine (59).

1.3.4 L'os alvéolaire

L'os alvéolaire, en continuité avec l'os cortical et l'os spongieux du maxillaire ou de la mandibule forment le procès alvéolaire, structure de soutien des dents (Figure 4). L'os alvéolaire est une mince couche de tissu osseux (100 à 200 μm) perforée de canaux de Volkman permettant des échanges entre la moelle osseuse et le ligament alvéolo-dentaire. L'os alvéolaire est composé d'une part de fibres de collagène intrinsèques synthétisées par des ostéoblastes, disposées parallèlement les unes aux autres et intercalées de cristaux d'hydroxyapatite. Il est d'autre part composé de fibres de Sharpey, qui sont synthétisées par le ligament alvéolo dentaire et qui permettent de relier le ciment à l'os alvéolaire.

1.4 Développement et différenciation squelettiques

1.4.1 Ostéogenèse et dentinogenèse

La formation du squelette débute par la convergence et la condensation de cellules mésenchymateuses au niveau de chacun de ses futurs éléments. Le squelette possède une triple origine (60). Les membres dérivent du mésoderme de la plaque latérale, le squelette axial (cage thoracique et colonne vertébrale) provient des somites tandis que le squelette

cranio-facial, dont la calvaria, est formé par des cellules originaires de la crête neurale céphalique.

Deux mécanismes gouvernent la formation de l'os : l'ossification membranaire et l'ossification endochondrale. Lors de ces deux mécanismes, l'os se développe par remplacement d'un tissu conjonctif préexistant par du tissu osseux.

L'ossification endochondrale intervient lors du développement embryonnaire, de la croissance et de la réparation osseuse. Ce processus assure la formation osseuse à partir d'un mésenchyme indifférencié qui va se condenser et former une ébauche cartilagineuse. Elle se produit dans la plaque de croissance épiphysaire des os longs des membres, ainsi qu'au niveau des vertèbres, des côtes et des os de la base du crâne. Au niveau de l'ébauche cartilagineuse, les chondrocytes présents se multiplient, s'hypertrophient et meurent par apoptose, laissant place à de grandes travées vides que vont venir coloniser des vaisseaux sanguins et des ostéoprogéniteurs. Ces derniers vont se différencier en ostéoblastes et former de la matrice osseuse (61). De part et d'autre de la zone d'hypertrophie, les chondrocytes s'aplatissent, prolifèrent et s'organisent en colonnes parallèles à l'axe de l'os, constituant le cartilage prolifératif qui assurera la croissance en longueur de l'os jusqu'à la puberté (60).

Lors de l'ossification membranaire, le tissu osseux se développe par différenciation des cellules mésenchymateuses embryonnaires. Ces dernières prolifèrent au niveau d'une zone très vascularisée du tissu conjonctif embryonnaire et vont se condenser et se différencier directement en préostéoblastes puis en ostéoblastes qui synthétiseront une matrice osseuse. En périphérie, des cellules mésenchymateuses continuent à se différencier. Des vaisseaux sanguins sont incorporés entre les travées osseuses et conduiront à la formation de la moelle osseuse hématopoïétique. Puis cet os fibreux sera remodelé et remplacé par un os mature lamellaire. Ce mécanisme intervient pour la mise en place des os plats, des os faciaux et de la calvaria. Les études menées au cours de cette thèse avaient pour modèle des cellules d'une lignée préostéoblastique, les MC3T3-E1, dérivée de calvaria de souris nouveaux-nés ou un modèle d'ostéoblastes primaires provenant également de calvaria de souris âgées de 1 à 3 jours.

La calvaria est composée d'un os frontal, deux os pariétaux et d'un os interpariétal. Lorsque la taille des os de la calvaria augmente leurs bords se rapprochent et forment une suture, qui est l'articulation entre les os du complexe crâniofacial chez les vertébrés, où se trouve du

mésenchyme ou du tissu fibreux. Lorsque la suture est établie après les premières années de vie chez l'homme, la formation ou la résorption osseuse peut alors se produire et contrôler la taille, la forme et l'orientation des parties de la voûte crânienne au cours du développement et de la croissance de l'individu.

Quant à la dentinogenèse, qui est un processus continu de déposition de matrice tout au long de la vie d'une dent, elle est initiée par les odontoblastes. Ces cellules sécrètent dans un premier temps de la matrice non minéralisée, la prédentine, similaire à la bordure ostéoïde de l'os. Ils sont ensuite responsables de la minéralisation de cette matrice qui donne la dentine.

1.4.2 Implication des facteurs de transcription

La différenciation des tissus implique l'action d'un large spectre de molécules de signalisation, d'hormones, de cytokines, de facteurs de croissance, de protéines matricielles, et de facteurs de transcription, ainsi que des interactions cellulaires. Ces facteurs vont agir de manière coordonnée afin de contrôler l'expression spatio-temporelle de gènes impliqués dans les propriétés fonctionnelles des ostéoblastes, des chondrocytes de la plaque de croissance et des odontoblastes. Les principaux facteurs de transcription seront décrits dans ce paragraphe, de manière non exhaustive, avec un intérêt particulier pour les facteurs de transcription de la famille AP-1 (Activated Protein-1) dont le membre Fos related Antigen-1 (Fra-1) a fait l'objet d'étude au cours de cette thèse. Par ailleurs, la voie des Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) est importante dans le développement squelettique et a fait l'objet d'une attention particulière au cours de cette thèse, de ce fait elle sera détaillée dans ce manuscrit.

1.4.2.1 Runx-2

Runx-2, également appelé Core binding factor alpha-1 (Cbfa-1), est le premier facteur de transcription à avoir été impliqué dans la différenciation ostéoblastique (9, 62, 63). Il est exprimé chez la souris dès le stade embryonnaire au niveau des cellules mésenchymateuses préchondrogéniques, puis dans les chondrocytes, les chondrocytes hypertrophiques et les cellules ostéoblastiques (8). La famille Runx est composée de trois gènes qui possèdent tous un domaine de liaison à l'ADN : le domaine runt. Des sites de liaison de Runx-2, les sites Osteoblast Specific Element-2 (OSE-2) ont été décrits sur les promoteurs de nombreux marqueurs ostéoblastiques, et notamment sur ceux du collagène de type I, de l'OPN, de la

sialoprotéine osseuse, et de l'OCN (64). La protéine Runx-2 agit avec un coactivateur appelé core binding factor b (Cbfb)/polyoma enhancer binding protein 2 b (Pebp2b) (65). Des souris invalidées pour Runx-2 ne présentent plus d'ossification endochondrale ou membranaire du fait d'une absence de différenciation ostéoblastique, ce qui indique que runx-2 joue un rôle essentiel dans la différenciation des cellules osseuses (9). De plus, des cellules de calvaria de souris runx-2^{-/-} se différencient spontanément en adipocytes et en chondrocytes, et ce même en présence de BMP-2, un puissant inducteur de l'ostéogenèse. Ces résultats montrent d'une part que runx-2 est un facteur essentiel de la différenciation ostéoblastique et d'autre part qu'il est une cible de la voie médiée par la BMP-2 (66). La surexpression ciblée de Runx-2 dans les ostéoblastes conduit de manière paradoxale à une ostéopénie avec des fractures chez les souris. Cela peut s'expliquer en partie par l'inhibition de la maturation de l'ostéoblaste vers le phénotype ostéocytaire, ce qui aurait pour conséquence une mauvaise organisation de l'os cortical (67). Chez l'homme, des mutations hétérozygotes de Runx-2 sont à l'origine d'une dysplasie cleidocranienne caractérisée entre autres par un retard de la fermeture des fontanelles du crâne (68).

En addition de son rôle dans la différenciation ostéoblastique, Runx-2 est également impliqué dans la différenciation des chondrocytes hypertrophiques. Ainsi, chez des souris invalidées pour runx-2, il a été montré que l'expression de marqueurs de chondrocytes hypertrophiques, ainsi que la minéralisation au niveau des zones d'hypertrophie étaient réduites (69). Inversement, chez des souris transgéniques surexprimant runx-2 spécifiquement au niveau de leurs chondrocytes hypertrophiques, la prolifération des chondrocytes est réduite tandis que leur différenciation vers le stade hypertrophique est accélérée. Elles présentent également une minéralisation de la matrice cartilagineuse. Une surexpression de Runx-2 entraîne donc une accélération de leur ossification endochondrale (70) et peut induire l'hypertrophie et la formation d'os dans du cartilage autre que le cartilage de croissance (33).

De plus, des études récentes ont montré que l'expression de Runx-2 par des cellules musculaires lisses de vaisseaux est corrélée à une transdifférenciation de ces cellules vers un phénotype ostéoblastique et à une calcification vasculaire (71, 72).

Par ailleurs, Runx-2 inhibe la différenciation terminale des odontoblastes, c'est pourquoi son expression est réduite pendant la dentinogenèse. En effet, des études menées sur des souris transgéniques surexprimant Runx-2 sous le contrôle du promoteur du collagène de type I ont montré que l'expression du collagène de type I et de la DSPP était fortement inhibée dans les odontoblastes. En revanche, l'expression de la DMP-1, de l'OPN et de l'OCN est augmentée dans les odontoblastes de ces souris transgéniques. Ces résultats indiquent que Runx-2 inhibe

la différenciation terminale des odontoblastes et induit une transdifférenciation des odontoblastes vers un phénotype ostéoblastique (73).

1.4.2.2 Osterix

Osterix est un facteur de transcription spécifique des ostéoblastes qui possède trois domaines en doigt de zinc (10). L'invalidation de ce gène est létale à la naissance (10). Les souris *Osterix*^{-/-} présentent une absence d'ostéoblastes et de toute forme d'ossification (membranaire ou endochondrale), ce qui démontre que ce facteur est indispensable à la différenciation ostéoblastique. Ainsi, aucune détection de l'expression de collagène de type I, ou d'autres marqueurs ostéoblastiques tels que l'OPN ou l'OCN n'est signalée dans les cellules mésenchymateuses précurseurs des ostéoblastes. Des études ont montré que Runx-2 est exprimé chez les souris n'exprimant pas Osterix, alors que l'inverse n'est pas vrai, ce qui signifie que Runx-2 se situerait en aval de Osterix (10).

En ce qui concerne les odontoblastes, l'expression de Runx-2 diminue tandis que Osterix est fortement exprimé. Par ailleurs, une surexpression d'Osterix au sein d'odontoblastes murins augmente la transcription de la *Dspp*, ce qui suggère qu'Osterix est nécessaire au développement de la dent (74).

1.4.2.3 Tcf/Lef - NFAT

T-Cell-Factor/Lymphocyte Enhancer-binding Factor (Tcf/Lef) et nuclear factor of activated T-cells (NFAT) sont les facteurs de transcriptions activés par la voie de signalisation Wingless related (Wnt). Cette voie Wnt/LRP-5 (low-density lipoprotein receptor-related protein) joue un rôle dans la formation et la croissance osseuse. Cette voie repose sur la liaison de Wnt, dont dix-neuf membres ont été identifiés, à ses corécepteurs LRP-5 ou LRP-6 et frizzled (Fz), ce qui conduit au recrutement et à la modification post traductionnelle de disheveled (Dlv). Selon la nature de Fz et de Dlv, trois voies peuvent être activées : la voie canonique, et deux voies non canoniques. Seules les voies canonique Wnt/ β -catenin et non canonique Wnt/calcium seront décrites car elles ont été montrées jouer, entre autres, un rôle dans le développement osseux précoce en favorisant l'initiation d'une cascade d'expression génique impliquée dans la différenciation squelettique (75).

Ainsi, Wnt-10 par exemple, lors de sa liaison à son récepteur, va d'une part inhiber des facteurs de transcription adipogéniques peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) et CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP α) et inhiber la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules adipocytaires et fibroblastiques. Et d'autre part, il va permettre l'induction de facteurs de transcription ostéogéniques Distal-less homeobox-5 (Dlx-5), Osterix et Runx-2, et ainsi permettre aux cellules souches mésenchymateuses de se diriger vers un phénotype ostéogénique (76). Cette voie Wnt/ β -catenin canonique repose sur la stabilisation de la β -caténine, une protéine cytosolique. En effet, en l'absence de fixation des protéines Wnt à leur récepteur, la β -caténine est phosphorylée par la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) et est dégradée par le protéasome. La liaison de Wnt à ses récepteurs conduit à l'inhibition de l'activité de la GSK-3 β et donc à une accumulation de la β -caténine dans le cytosol qui mène à sa translocation vers le noyau où elle va réguler, en s'associant aux facteurs de transcription de la famille Tcf/Lef, les gènes cibles de la voie Wnt canonique (Figure 5) (75, 77). L'importance de cette voie dans le développement osseux a été mise en évidence grâce à des mutations perte et gain de fonction. Ainsi, une mutation perte-de-fonction de LRP-5 conduit à une pathologie caractérisée au niveau osseux par une réduction du volume trabéculaire, des déformations squelettiques et des fractures (78). Inversement, une mutation gain-de-fonction de la LRP-5 cause une augmentation de la masse osseuse et de l'épaisseur corticale chez l'homme (79). De plus, la délétion de la sclérostine, un antagoniste de Wnt principalement sécrété par les ostéocytes, conduit à un phénotype ostéopétrotique (80).

Récemment, un rôle de la voie Wnt non canonique a été mis en évidence à différents stades du métabolisme cellulaire osseux. Ainsi cette voie favoriserait une différenciation vers un phénotype ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses en inhibant PPAR γ et en induisant l'expression de Runx-2 (81). Cette voie implique l'activation d'une phospholipase-C (PLC) après liaison de Wnt-5a à son récepteur. La PLC va hydrolyser du phosphoinositol diphosphate (PIP $_2$) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP $_3$). L'IP $_3$ conduit à une augmentation du calcium intracellulaire qui va activer la calcineurine. Finalement la calcineurine va activer un facteur de transcription NFAT, ce qui permet la régulation de l'expression des gènes. L'augmentation de calcium intracellulaire peut également activer la phosphokinase C δ (PKC δ) qui va avoir un effet anti-apoptotique sur les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes, via une voie médiée par l'extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) et en agissant en synergie avec la voie canonique (82).

La voie Wnt joue également un rôle important dans la formation dentaire, ainsi que dans la prolifération et la différenciation des odontoblastes et des cémentoblastes. Une inactivation tissu spécifique de la β -caténine dans la dent conduit à un arrêt de la croissance dentaire (83)

1.4.2.4 AP-1

a) Généralités

Les facteurs de transcription de la famille AP-1 sont des dimères composés de membres de la famille fos (c-fos, FosB, Fra-1, Fra-2) et jun (JunB, JunD, c-Jun) (84). Lors de leur activation, les protéines de la famille fos peuvent seulement s'hétérodimériser avec un membre de celle de jun, tandis que les protéines jun peuvent s'homo ou s'hétérodimériser avec un membre de la famille fos. Les facteurs de transcription de la famille AP-1 peuvent réguler l'expression de nombreux gènes qui possèdent des sites de liaison AP-1 au sein de leurs promoteurs. Ces facteurs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires incluant la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose. Les facteurs de transcription AP-1 peuvent être régulés à différents niveaux, que ce soit au niveau transcriptionnel, de la stabilité de l'ARNm ou de la protéine ou bien par l'interaction avec d'autres facteurs de transcription (85). De plus, l'activité des facteurs AP-1 peut également être modulée par des modifications post traductionnelles induites par des MAPK (phosphorylation) (86 , 87) ou par dégradation par les protéasomes (88).

Nous nous focaliserons dans ce manuscrit sur le rôle des facteurs de transcription AP-1, notamment c-fos et fra-1, dans la formation osseuse.

En ce qui concerne le rôle des facteurs AP-1 dans le développement dentaire, peu de données sont disponibles actuellement.

b) Rôle des facteurs AP-1 dans la différenciation ostéoblastique

L'expression des différents membres AP-1 varie au cours de la maturation ostéoblastique *in vitro*. Ainsi, au stade prolifératif, tous les membres AP-1 sont fortement exprimés puis au cours de la différenciation et de la minéralisation ostéoblastiques, l'expression de Fos related antigen-2 (Fra-2) et JunD devient prédominante (89). Par ailleurs, certains régulateurs de la

prolifération et de la différenciation ostéoblastique, tels que le TGF- β , l'hormone parathyroïdienne ou la vitamine D, stimulent l'activité des facteurs de transcription AP-1 (90). La surexpression de Fra-1 ou de FosB chez des souris conduit à une ostéosclérose. Cette augmentation de la formation osseuse résulte d'une augmentation du nombre d'ostéoblastes et d'une inhibition de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses vers la lignée adipocytaire (91, 92). Par ailleurs, les ostéoblastes provenant de ces souris transgéniques voient leur expression en OCN et en collagène de type I augmenter (91). De plus, des études menées sur des cellules de souris déficientes pour Fra-1 ($\text{fra-1}^{\Delta/\Delta}$) montrent une expression réduite de protéines telles que l'OCN, la MGP et le collagène dans l'os et le cartilage bien que le nombre d'ostéoblastes et d'ostéoclastes demeure inchangé. Par ailleurs, ces souris sont ostéopéniques (93). En ce qui concerne les protéines Jun, il a été montré que des souris déficientes en JunB ($\text{junB}^{\Delta/\Delta}$) sont ostéopéniques. Les ostéoblastes provenant de ces souris présentent une réduction de leur prolifération et de leur différenciation (94). Ces données soulignent donc l'importance des facteurs AP-1 dans la régulation des marqueurs des cellules ostéoblastiques et donc dans la différenciation de ces dernières.

c) Rôle des facteurs AP-1 dans la différenciation ostéoclastique

Les souris invalidées pour *c-fos* sont viables mais elles ne possèdent pas d'ostéoclastes, ce qui explique le phénotype ostéopétrotique qui peut être observé (95). De manière intéressante, une surexpression de Fra-1, qui est une cible de *c-fos*, chez ces souris invalidées pour *c-fos* peut rétablir partiellement un phénotype normal (96). De plus, des études menées *in vitro* sur des lignées et des cellules primaires de progéniteurs ostéoclastiques surexprimants Fra-1 montrent que la différenciation ostéoclastique est augmentée. Cependant, cet effet sur la différenciation ostéoclastique n'est pas observé *in vivo* chez des souris transgéniques surexprimant Fra-1 (91). En ce qui concerne les protéine Jun, la létalité à un stade embryonnaire précoce des souris invalidées pour ces facteurs de transcription a longtemps été un frein dans l'étude de la fonction de Jun dans l'os. Cependant, des avancées récentes ont permis la mise au point de souris déficientes pour *c-jun*, JunB ou JunD au niveau de leur monocyte. Les monocytes des souris déficientes pour *c-jun* et JunB se différencient moins en ostéoclastes tandis que l'absence de JunD n'affecte pas la différenciation ostéoclastique *in vitro* (97, Kenner, 2004 #591). Ces données suggèrent donc que JunB et JunD se dimériseraient avec *c-fos* et interviendraient dans la différenciation ostéoclastique.

d) Rôle des facteurs AP-1 dans la différenciation chondrocytaire

Il semblerait que c-fos soit un membre AP-1 clef de l'ossification endochondrale. En effet, des souris transgéniques surexprimant c-fos présentent un développement osseux anormal (98). Par ailleurs, des souris chimériques obtenues à partir de cellules souches embryonnaires surexprimant c-fos développent des tumeurs chondrogéniques (99). Cependant, il existe également des données montrant que la surexpression de c-fos dans un modèle de chondrogenèse *in vitro* inhibe la différenciation des chondrocytes (100). De plus, des souris déficientes pour Fra-2 présentent une zone réduite de chondrocytes hypertrophiques, ainsi qu'une réduction de la différenciation des chondrocytes et de la production de matrice extracellulaire (94). Un autre membre de la famille AP-1, JunB, semble jouer un rôle important dans la différenciation chondrocytaire. En effet, des souris présentant des délétions spécifiques de JunB au niveau des chondrocytes sont sujettes à des malformations de la colonne vertébrale et développent une scoliose sévère (101).

1.4.2.5 Dlx-5

Dlx-5 est exprimée dans les ostéoblastes du squelette entier, cependant les souris Dlx-5^{-/-} ne présentent des défauts de développement osseux qu'au niveau des os crâniofaciaux (102). Dlx-5 est coexprimée avec la BMP-4 et la BMP-7 lors du développement crânien chez l'embryon de poulet (103). De plus, des études *in vitro* ont montré que l'expression et l'activité du promoteur de Runx-2 seraient régulées par la Dlx-5 (104). Une étude montre également que la BMP-2 active l'expression de la TNAP via Dlx-5 (105). Néanmoins cette voie est indépendante de Runx-2, qui est pourtant la cible de la Dlx-5 et voit son expression augmenter en réponse à la BMP-2. Les mécanismes de cette régulation ne sont cependant pas connus à ce jour (105). Peu de données sont disponibles concernant le rôle de la Dlx-5 dans le développement de la dent mais il a été montré qu'elle agirait en aval de la voie Msx-1 (106).

1.4.2.6 Msx-1 et Msx-2

Msx-1 et Msx-2 (Muscle segment homeobox gene) sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines à homéodomaine. Ils sont exprimés dans les cellules de la crête neurale lors de la mise en place des tissus osseux et dentaire. Des souris invalidées

pour Msx-1 présentent un retard de formation au niveau de l'os frontal. Il en va de même des souris invalidées pour Msx-2 (107). Cela suggère que ces facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation des cellules ostéoblastiques du crâne. De plus, des souris doublement invalidées pour Msx-1 et Msx-2 présentent une inhibition de la formation osseuse au niveau du crâne (107). Ces résultats indiquent que ces deux facteurs de transcription auraient une fonction redondante dans la formation des os crâniens. Par ailleurs ces souris n'expriment pas Runx-2, donc Msx-1 et Msx-2 régularaient l'ostéogenèse en contrôlant l'expression de Runx-2 (108). Cependant, la fonction de Msx-2 est encore controversée. En effet, il a été montré que Msx-2 inhiberait la différenciation des ostéoprogéniteurs (109) tandis que d'autres études ont montré un effet stimulant de Msx-2 sur la différenciation et/ou la prolifération des ostéoblastes (110, 111). De plus, Msx-1 joue un rôle dans la formation des dents. Ainsi des mutations de ce gène chez l'homme conduit à une agénésie dentaire (112). De plus, de manière similaire à ce qui se passe au niveau de l'os, il a été montré que Msx-1 régule l'expression de Runx-2. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de Msx-1 dans les odontoblastes est régulée par de l'ARN Msx-1 antisens endogène, le ratio entre l'ARN sens et antisens de Msx-1 serait ainsi un facteur clef de la régulation de la différenciation des cellules (113).

1.5 Implication des MAPK dans la différenciation squelettique

De nombreuses études ont montré que les voies de signalisation impliquant les MAPK sont essentielles à la différenciation des cellules ostéoblastiques et chondrocytaires et ont fait l'objet d'études au cours de cette thèse, c'est pourquoi un paragraphe leur est consacré dans ce manuscrit.

1.5.1 Généralités

La voie des MAPK est une cible importante de nombreux récepteurs de facteurs de croissance et est impliquée dans la médiation de différentes réponses cellulaires à partir de signaux extracellulaires de prolifération, de différenciation ou de stress. La liaison des facteurs de croissance tels que l'Epidermal Growth Factor (EGF) ou le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) à leurs récepteurs membranaires EGF Receptor (EGFR) ou le PDGF Receptor (PDGFR) entraîne leur dimérisation et leur autophosphorylation sur leurs résidus tyrosines, ce

qui va permettre la formation de sites de liaisons sur lesquels vont pouvoir se fixer de nombreuses protéines telles que des protéines adaptatrices, des enzymes, des protéines kinases, des phospholipases et des régulateurs des protéines G. Les protéines adaptatrices vont relier les récepteurs membranaires à différentes voies incluant la voie ERK-MAPK (Figure 6) (114, 115, 116). L'activation des MAPK est souvent associée à leur translocation dans le noyau et conduit à l'activation de facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription régulent l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration ou la survie cellulaire. La régulation des MAPK se fait essentiellement via la déphosphorylation par des phosphatases telles que la Protéine Phosphatase 2A (PP2A) ou les MAPK Phosphatases (MKP) dont plusieurs membres ont été identifiés (MKP-1 à 7), chacun possédant une spécificité vis-à-vis des différentes MAPK (117).

Les voies MAPK se répartissent en trois familles majeures en fonction de leur séquence, de leurs substrats et de leurs fonctions. Ainsi, il existe la voie ERK, la voie c-jun-N-terminal kinase (JNK) et la voie p38. Ces voies sont organisées en module de trois kinases, les MAP3K (ou MEKK), les MAP2K (ou MEK) et les MAPK, qui se phosphorylent en cascade. Les protéines kinases dans cette cascade sont de deux types : soit des kinases à sérine/thréonine, soit des kinases à tyrosines. Chaque kinase est activée par double phosphorylation (118).

La voie ERK est activée par différents facteurs de croissance et cytokines, ainsi que par des infections virales ou des agents oncogènes (pour revue, voir (119)). La famille ERK est composée de deux protéines principales que sont ERK1 et ERK2, et des protéines ERK3, ERK5, ERK7, ERK8 dont les rôles sont moins connus. Ces protéines sont exprimées de manière ubiquitaire. Les MAP2K impliquées dans la phosphorylation de ERK1/2 sont les MEK-1 et les MEK-2. Les activateurs des MEK sont nombreux et appartiennent à plusieurs familles dont la plus importante est la famille Raf (117, 120).

La voie JNK est activée par divers stress cellulaires, le sérum ou des facteurs de croissance. Trois gènes ont été identifiés, JNK 1 et 2, exprimés de manière ubiquitaire, et JNK 3, exprimé principalement dans le cerveau. Les membres de la famille MEK impliqués dans la phosphorylation des JNK sont les MKK4, qui activent également la voie p38 et MKK7, spécifique des JNK. Ces MKK sont elles-mêmes activées par de nombreuses kinases MEKK telles que MLK3 ou Transforming Growth Factor beta Activated kinase (TAK) (117, 121).

Quatre membres ont été identifiés pour la famille p38 : p38 α , β , γ et δ . Cette famille est stimulée par des cytokines, des hormones ou par des chocs osmotiques. MKK3 et 6 activent les p38 de manière spécifique. MKK4 est également impliquée dans l'activation de cette voie. Les MEKK impliquées dans cette voie sont MEKK5 et 7, ainsi que la TAK1 et l'Apoptosis Signal-Regulating Kinase (ASK1) (122).

1.5.2 Régulation de la différenciation des chondrocytes par les MAPK

Des données contradictoires existent quant à l'effet de l'activation de ERK dans la différenciation tardive des chondrocytes vers un phénotype hypertrophique. Une revue détaille les résultats de différentes études (123). Il a été montré chez des souris transgéniques qui présentent une restriction de l'activité de la MEK dans les tissus cartilagineux (ca-MEK) que la croissance endochondrale était bloquée à cause d'une inhibition de la maturation des chondrocytes vers un phénotype hypertrophique à un stade pré et postnatal. En effet, les chondrocytes de ces souris transgéniques présentent une réduction de l'expression des marqueurs hypertrophiques comme le collagène de type X ou l'OPN, tandis que l'expression de Sox-9, un marqueur préhypertrophique, est prolongée dans le temps. Cependant aucun effet n'est observé sur la prolifération des chondrocytes de la plaque de croissance (124). Inversement, une étude plus récente *ex-vivo* a montré dans une culture d'explants de métatarses d'embryons de 15,5 jours qu'un traitement avec l'U0126, un inhibiteur des MEK, inhibait l'expression de deux marqueurs du phénotype hypertrophique, le collagène de type X et l'OPN mais n'affectait pas la prolifération chondrocytaire. Ces résultats suggèrent donc que la voie ERK régulerait uniquement la différenciation terminale des cellules chondrocytaires (125). Les modèles utilisés dans ces études sont différents mais n'expliquent néanmoins pas complètement ces résultats contradictoires.

Il a été montré que la voie p38 était impliquée dans la maturation chondrocytaire, l'hypertrophie et l'ossification endochondrale, cependant, il existe également des données contradictoires quant au rôle positif ou négatif que jouerait p38 dans ces processus. Ainsi dans les chondrocytes de souris transgéniques surexprimant p38 de manière spécifique dans leur cartilage (souris ca-MKK6), l'expression des marqueurs hypertrophiques (collagène X et OPN) est diminuée tandis que l'expression de Sox-9 est augmentée. Par ailleurs, ces souris présentent un retard d'ossification endochondrale (126, 127). En revanche, dans des cultures primaires de chondrocytes hypertrophiques à un stade précoce d'embryon de poulet, un traitement par un inhibiteur de p38 entraîne une inhibition de l'expression des marqueurs de

l'hypertrophie. Des études complémentaires seront nécessaires afin d'expliquer ces résultats contradictoires (128).

Comparé à p38 et ERK, peu de données sont disponibles concernant la voie de signalisation JNK.

Finalement, ces données suggèrent que les voies p38 et ERK jouent un rôle important à différents stades de la différenciation chondrocytaire. Cependant, les résultats sont encore contradictoires et nécessitent d'être approfondis.

1.5.3 Régulation de la différenciation des ostéoblastes par les MAPK

Malgré de nombreuses investigations menées *in vitro*, le rôle des MAPK dans la différenciation ostéoblastique n'est pas complètement mis à jour. Ainsi, certaines études montrent que la voie des MAPK stimulerait la différenciation ostéoblastique, tandis que d'autres soutiennent l'inverse. Une revue a répertorié les différents résultats de ces études et explique la contradiction de ces résultats du fait d'une grande disparité des conditions expérimentales mises en œuvre au cours de ces études, aussi bien au niveau des lignées ostéoblastiques utilisées que de leur stade de différenciation (129). Afin d'éclaircir ces résultats conflictuels, une nouvelle approche a été envisagée, qui a consisté à développer des souris transgéniques exprimant dans leurs ostéoblastes des formes constitutivement actives (MEK-SP) ou des dominants négatifs (MEK-DN) de MEK1. Les résultats de cette étude ont montré que l'activation de la voie ERK stimulait la différenciation ostéoblastique et le développement squelettique via une voie impliquant Runx-2 (130). En effet, l'activation de ERK dans les ostéoblastes des souris exprimant MEK-SP stimulait leur différenciation, contrairement aux observations faites dans les ostéoblastes des souris exprimant MEK-DN. D'autre part *in vitro*, les souris exprimant MEK-SP présentent une augmentation de la minéralisation de la calvaria et une augmentation de la taille de leur squelette, à l'inverse des souris exprimant MEK-DN dans leurs ostéoblastes, ce qui démontre l'implication de la voie ERK dans l'ossification membranaire et endochondrale. Par ailleurs, la même équipe a montré récemment *in vitro* et *in vivo* que ERK1 agissait en phosphorylant Runx-2 au niveau de deux sites spécifiques (131).

La voie p38 joue également un rôle dans la différenciation des cellules ostéoblastiques. Ainsi l'inhibition de la voie p38 ou l'expression par des cellules ostéoblastiques d'un dominant négatif de p38 conduit à une réduction des marqueurs ostéoblastiques telles que l'expression de la TNAP et une réduction de la minéralisation dans la lignée MC3T3-E1 et dans des

cultures d'ostéoblastes primaires (132). Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence l'implication de p38 dans la différenciation des ostéoblastes via une augmentation de l'expression de la TNAP en réponse au sérum (133). Cette voie intervient également dans la régulation de la différenciation de cellules ostéoblastiques en stimulant l'activité de la TNAP en réponse à la BMP-2 ou à la PTH.

La voie JNK participerait également au processus de différenciation des cellules ostéoblastiques mais jouerait un rôle différent. Ainsi la voie JNK est également activée par la BMP-2 mais stimulerait l'expression de l'OCN tandis que la voie p38 également activée par la BMP-2 l'inhibe. Ceci peut s'expliquer par une activation de ces voies à des stades différents de la différenciation des cellules ostéoblastiques (134). Enfin, JNK1/2 semble jouer un rôle dans la régulation du transport de Pi et de la minéralisation stimulée par la BMP-2 dans les MC3T3-E1 (135).

Globalement, ces données ont tendance à mettre en évidence un rôle positif des MAPK dans la différenciation ostéoblastique, bien que ces résultats restent à être confirmés.

II. PROCESSUS DE MINERALISATION

2.1 Minéralisation

Les ions calcium et phosphate, présents en grande concentration dans le tissu osseux, précipitent sous forme de sels d'apatite au cours de la minéralisation du tissu osseux. La minéralisation du tissu osseux se déroule en deux étapes. Lors de la première phase, l'ostéoblaste synthétise environ 2 μm d'épaisseur de matrice ostéoïde par jour. Cette matrice s'accumule couche après couche pour finalement former une bordure de 10 à 15 μm (24). Les fibres de collagène de type I formant cette matrice sont orientées en fonction des forces de tension qu'exerce la cellule sur la matrice et des contraintes mécaniques. La seconde étape consiste en la précipitation des ions calcium et phosphate en cristaux d'hydroxyapatite. Ces cristaux se fixent ensuite entre et sur les fibres de collagène, remplaçant les molécules d'eau et assurant ainsi la minéralisation de la bordure ostéoïde (136). L'orientation, la taille et le site de formation de ces cristaux dépendent des composants de la matrice extracellulaire. La configuration tridimensionnelle de ces analogues de l'hydroxyapatite confère une grande surface d'échange entre le cristal et le liquide interstitiel (137). Le mécanisme est similaire pour la dent. Ainsi, l'odontoblaste synthétise une matrice appelée pré dentine, composée de fibres de collagène de type I, qui va se minéraliser suite à la précipitation des ions phosphate et calcium. La transition entre la pré dentine et la dentine est appelée front de minéralisation et se fait de manière relativement abrupte. La présence permanente d'une couche de pré dentine de 10 à 40 μm de large entre les odontoblastes et la dentine minéralisée atteste de l'activité continue de ces cellules (51).

Cette phase minérale possède deux fonctions majeures. D'une part, elle joue un rôle de réservoir ionique majeur pour le corps. En effet, 99% du calcium et 85% du phosphore (ainsi que respectivement 90% et 50% du sodium et du magnésium) corporels sont associés avec les cristaux. D'autre part, cette phase minérale confère leurs propriétés mécaniques aux tissus osseux et dentaire.

2.1.1 Cristaux

Les minéraux trouvés dans le tissu osseux et les dents sont majoritairement des cristaux d'hydroxyapatite de formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Cependant, ces cristaux peuvent présenter des substitutions de leurs groupements OH^- , qui peuvent être remplacés par du fluor ou du carbonate (138, 139). Ces cristaux servent de réservoir d'ions calcium, phosphate et magnésium. Les ions PO_4^{3-} et calcium situés en surface des cristaux participent à des échanges rapides avec les fluides biologiques (140).

Différentes formes ont été décrites pour ces cristaux, ainsi il a pu être observé des cristaux en forme d'aiguilles, de bâtonnets (141) ou de plaques (142, 143). Ces cristaux sont orientés selon leur grand axe de manière parallèle à l'axe des fibres de collagène de type I dans l'os, le cément et la dentine, excepté pour l'émail, qui possède quant à lui moins de 1% de matrice et est dépourvu de fibres de collagène (52). En outre, ces cristaux mesurent entre 200 Å et 400 Å, avec une largeur et une épaisseur d'environ 100 Å et 25 Å respectivement (144). Cependant, il semblerait que leur dimension varie selon les tissus (145). Ainsi, les cristaux présents dans l'émail sont plus larges que ceux des autres tissus (146). Une étude a montré que la variation de taille et de forme des cristaux dépendaient du pH et de la saturation en ions des liquides extracellulaires (147).

Par ailleurs, la question de la formation de précipités de phosphate de calcium amorphes précédant la formation des cristaux d'hydroxyapatite se pose toujours. Des études menées sur des liposomes synthétiques, et simulant *in vitro* la minéralisation médiée par les vésicules matricielles (VM) qui sera détaillée plus loin, ont montré que ces liposomes formaient des phosphates de calcium amorphes, du dicalcium phosphate dihydrate ou des octacalciums de phosphate (148, 149); ces trois composés étant des précurseurs de l'hydroxyapatite (150). Plusieurs études ont rapporté la présence de ces précurseurs en tant qu'intermédiaires à la formation des cristaux d'hydroxyapatite dans la dentine humaine (151), et la calvaria de souris (152). Cependant cette hypothèse reste largement controversée, certaines équipes soutenant que les cristaux d'hydroxyapatite se forment directement sans passer par des stades précurseurs (153, 154).

2.1.2 Fibres de collagène

La principale molécule de la matrice extracellulaire des tissus squelettiques est le collagène. Le collagène de type I représente près de 90% des protéines totales de l'os et de la dentine et sert de support à la déposition des cristaux. Il serait exprimé de manière transitoire dans le cartilage de la plaque de croissance par les chondrocytes. Les principaux collagènes qui constituent ce dernier tissu sont les collagènes de type II, IX et XI dans les premiers stades de différenciation puis le collagène de type X lors de l'apparition du phénotype hypertrophique. Le collagène est une protéine homo ou hétérotrimérique à structure en triple hélice composée de trois chaînes α spécifiques selon le type de collagène (155).

Le collagène de type I détermine l'organisation spatiale de l'os. Le collagène joue également un rôle dans la stabilité structurelle de l'os et le ratio minéral sur collagène dans l'os définit la résistance osseuse. Ainsi des anomalies touchant le collagène de type I conduisent à une pathologie, l'ostéogenèse imparfaite, dans laquelle les os, ayant perdu la plus grande partie de leur résistance, se fracturent aisément. Les patients peuvent également présenter, entre autres symptômes, des anomalies dans le développement des dents (156).

En ce qui concerne le cartilage, le collagène de type II est l'un des constituants protéiques les plus abondants des matrices cartilagineuses. Une surexpression du collagène de type II chez la souris entraîne une désorganisation du tissu et un développement squelettique sévèrement compromis (157). La chondrocalcine, correspondant à l'extrémité C-terminale du procollagène de type II est l'une des protéines possédant le plus d'affinité pour l'hydroxyapatite, ce qui suggère un rôle de cette protéine dans les processus de minéralisation (158). La synthèse du collagène de type II diminue lors du passage vers un phénotype hypertrophique. La maturation chondrocytaire s'accompagne de plus d'une dégradation du collagène de type II et de la synthèse de collagène de type X (159). L'expression localisée de ce collagène dans la zone d'hypertrophie suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans la minéralisation du tissu. Ainsi, des études ont montré que l'absence d'un réseau de collagène de type X fonctionnel résulte en une distribution anormale des protéoglycannes dans la matrice extracellulaire, ainsi qu'à une déposition anormale du minéral. De plus, des souris invalidées pour ce collagène présentent des chondrodysplasies métaphysaires (160, 161, 162).

2.1.3 Nucléation et croissance cristalline

Deux mécanismes différents sont proposés pour expliquer le mode de déposition des cristaux d'hydroxyapatite sur le collagène. Le premier mécanisme soutient l'idée que les protéines non collagéniques de la matrice aideraient à la déposition de l'hydroxyapatite dans la matrice extracellulaire (163). L'autre mécanisme suggère que des vésicules matricielles (VM), concentrées en ions phosphate et calcium, s'attacheraient aux fibres de collagène et que cela initierait la déposition de l'hydroxyapatite (164). Certaines études considèrent que les deux mécanismes pourraient intervenir (165) (Figure 7).

Dans le cartilage de la plaque de croissance, l'os et la dent, des VM ont été décrites (Figure 8). Ces VM sont produites par l'ostéoblaste (166), le chondrocyte hypertrophique (167) ou l'odontoblaste (168). Ces vésicules possèdent une taille comprise entre 30 et 300 nm de diamètre et sont localisées dans la matrice extracellulaire. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer leur formation. Ainsi, Anderson et al. suggèrent que ces vésicules se forment dans la cellule et bourgeonnent suite à une série de processus intracellulaires (164) ou qu'elles sont sécrétées en petites sous-unités qui s'assembleraient à l'extérieur de la cellule (169). D'autres pensent qu'elles proviendraient de structures préexistantes dans la cellule (170) ou qu'elles résulteraient d'une apoptose cellulaire (171). Il semblerait que ces vésicules, visibles en microscopie, soient en fait un mélange entre les VM, relarguées par des cellules viables, et les corps apoptotiques (CA), provenant de membranes de cellules en apoptose (172, 173, 174, 175, 176).

Les processus intracellulaires nécessaires à la formation et au relargage des VM ne sont pas complètement élucidés (177). Il semblerait que le bourgeonnement des VM soit polarisé. Ainsi, les chondrocytes hypertrophiques, les ostéoblastes et les odontoblastes libèreraient leurs VM au niveau de leur membrane adjacente, respectivement, aux septa longitudinaux (167), à la bordure ostéoïde (178) et à la prédentine (179).

Ces vésicules sont riches en ions calcium et phosphate (Figure 8). En effet, d'une part, ces VM expriment à leur surface des Annexines (Anx) : l'Anx II et V entre autres. Ces Anx possèdent un rôle de canal calcique permettant aux vésicules de concentrer le calcium en leur sein (177). De plus, les membranes des VM du tissu cartilagineux sont riches en phosphatidylsérine, qui favorise l'entrée du calcium dans les vésicules (180). D'autre part, la concentration intravésiculaire du Pi est augmentée grâce à l'activité enzymatique de

phosphohydrolases telles que la TNAP (181) permettant la dégradation des inhibiteurs de la minéralisation tels que l'adénosine triphosphate (ATP), le pyrophosphate inorganique (PPi) ou les protéoglycannes (182, 183). Parallèlement, l'entrée de Pi dans les VM des chondrocytes ou des ostéoblastes est également facilitée par la présence de transporteurs de phosphate sodium dépendant à leur surface (184, 185), qui ont été identifiés comme étant des membres de la famille des transporteurs des Na^+ -Pi de type III, PiT-1 et PiT-2 (186). Cependant, une autre étude suggère que le transport de phosphate intravésiculaire pourrait être également dû à des transporteurs distincts des Na^+ -Pi (187). Des études complémentaires sont nécessaires afin de définir clairement la part de chacun de ces transporteurs dans l'import de phosphate intravésiculaire.

Les concentrations élevées en phosphate et calcium dans ces VM conduisent à leur précipitation sous forme de cristaux et c'est pourquoi il a été suggéré que ces VM seraient des sites de nucléation (188). Cependant, l'isolation de VM par différentes études n'a pu mettre en évidence des cristaux d'apatite, et le fait que les VM soient le site de nucléation des cristaux d'apatite a fait l'objet de controverses (189). Il a été montré par microscopie électronique que les premiers cristaux se formeraient au niveau de la membrane interne des vésicules (190), riche en phosphatidylsérines (191). Ces phosphatidylsérines présentent une forte affinité pour les ions calcium et pourraient par conséquent agir en tant que nucléateurs (192).

L'augmentation de la taille de ces cristaux va entraîner une perforation des membranes des VM. Ce mécanisme est amplifié par l'action de phospholipases et de protéases présentes dans les VM (177). Des MMP (-2, -9 et -13) ont également été identifiées à la surface de ces VM et joueraient un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire avant la déposition des cristaux (193, 194).

Des études ont montré que ces VM se liaient avec une forte affinité aux collagènes de type I, II et X (195). Les noyaux d'hydroxyapatite sont ensuite localisés dans les lacunes des microfibrilles de collagène. Puis le cristal grossit (croissance cristalline) et comble l'espace disponible. L'augmentation de la taille du cristal est due d'une part à l'addition d'ions à ces cristaux et d'autre part à l'agrégation des cristaux (nucléation secondaire). Enfin la calcification s'étend à l'espace interfibrillaire, cette dernière phase étant la plus longue. L'interface entre matrice organique collagénique et matrice minérale est assurée par les protéines non collagéniques, qui seront décrites dans la suite de ce manuscrit et qui favorisent l'amorce du processus de nucléation.

Comme précisé précédemment, ces vésicules peuvent également être des corps apoptotiques (CA) provenant de membranes de cellules en apoptose, et pouvant conduire à une calcification ectopique (172 , 173 , 174 , 175 , 176). Ainsi, dans la plaque de croissance, les chondrocytes en phase terminale de différenciation meurent par apoptose (35). L'apoptose est caractérisée par une fragmentation de l'ADN, des altérations au niveau de la morphologie du noyau et une réorganisation des organelles de la cellule. Plus tard dans ce processus, les membranes cellulaires sont fragmentées. Ces fragments de membrane peuvent former des vésicules qui seront à l'origine des CA (196). La majorité des ostéoblastes meurent également par apoptose, et il a été suggéré que l'apoptose de certains ostéoblastes pouvait contribuer à la minéralisation de la matrice extracellulaire. Ces phénomènes apoptotiques se retrouvent au niveau de zones qui minéralisent physiologiquement ou pathologiquement et peuvent jouer un rôle important dans la calcification (197 , 198). Par ailleurs, des études ont montré que des CA isolés à partir de cultures de chondrocytes ou de cellules musculaires lisses de vaisseaux (VSMC) étaient capables de minéraliser *in vitro* (172, 199). En revanche, il semblerait que l'apoptose tardive des odontoblastes ne contribuent pas à la minéralisation d'autant plus que certaines études supposent que les odontoblastes ne font pas intervenir de VM dans les processus de minéralisation de la dentine (200 , 201).

Les CA présentent de grandes différences avec les VM décrites précédemment. Bien que de forme similaire, les CA sont plus petits que les VM et ils ne contiennent pas d'Anx ou de TNAP (202). Par ailleurs, les membranes de ces CA sont caractérisées par une extériorisation de leurs phosphatidylsérines, ces dernières présentant une forte affinité pour le calcium. Par conséquent, les CA accumulent des ions calcium à l'extérieur de leur membrane (203). Il semblerait donc que l'initiation de la minéralisation se fasse à l'extérieur des CA tandis qu'elle a lieu au sein des VM (204).

2.2 Régulation de la minéralisation

Contrairement à l'idée selon laquelle la calcification est due à une précipitation spontanée des ions phosphate et calcium, il est aujourd'hui admis que la minéralisation est un phénomène très régulé. En effet, les cristaux doivent se former de façon ordonnée dans le temps et l'espace, et en relation avec la matrice organique sous-jacente. Les mécanismes qui déterminent la restriction spatiale de la minéralisation ne sont pas bien compris. Cependant, il est clairement admis que la régulation de la formation des cristaux est sous le contrôle des

protéines non collagéniques contenues dans la fraction organique de l'os et du cartilage (200). Ces protéines sont nombreuses, les principales sont mentionnées ci-dessous (Tableau 3). Il semblerait, cependant, d'une manière générale que les protéines non collagéniques en forte concentration et/ou en solution inhibent la minéralisation alors qu'en faible concentration et/ou immobilisées sur des surfaces solides, elles la stimulent (205).

2.2.1 Protéines favorisant la minéralisation

2.2.1.1 Dentine Sialophosphoprotéine (DSPP)

La DSPP est une protéine qui appartient à la famille des small integrin binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLING). Cette famille partage la particularité d'être exprimée dans l'os et la dent, et possède un site RGD (Arg-Gly-Asp). La DSPP est exprimée principalement par les odontoblastes (206), mais également par d'autres types cellulaires, tels que les ostéoblastes, très faiblement (49), ou les pré-améloblastes, de manière transitoire (207). Cette molécule est un précurseur qui va être clivée pour donner naissance à deux protéines, la DSP et la DPP (208). Ces deux protéines ont été identifiées de manière indépendante comme des composants de la matrice extracellulaire.

La DPP est la plus abondante des protéines non collagéniques de la dentine et est une protéine majeure impliquée dans le développement de la dent et sa minéralisation. Plusieurs rôles lui ont été attribués dans la dentinogenèse. La DPP peut initier la nucléation de l'apatite de la dentine, ainsi que la fibrillogenèse du collagène (209). Par ailleurs, lors de la dentinogenèse imparfaite de type II, le taux de cette protéine est réduit et est corrélé à des défauts de minéralisation, ce qui suggère un rôle de la DPP dans la déposition du minéral et sa croissance *in vivo* (210). Des études menées *in vitro* ont montré que la DPP est capable de se lier au calcium et à l'hydroxyapatite, et qu'elle favorise la nucléation ainsi que la croissance des cristaux (211). Enfin une étude a montré que la phosphorylation de la DPP était primordiale dans sa fonction de liaison au collagène et donc dans la régulation de la minéralisation de la dentine (212). Cependant, en fonction des conditions expérimentales *in vitro*, il a été rapporté qu'elle pouvait avoir des effets antagonistes. Ainsi, en solution (213) ou à des fortes concentrations en gel d'agarose (supérieures à 100 µg/mL) (214), la DPP bloque la croissance cristalline, tandis que sur une surface solide (215) et à de faibles concentrations, elle stimule la nucléation (214).

Quant à la DSP, ses fonctions précises restent à être déterminées mais d'après des études menées *in vitro*, il semblerait qu'elle ne soit pas impliquée dans les processus de minéralisation (216).

L'importance de la DSPP dans la dentinogenèse a été mise en évidence *in vivo* par l'utilisation de souris invalidées pour ce gène. Ces souris présentent des défauts de minéralisation de la dentine (217). De plus, des mutations de ce gène sont associées avec la dentinogenèse imparfaite de type II chez l'homme (218 , 219).

2.2.1.2 Phosphatase alcaline tissu non spécifique (TNAP)

La phosphatase alcaline est une enzyme liée à la membrane de telle sorte que sa sous-unité catalytique est localisée dans le milieu extracellulaire et qui peut être libérée dans la circulation sanguine. Quatre isoformes de cette enzyme ont été décrits (intestinale, germinale, placentale et tissu non spécifique (TNAP)), la TNAP étant exprimée dans le foie, les reins, l'os, le cartilage, principalement par les chondrocytes hypertrophiques, ainsi que les dents.

Le rôle de la TNAP est de générer du Pi pour la cristallisation des cristaux d'apatite. Ainsi, il a été montré *in vitro* qu'au cours du processus de minéralisation, l'activité enzymatique de la TNAP augmente, et les phosphates organiques présents, tels que le β -glycérophosphate, ou l'ATP, sont hydrolysés en libérant du Pi (182, 220). Cette génération de Pi dans le milieu permet la minéralisation de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et des chondrocytes de la plaque de croissance (136, 221). Cependant, la présence de Pi n'est pas une condition suffisante pour que la minéralisation ait lieu, en raison de la présence de PPI, un inhibiteur de la minéralisation (222 , 223). La TNAP est également capable d'hydrolyser le PPI et donc de faciliter la précipitation et la croissance des cristaux (177). Ces fonctions de la TNAP la placent au centre du métabolisme du Pi et du PPI, essentiels dans la régulation du phénomène de minéralisation. Les transporteurs de Pi et de PPI (PiT-1, PiT-2 et Ank) sont également impliqués dans la balance Pi/PPI (Figure 9) et seront détaillés par la suite.

L'importance de la TNAP est suggérée par des études *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, le rôle de cette enzyme dans la minéralisation est déduit de la capacité de cellules transfectées avec de l'ADNc de TNAP à minéraliser. Par ailleurs, dans ces cellules transfectées, une inhibition de l'activité de la TNAP empêche le processus de minéralisation (224). De plus, l'étude du phénotype des souris invalidées pour le gène de la TNAP, les souris *Akp2^{-/-}*, montre que ces souris sont caractérisées par une minéralisation réduite et une forte concentration

extracellulaire de PPI. Cependant ces souris possèdent des VM contenant des cristaux mais présentent un retard de croissance cristalline, ce qui suggère qu'il existe d'autres enzymes, tels que la PHOSPHO-1, capables de suppléer partiellement au rôle de la TNAP (225 , 226). Chez l'homme, une mutation du gène de la TNAP conduit à l'hypophosphatasie, qui est une maladie génétique rare caractérisée par une absence de la TNAP dans le sérum associée à un défaut de minéralisation osseuse (227).

2.2.1.3 Sialoprotéine osseuse

La Sialoprotéine osseuse ou integrin-binding sialoprotein (BSP ; Bone Sialoprotein) est une glycoprotéine extracellulaire appartenant à la famille des SIBLING, et synthétisée quasi exclusivement par les cellules des tissus minéralisés incluant l'os, la dentine, et le ciment (228 , 229). Des études menées *in vitro* et *in vivo* chez le rat ont montré qu'elle jouerait un rôle spécifique dans les stades initiaux de la minéralisation en tant que nucléateur (230 , 231) et ce contrôle pourrait passer par sa capacité de liaison aux fibres de collagène (232). *In vitro*, des cellules provenant de souris invalidées pour la BSP forment des nodules hypominéralisés. De plus, les souris BSP^{-/-} présentent un léger déficit de minéralisation à la naissance mais elles rattrapent leur retard de minéralisation avec l'âge. Ces données confirmeraient le rôle de la BSP en tant que nucléateur aux stades initiaux de la minéralisation (233). Des études ont également montré qu'après les phases initiales de la croissance des cristaux, la BSP agissait comme un inhibiteur de la croissance cristalline (231). Enfin, la Sialoprotéine osseuse possède une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) qui est un site d'attachement cellulaire reconnu par des intégrines $\alpha_v\beta_3$ (234). Via cette séquence RGD, la BSP contribue à l'activité des ostéoclastes en interagissant avec leurs intégrines (235 , 236). Cette hypothèse semble être validée par une réduction de la différenciation des ostéoclastes isolés des os de souris BSP^{-/-} (233).

2.2.1.4 Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1)

La DMP-1 est une protéine acide phosphorylée appartenant à la famille des SIBLING (228, 237). Elle a été mise en évidence pour la première fois dans les odontoblastes (238). Mais des analyses postérieures ont permis d'étendre son expression dans l'os et le ciment. Dans le tissu osseux, la DMP-1 est particulièrement exprimée par les ostéocytes mais également par les ostéoblastes (239 , 240).

La DMP-1 facilite les interactions matrice-cellule et permet la communication intercellulaire grâce à sa séquence RGD. Comme les autres protéines de la famille SIBLING, elle possède de nombreux sites de phosphorylation et de glycosylation qui peuvent affecter sa conformation et son interaction avec les autres protéines de la matrice extracellulaire. La DMP-1 possède une forte affinité pour l'hydroxyapatite (241 , 242). Des études menées sur des souris DMP-1^{-/-} montrent que ces dernières présentent des défauts de la minéralisation osseuse. De plus, des mutations du gène DMP-1 chez l'homme conduisent à un rachitisme ou une ostéomalacie hypophosphatémique, ce qui démontre que la DMP-1 joue également un rôle dans l'homéostasie phosphocalcique (243), dont la régulation sera détaillée dans le chapitre suivant.

2.2.1.5 Ostéonectine

L'ostéonectine, également appelée SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine) ou BM-40 (Basement membrane 40), est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire des tissus minéralisés liant le calcium et le collagène (244). L'ostéonectine est exprimée au niveau de l'os, en particulier dans les zones à fort remodelage osseux et est l'une des protéines non collagéniques les plus abondantes du tissu osseux. Elle est également exprimée par le cartilage, la peau ou les vaisseaux sanguins. Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'ostéonectine pouvait inhiber la nucléation et retarder la croissance cristalline (245 , 246). Cependant, des souris invalidées pour ce gène présentent une diminution du nombre d'ostéoblastes qui conduit à une réduction de la densité osseuse et à une ostéoporose (247). Par ailleurs, ces souris présentent également une forte masse grasseuse, ce qui a suggéré que l'ostéonectine favorisait la différenciation chondrocytaire à la différenciation adipocytaire ; ces deux types cellulaires dérivant d'une même origine mésenchymateuse. Cette protéine ne joue pas un rôle structural dans la matrice mais module les interactions cellules-matrice (248). L'un des rôles qui lui a été attribué est de lier les cristaux aux fibres de collagène (249). Récemment, un rôle de protéine chaperonne du collagène lui a également été prêté. Ainsi, elle augmenterait la stabilité du collagène dans la cellule et régulerait la fibrillogenèse extracellulairement (250).

2.2.1.6 Annexin (Anx)

Les Anx représentent une vaste famille de protéines définies par leur capacité à se lier à des phospholipides membranaires de manière dépendante du calcium (251). Bien que leurs structures et leurs caractéristiques biochimiques aient été largement décrites, leurs rôles *in vivo* restent à être déterminés précisément (252).

L'Anx V est la plus abondante des Anx de l'os (253 , 254) mais elle a également été décrite à la surface des chondrocytes et des fibroblastes (255). De plus, comme mentionné précédemment, les Anx II, Anx V, Anx VI ont été décrites à la surface interne et externe des vésicules matricielles.

L'Anx V forme un complexe transmembranaire hexamérique présentant des sites de liaison au calcium et contenant un canal central (256). Des expériences *in vitro* menées sur des chondrocytes de la plaque de croissance lui ont attribué un rôle dans l'apoptose (257 , 258), le trafic vésiculaire et le transport de calcium (259). Des études menées sur des chondrocytes *in vitro* ont montré qu'une surexpression d'Anx V associée à une présence importante de cristaux phosphocalciques, comme il peut être observé lors de pathologies telles que l'arthrose, conduisait à l'apoptose des chondrocytes (260). De plus, du fait de sa capacité de liaison *in vitro* au collagène, incluant le collagène de type I, ou à d'autres éléments du cytosquelette, l'hypothèse selon laquelle l'Anx V jouerait également un rôle dans la mécanotransduction a été émise (261). Un rôle essentiel de l'Anx pendant la minéralisation est décrit, et particulièrement lors de l'ossification endochondrale (255, 262). Cependant, des souris déficientes pour l'Anx V ne présentent aucune modification de leur développement squelettique. Ceci peut s'expliquer par la compensation des fonctions de l'Anx V par les autres membres de la famille des Anx (263). L'Anx II semble jouer un rôle dans la minéralisation ostéoblastique. Ainsi, une surexpression de l'Anx II dans des cellules ostéoblastiques augmente la minéralisation et l'activité de la TNAP (264).

2.2.1.7 Phospho-1

La phospho-1 a été identifiée initialement chez le poulet (265), puis chez d'autres espèces telles que l'homme et la souris (266 , 267). Cette phosphatase est exprimée dans le tissu osseux (267). Par immunolocalisation, il a été montré que cette enzyme était très présente au niveau des zones minéralisées de l'os et du cartilage chez le poulet et la souris (268). La diminution de l'activité de la phospho-1 par l'utilisation d'inhibiteurs réduit la capacité de calcification des VM *in vitro* (269). Par ailleurs, des souris inactivées pour la TNAP (Akp-2^{-/-})

présentent certes une hypophosphatasie similaire à celle observée chez l'homme, mais naissent avec un squelette minéralisé et leurs VM contiennent des cristaux d'apatite (225 , 226). Ces études, ainsi que le fait que cette enzyme soit exprimée avant que le processus de minéralisation ne débute, suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans les phases initiales de la minéralisation et réguler partiellement le ratio Pi/PPi (270).

Cette enzyme aurait pour substrats la phosphoéthanolamine et la phosphocholine, qui vont former la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine, des lipides membranaires. Au cours de la minéralisation, il a été montré que la concentration de ces deux lipides diminuait tandis que la concentration en diacyl glycérol (DAG) augmentait dans la cellule. Une étude basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de la phospho-1 suggère que cette enzyme libérerait du phosphate présent dans les phospholipides membranaires, ce qui permettrait l'augmentation de la concentration de Pi au sein des VM (269).

2.2.1.8 *Stanniocalcine 1 (STC1)*

La stanniocalcine (STC1) possède deux isoformes, STC-1 et -2, qui sont des phosphoglycoprotéines sécrétées, et ont été isolés chez l'homme, la souris et d'autres mammifères (271 , 272). Ces protéines sont impliquées dans l'homéostasie phosphocalcique (273 , 274) et leur expression est retrouvée dans l'os (275), les reins (276), et l'intestin (277). Des études menées sur des cellules rénales (278) ainsi que sur des neurones (279) ont montré que la STC1 stimule l'activité des transporteurs de phosphate dépendant du sodium, ce qui suggère que STC1 jouerait un rôle significatif dans la médiation des effets du Pi. Plus particulièrement, des études récentes ont montré que STC1 jouait un rôle dans la minéralisation osseuse via la stimulation de l'expression et de l'activité du transporteur dépendant du sodium de type III, PiT-1, dans les ostéoblastes *in vitro* et *in vivo*, et qu'il existe un mécanisme de rétrocontrôle positif, le Pi stimulant l'expression de STC1 (280).

2.2.2 Protéines inhibant la minéralisation

2.2.2.1 Fétuine-A

La fétuine-A (ou α 2-HS-glycoprotéine) est une protéine qui est exprimée par le foie (281), et bien qu'elle soit une protéine non collagénique très abondante dans l'os chez le rat, le bœuf ou l'homme (282 , 283 , 284), aucune étude à ce jour n'a pu mettre en évidence sa synthèse dans les tissus calcifiés. Elle se retrouve dans la matrice non collagénique osseuse par le biais du sérum, où des concentrations élevées de fétuine-A ont été mesurées. Cette protéine empêche la précipitation phosphocalcique. En effet, la fétuine-A se lie à l'hydroxyapatite et inhibe sa croissance ainsi que la précipitation des ions calcium et phosphate dans un milieu supersaturé *in vitro* (285). Il a été montré *in vitro*, dans un modèle de culture cellulaire de moelle osseuse de rat, que la fétuine-A inhibait l'ostéogenèse. De plus, des souris déficientes pour la fétuine-A développent des calcifications ectopiques malgré une balance phosphocalcique normale. En outre, des patients souffrant d'insuffisance rénale présentent de faibles taux de fétuine-A, ce qui expliquerait en partie les calcifications vasculaires observées (286). En effet, la fétuine-A est retrouvée dans les VM des VSMC, ce qui leur enlève la capacité de calcifier. Cependant, les mécanismes de son incorporation dans les VM n'ont pas été élucidés. Il a été émis l'hypothèse que ces VM se forment dans les VSMC afin de réduire la concentration intracellulaire de calcium, qui lorsqu'elle est élevée, est létale et donc de prévenir l'apoptose (287). Par ailleurs, la fétuine-A inhibe les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose en empêchant le clivage qui active les caspases 3, 8 et 9 (288) et augmente la phagocytose (289). Une étude récente a montré *in vitro*, en utilisant une solution concentrée en phosphate et en calcium et dont la seule macromolécule présente est la fétuine-A, que cette dernière déterminerait la localisation de la formation des cristaux. Ainsi, en présence de fétuine-A, la formation de cristaux est favorisée au sein des fibres de collagène ou dans des matrices synthétiques ayant des caractéristiques similaires aux fibres de collagène et est inhibée dans la solution, tandis qu'en l'absence de fétuine-A, les cristaux se formeraient dans la solution (290). Cependant des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer l'implication de ce mécanisme dans les calcifications au niveau osseux.

2.2.2.2 Matrix Gla Protein (MGP)

La MGP a été découverte initialement dans des extraits déminéralisés de matrice osseuse (291). Elle est exprimée par les ostéoblastes (93), les chondrocytes (292) mais également par les VSMC (293), les artères, les poumons, les reins, ou le coeur (294, 295). Cette protéine contient neuf résidus glutamate dont cinq peuvent subir une γ -carboxylation dépendante de la Vitamine K, et donner ainsi des résidus γ -carboxyglutamates, désignés par « Gla ». Elle possède également cinq sérines dont trois peuvent être phosphorylées post-traductionnellement. Il a été montré que la γ -carboxylation était nécessaire à l'activation de la protéine. En revanche le rôle de la phosphorylation n'est pas clairement défini, bien qu'elle semble permettre la sécrétion de la MGP hors de la cellule (296). Plusieurs facteurs peuvent réguler l'expression de la MGP. Ainsi, il a été montré que l'acide rétinoïque stimule la transcription de la MGP dans les fibroblastes et les chondrocytes et à l'inverse il réprime la transcription de la MGP dans les cellules rénales et les VSMC (297). Il a également été montré *in vitro* que la vitamine D₃ diminue l'expression de la MGP dans des cultures de VSMC (298). Enfin, dans des chondrocytes de la plaque de croissance, le traitement par des concentrations élevées de Pi conduit à une stimulation de l'expression et de la production de la MGP au niveau de l'ARNm et de la protéine (292).

La MGP est une protéine inhibitrice des processus de minéralisation. Ainsi, les souris invalidées pour le gène de la MGP développent des calcifications vasculaires et cartilagineuses, notamment du cartilage de croissance, conduisant à une petite taille, une fragilité osseuse et des fractures ; ces souris meurent au bout de six à huit semaines de ruptures vasculaires (299). A l'inverse, la surexpression de MGP dans les membres en développement retarde la maturation des chondrocytes et bloque l'ossification endochondrale (300). Une maladie génétique humaine rare, appelée syndrome de Keutel, est liée à une mutation sur le gène codant pour la MGP et conduit à des calcifications du cartilage et à une sténose des artères pulmonaires (301).

Bien que plusieurs théories relatives à la manière dont MGP exerce son effet inhibiteur de la calcification aient été avancées, les mécanismes impliqués dans les effets moléculaires de MGP restent incompris. La MGP est une protéine dépendante de la vitamine K. Elle est activée post traductionnellement par une conversion de ses résidus d'acide glutamique en acide γ -carboxyglutamique (Gla) par la γ -carboxylase (302). Les preuves de l'implication des

résidus Gla de la MGP dans son rôle d'inhibiteur de la calcification proviennent de rats traités par de la warfarine, un antagoniste de la vitamine K. Ces rats présentent en effet des calcifications ectopiques au niveau du cartilage. Une fois activée, la MGP régulerait la déposition de calcium grâce à ses résidus Gla qui présentent une forte affinité pour le calcium et les cristaux (303 , 304). La chélation du calcium empêcherait ainsi la minéralisation. Récemment, il a été proposé, outre son action inhibitrice de la calcification, que la MGP pourrait être un régulateur clé de la différenciation ostéoblastique induite par la BMP-2. Une réduction de l'activité de la TNAP a été observée dans un modèle d'ostéogenèse induite par la BMP-2 (305) tandis qu'une inhibition de l'expression de la MGP augmente l'activité de la TNAP (306). Urist *et al.* (307) ont montré qu'il existait une liaison physique entre la MGP et la BMP-2, interaction se produisant dans les systèmes cellulaires ou *in vivo*, et qui pourrait en partie expliquer la fonction régulatrice de la différenciation ostéoblastique de la MGP. Ce mécanisme impliquerait une autre protéine, la High-Temperature Requirement Protein A-1 (HtrA-1). HtrA-1 s'associerait à la MGP et la cliverait au niveau C-terminal, ce qui permettrait à la MGP de se lier à la matrice extracellulaire avec une haute affinité. Ainsi fixée, la MGP pourrait séquestrer la BMP-2 active circulante, la rendant ainsi inactive (308) (Figure 10). La MGP peut également se lier à des composants de la matrice extracellulaire tels que l'élastine et la vitronectine, présents dans le milieu extracellulaire des artères, ce qui permettrait une accumulation de MGP à ce niveau et empêcherait la survenue de calcifications ectopiques (309). Enfin, il a été montré que la MGP régule l'apoptose dans les VSMC et les chondrocytes (309 , 310). Ce dernier point sera développé dans le paragraphe traitant des calcifications ectopiques.

2.2.2.3 Ostéopontine (OPN)

L'OPN, également connue sous le nom de Secreted Phosphoprotein 1 (Sp1), est une phosphoprotéine non collagénique, qui appartient à la famille des SIBLING. Cette protéine est exprimée par les ostéoblastes, les ostéoclastes, les chondrocytes hypertrophiques, les hépatocytes, les lymphocytes T activés (311), les VSMC (312), et les cellules endothéliales (313). L'OPN est produite par les ostéoblastes à un stade tardif de leur maturation et est présente dans la matrice osseuse. Elle est également fortement exprimée par les ostéoclastes. De nombreuses fonctions lui ont été décrites dans l'adhésion cellulaire ou l'immunologie entre autres. Et particulièrement, l'OPN est associée à la minéralisation du tissu osseux et aux

calcifications ectopiques (314). L'OPN se lie fortement aux cristaux d'hydroxyapatite et inhibe la croissance cristalline et la calcification *in vivo* et *in vitro* (315). De plus des études ont montré que l'OPN non seulement empêchait la formation des cristaux mais favorisait également leur dissolution (316 Steitz, 2002 #103). L'effet inhibiteur de l'OPN sur la minéralisation est dépendant de son degré de phosphorylation. Ainsi, il a été montré qu'après une déphosphorylation par une phosphatase, l'OPN perdait sa fonction inhibitrice (317 , 318). Par ailleurs, l'expression de l'OPN est augmentée en réponse au Pi dans des cultures de cellules ostéoblastiques (220) ou des VSMC (319), ce qui suggère que l'OPN pourrait jouer un rôle de rétrocontrôle négatif en inhibant la formation des cristaux. D'autres modifications post traductionnelles comme la sulfatation (320) ou la glycosylation (321) peuvent affecter ses fonctions d'adhésion ou d'inhibiteur de la minéralisation. Les données obtenues à partir de souris invalidées pour le gène de l'OPN ont permis de mieux cerner son rôle. Ainsi, le phénotype osseux des souris OPN^{-/-} est caractérisé par des os globalement plus résistants et minéralisés que ceux des souris témoins (322). Cela serait dû à un retard de résorption osseuse, plusieurs études ayant montré que la déficience en OPN affecte les fonctions de résorption des ostéoclastes du fait d'une réduction de leur adhésion et de leur motilité (323 , 324). Au niveau rénal, ces souris présentent une formation anormale de cristaux d'oxalate de calcium (325).

2.2.2.4 Ostéocalcine (OCN) ou Bone Gla Protein (BGP)

L'ostéocalcine est exprimée par l'ostéoblaste mature, les chondrocytes et les odontoblastes (326 , 327). Cette protéine possède trois résidus « Gla », comme la MGP. Bien que son rôle ne soit pas clairement défini, l'affinité de ses résidus gla pour le calcium suggère qu'à l'instar de la MGP, l'un de ses rôles serait d'inhiber la minéralisation. L'augmentation de la masse osseuse observée chez la souris invalidée pour le gène de l'ostéocalcine conforte cette hypothèse (328). Il a été montré *in vitro* que l'OCN se lie à l'apatite avec une grande affinité (329) et contrôle ainsi la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (330 , 331). Cependant, il existe de nombreuses controverses quant à l'implication de cette protéine dans la minéralisation de la matrice extracellulaire. Ainsi, de nouvelles études ne mettent pas en évidence de rôle pour l'OCN dans la minéralisation de la matrice extracellulaire (223). Au contraire, d'autres études soutiennent que la carboxylation dépendant de la vitamine K de ses résidus entraîne une forte affinité de l'OCN aux cristaux d'hydroxyapatite de l'os et favoriserait la minéralisation (332 , 333). Parallèlement à ces effets potentiels dans la

minéralisation, de nouveaux rôles dans le métabolisme du glucose lui ont été attribués (3). Ainsi, cette protéine jouerait un rôle majeur dans le métabolisme énergétique en agissant simultanément sur l'insulinosécrétion et l'insulinosensibilité (4). Bien que ces nouvelles fonctions ouvrent de nouvelles perspectives sur le rôle endocrin du tissu osseux dans l'organisme, cet aspect très intéressant ne sera pas développé dans ce manuscrit.

2.2.2.5 Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP)

La nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, retrouvée sous plusieurs abréviations dans la littérature, comme NTPPH, E-NPP ou NPP, est une glycoprotéine transmembranaire qui existe également sous forme soluble. Cette enzyme permet la génération de PPi à partir de nucléoside triphosphate (Figure 9) et est exprimée par les chondrocytes et les ostéoblastes (334). Le PPi est un puissant inhibiteur de la minéralisation et a par conséquent un rôle opposé à celui du Pi. Il régule négativement la cristallisation en se liant à la surface de cristaux de phosphate de calcium basique (BCP) incluant l'hydroxyapatite, et inhibe la croissance cristalline (335). La balance Pi/PPi est donc primordiale dans le contrôle des phénomènes de minéralisation dans le cartilage et l'os, ainsi que dans les tissus non minéralisés. Des souris invalidées pour le gène codant la NPP présentent une hyperminéralisation, particulièrement au niveau du cartilage articulaire et des artères (336).

2.2.2.6 Progressive ankylosis (Ank)

Le gène *progressive ankylosis* (Ank) code pour une protéine transmembranaire régulant le transport du PPi du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Figure 9). Cette protéine intervient donc également au côté de NPP pour réguler la balance Pi/PPi. Ank est exprimée par de nombreux tissus, tels que le foie ou le cœur ainsi que par le tissu osseux et le cartilage (168). Une mutation perte de fonction du gène Ank chez la souris conduit à une augmentation de PPi intracellulaire et une réduction de PPi extracellulaire avec formation de cristaux basiques de phosphate de calcium (BCP). Ces souris présentent des phénotypes identiques aux souris invalidées pour le gène NPP avec des calcifications ectopiques dans le cartilage et les tissus physiologiquement non minéralisés. Une mutation gain de fonction sur le gène Ank chez l'homme entraînant une augmentation de l'activité de Ank et donc une élévation de PPi extracellulaire, ayant pour conséquence une déposition de cristaux de pyrophosphate de

calcium dihydraté (CPPD) dans le cartilage articulaire, conduit à une chondrocalcinose articulaire familiale (337). D'autres mutations chez l'homme conduisent à une croissance excessive des os craniofaciaux et des os longs (338). Ceci suggère que Ank jouerait également un rôle dans la différenciation des ostéoblastes. Afin de tester ce rôle, Parker *et al.* ont utilisé une lignée de cellules ostéoblastiques sous-exprimant Ank et ont mis en évidence une réduction de l'expression des marqueurs osseux tels que la TNAP, la BSP, l'OCN et le collagène de type I (339).

2.2.2.7 Ostéoprotégérine (OPG)

L'OPG est un membre de la famille des récepteurs au TNF (tumor necrosis factor) exprimée par la plupart des cellules dont les ostéoblastes et les VSMC (340, 341, 342). Elle a été découverte initialement comme une protéine ayant une capacité d'inhibition de la résorption osseuse (343). Elle joue également un rôle dans les réponses immunitaires et l'apoptose. Au niveau osseux, ce facteur est sécrété par les ostéoblastes et se fixe avec une forte affinité à son ligand RANKL, empêchant ce dernier de se lier à son récepteur RANK, ce qui entraîne l'inhibition de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes (344). Des souris invalidées pour ce gène présentent non seulement une perte osseuse et une ostéoporose conduisant à des fractures osseuses multiples, mais également des calcifications ectopiques au niveau des artères rénales et de l'aorte (345). De plus, de par sa liaison à TRAIL (TNF related apoptosis induced ligand) l'OPG possède un rôle anti-apoptotique qui permettrait une réduction du nombre de corps apoptotiques, qui peuvent servir de sites de nucléation (172, 346). Bien que la plupart des études menées sur des modèles animaux montre que l'OPG est associée à une protection contre la calcification des vaisseaux sanguins, il a été décrit l'association paradoxale entre calcification artérielle et perte de la masse osseuse chez les personnes âgées, qui possèdent un taux sérique élevé d'OPG (347). Il n'est cependant pas clair si l'OPG est simplement un marqueur de la calcification ou si elle agit pour limiter cette calcification.

2.3 Calcifications ectopiques

La calcification des tissus non minéralisés se produit lors de situations pathologiques et a d'importantes conséquences cliniques. Des calcifications se produisent ainsi lors de pathologies cardiovasculaires, d'arthrose, de pathologies rénales, de cancers ou

physiologiquement lors du vieillissement. Contrairement à l'idée selon laquelle la calcification des tissus non minéralisés résulte d'une simple précipitation physique des cristaux, il est aujourd'hui admis que ce processus est finement régulé, et que les mécanismes moléculaires gouvernant la calcification ectopique sont similaires à ceux se produisant au cours de la calcification physiologique (348, 349). La formation de minéral dans les tissus normalement non calcifiés peut être la conséquence de désordres métaboliques ou génétiques touchant les molécules favorisant ou inhibant la calcification et citées précédemment (350, 351, 352, 353).

2.3.1 Défauts des inhibiteurs de la calcification

Il a été montré que les concentrations plasmatiques physiologiques de calcium (1,17 à 1,3 mmol/L) et de phosphate (0,85 à 1,3 mmol/L) chez l'homme sont compatibles avec la précipitation des ions sous forme de cristaux (303). Cependant, dans un modèle de culture d'aorte de rat où les cellules sont cultivées pendant trois semaines en présence de concentration plasmatique de calcium et de phosphate, aucune calcification n'a été constatée. Cela confirme qu'une concentration élevée de ces ions n'est pas suffisante pour induire une minéralisation et est expliquée par la production de PPi par les vaisseaux, des calcifications se produisant uniquement lors de l'élimination enzymatique de ce composé (352).

Des calcifications ectopiques peuvent également se produire lors de l'absence de protéines inhibitrices de la minéralisation telles que la MGP (354) ou l'OPG (355). Des études menées sur des modèles animaux ont montré que la minéralisation des artères et du cartilage était inhibée de manière active principalement par deux protéines non collagéniques circulant dans le sérum : la MGP et la fétuine-A (356, 357). Ainsi, des souris invalidées pour la fétuine-A ou la MGP présentent des calcifications ectopiques (299, 358). Chez l'homme, des mutations au niveau du gène de la MGP conduisent au syndrome de Keutel, maladie autosomique récessive caractérisée par une sténose trachéobronchique et des calcifications ectopiques au niveau du cartilage et des artères (301).

2.3.2 Excès des promoteurs de la calcification

Différents facteurs sont susceptibles de provoquer des calcifications ectopiques au sein de l'organisme. Des études ont montré *in vitro* et *in vivo* qu'une concentration élevée de Pi provoquait une transition des VSMC vers un phénotype ostéochondrogénique (359, 360).

Ainsi, il a été montré que des VSMC exprimaient le facteur de transcription Runx-2, ainsi qu'un certain nombre de protéines associées au tissu osseux telles que la TNAP, la BSP, l'OPN ou l'ostéocalcine, qui peuvent réguler les processus de minéralisation (361). Ces marqueurs ostéoblastiques orchestrent au sein de la paroi des vaisseaux un processus ressemblant à l'ostéogenèse (362, 363, 364). Plusieurs études ont montré l'implication du cotransporteur de phosphate sodium-dépendant PiT-1 dans l'élévation du Pi dans les VSMC, conduisant à leur différenciation ostéoblastique et aux calcifications (359, 365).

De plus, il a été montré qu'au cours de l'athérosclérose ou de l'arthrose, les VSMC ou les chondrocytes respectivement produisaient des lipides oxydés qui seraient également impliqués dans les processus de calcification par modulation directe du dépôt d'hydroxyapatite sur la matrice (366). Par ailleurs, une attention particulière est portée depuis quelques années sur la leptine, qui est un facteur de satiété synthétisé par les adipocytes. Des études ont montré qu'elle augmentait la minéralisation des cellules cardiovasculaires *in vitro* via en particulier une stimulation de l'activité de la TNAP (367). De plus, de fortes concentrations de leptine ont été trouvées au niveau d'articulations arthrosiques chez l'homme, ce qui suggère que la leptine intervient également dans le développement de l'arthrose (368).

Comme mentionné précédemment, l'apoptose est impliquée dans la mise en place des calcifications ectopiques. Le monoxyde d'azote (NO) est un facteur induisant l'apoptose des chondrocytes et il contribuerait à la mise en place de l'arthrose. Ainsi le traitement de chondrocytes *in vitro* par un donneur de NO stimule la calcification (369, Cheung, 1999 #296). L'apoptose peut être à l'origine de calcifications ectopiques via la formation de CA au niveau de la média des artères par exemple, bien que ces derniers aient également été décrits dans des zones de minéralisation physiologique telle que la plaque de croissance. Cette apoptose peut être provoquée par des concentrations élevées en Pi, comme cela a été décrit dans la plaque de croissance, où la concentration de Pi croît de la zone proliférative vers la zone hypertrophique (35, 36) ou dans les VSMC (370). Par ailleurs, des études ont montré que l'inhibition de l'apoptose par l'utilisation d'inhibiteurs de caspases dans des cultures de VSMC n'inhibe que 40% de la minéralisation de cellules *in vitro*, ce qui indique que d'autres facteurs jouent un rôle dans ces phénomènes de minéralisation (172).

Enfin, les phénomènes inflammatoires observés au cours de l'athérosclérose ou lors des pathologies touchant le cartilage telles que l'arthrose ou la chondrocalcinose peuvent contribuer au développement de calcifications ectopiques. Ainsi, le TNF- α sécrété par des macrophages présents au niveau des plaques d'athérosclérose, est un inducteur majeur de la TNAP (371) et il stimule également *in vitro* l'expression de gènes ostéoblastiques dans les

VSMC bovines, favorisant ainsi les calcifications vasculaires (364). Au niveau articulaire, l'interleukine-1, une cytokine sécrétée par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques et impliquée dans la mise en place de la réponse inflammatoire, favorise la survenue de l'arthrose et des calcifications ectopiques en stimulant la production de monoxyde d'azote (350).

Ainsi, un certain nombre de facteurs est susceptible de provoquer des calcifications ectopiques, dont en particulier le Pi, d'où la nécessité d'une fine régulation de son homéostasie, sujet abordé dans la partie suivante.

III. HOMEOSTASIE PHOSPHOCALCIQUE

L'homéostasie phosphocalcique est maintenue principalement grâce à l'action coordonnée de trois organes que sont l'intestin, site d'absorption, le rein, site d'excrétion et l'os, site de stockage. Les flux d'ions phosphate et calcium sont régulés par différentes hormones telles que l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la 1,25-dihydroxyvitamine D3 [1,25(OH)₂D₃], ainsi que les phosphatonines et seront détaillés dans cette partie. L'équilibre entre l'apport et la perte des minéraux peut varier suivant le cycle de vie, les besoins en minéraux du squelette, l'apport de minéral par l'alimentation ou la présence de maladies. Ainsi par exemple, chez l'adulte sain, les taux sériques de calcium et de phosphate sont stables, et ce malgré les fluctuations lors de l'apport alimentaire, et la balance est neutre car il n'y a pas de perte ni de gain nets de calcium ou de phosphate dans le corps. La balance devient positive (les gains de minéraux excèdent la perte intestinale et rénale) pendant l'enfance et l'adolescence et chez la femme enceinte. La balance peut devenir négative lors du vieillissement et lors de maladies telles que l'hyperparathyroïdisme primaire.

3.1 Phosphate

On appelle phosphate les sels de l'acide orthophosphorique, H₃PO₄, qui sont essentiellement Na₂HPO₄ et NaH₂PO₄, présents dans le plasma selon un équilibre acide-base, le sel disodique étant en concentration quatre fois plus élevée que le monosodique à pH 7,4. Le phosphate peut être organique (lié à des macromolécules) ou inorganique, le Pi (qui est la forme libre circulante, transportée par les cellules et filtrée par le rein).

3.1.1 Rôles du phosphate

Le phosphate est un composant essentiel du minéral osseux et dentaire. Il sert également à la formation des phospholipides et des protéines phosphorylées constituant les membranes plasmiques ainsi que des nucléotides qui servent de réservoirs d'énergie ou sont des composants de l'ADN et de l'ARN. Enfin de nombreux intermédiaires protéiques impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire et régulant de nombreuses fonctions cellulaires possèdent du phosphate dans leur structure. La pluralité des fonctions du phosphate souligne

l'importance de ce métabolite et la nécessité d'une régulation fine de sa concentration par l'organisme.

3.1.2 Distribution, origine et apport journalier de phosphate

L'organisme d'un adulte de 70 kg contient environ 700 g de phosphate dont 85% sont contenus dans l'os et les dents sous forme de cristaux d'apatite, et 15% dans le reste des tissus sous forme d'esters phosphoriques et d'intermédiaires phosphorylés impliqués dans un grand nombre de processus biochimiques, dont la génération et le transfert d'énergie cellulaire. Un pour cent du phosphate est présent dans les liquides extracellulaires, principalement sous forme de Pi. En effet, dans le sérum, plus de 85% du phosphate est présent sous forme d'ions libres (Pi) et moins de 15% est lié aux protéines. La concentration plasmatique de Pi chez l'homme passe de 1,88-2,4 mM chez l'enfant à 0,85-1,3 mM chez l'adulte. Chez la souris, ces valeurs sont de 2,5 à 4 mM.

L'apport journalier de phosphate est d'environ 1200 mg. Environ 60 à 80% de ce phosphate sera absorbé au niveau de l'intestin proximal, et de manière prédominante par le jéjunum (Figure 11). Deux cents mg de phosphate sont sécrétés dans l'intestin via des sécrétions intestinales et pancréatiques et se retrouvent dans les fèces. Le phosphate absorbé se retrouve dans le liquide extracellulaire et des échanges se produisent avec l'os selon les besoins de l'organisme. Le taux de remodelage osseux est important dans la détermination de la concentration sérique de phosphate. Quasiment tout le phosphate plasmatique est filtré au niveau des glomérules rénaux. Une réabsorption de phosphate, qui varie suivant l'apport en phosphate, est effectuée dans la partie proximale du tubule rénal. Donc en condition physiologique, l'apport journalier de phosphate est équivalent à la quantité de phosphate excrété dans l'urine.

3.1.3 Transport du phosphate

L'entrée de Pi dans les cellules fait intervenir différentes familles de transporteurs de phosphate sodium-dépendants selon les types cellulaires, qui seront décrites dans la partie suivante. Le tableau 4 résume les propriétés de chacun de ces cotransporteurs Na⁺-Pi. Parallèlement à ces transporteurs de phosphate, de récentes études ont suggéré l'existence de senseurs de phosphate chez les mammifères (373 , 374), comme il a été décrit chez les levures (375). Cependant, la nature moléculaire de ces senseurs reste à être identifiée.

3.1.3.1 Reins

Au niveau des reins, trois familles de transporteurs de phosphate ont été mis en évidence, les cotransporteurs Na^+ -Pi IIa (Npt2a, SLC34A1), IIc (Npt2c, SLC34A3) et I (Npt1, SLC17A1) (<http://www.genenames.org>). Ces transporteurs sont situés au niveau de la bordure en brosse des cellules tubulaires et permettent le transport du phosphate de la lumière tubulaire vers le compartiment intracellulaire (Figure 12). Ces transporteurs actifs secondaires dépendant du sodium fonctionnent grâce à l'énergie fournie par la pompe Na/K-ATPase située au niveau basolatéral de la membrane cellulaire. En effet, le Pi entre dans la cellule en symport avec le Na, avec des stoechiométries différentes selon les transporteurs, en utilisant le gradient de Na maintenu par la pompe Na/K-ATPase. Il n'existe pas de transport passif paracellulaire (376).

Des études menées sur des souris adultes invalidées pour le gène Npt2a ont établi que ce transporteur assurait la majeure partie de la réabsorption du phosphate au niveau tubulaire proximal. En effet, ces souris présentent une réduction de 80% du transport tubulaire de Pi dépendant du sodium (377). L'expression de Npt2c est augmentée en réponse à l'invalidation de Npt2a, mais ne permet cependant pas de restaurer une réabsorption normale de phosphate et les souris sont hypophosphatémiques (378). Par ailleurs, des mutations au niveau du gène codant pour Npt2a entraînent chez l'homme des lithiases rénales calciques et une déminéralisation osseuse. Ces mutations conduisent en effet à une réduction de la réabsorption du phosphate et à une hypophosphatémie (379 , 380).

Les souris invalidées pour Npt2c ne présentent pas de phénotype particulier, ce qui confirme leur moindre importance comparée à Npt2a (381). Cependant, il est à noter que l'expression de Npt2c diminue avec l'âge chez les rats, ce qui suggère un rôle potentiel de ce cotransporteur pendant la croissance, au cours de laquelle les besoins en phosphate sont accrus (382). De plus, des données récentes ont montré que les souris invalidées pour Npt2c présentent une hypercalciurie et une hypercalcémie, ce qui suggère que Npt2c serait impliqué dans le maintien de l'homéostasie calcique (378). Des patients présentant une mutation de ce gène présentent un rachitisme hypophosphatémique accompagné d'une hypercalciurie (HHRH, Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria), ce qui dénote l'importance de ce gène pour l'homéostasie phosphocalcique chez l'homme (383 , 384).

Le Npt1, également localisé au niveau de la bordure en brosse du tubule proximal, n'est pas impliqué dans la réabsorption du phosphate, mais participe au transport d'autres anions organiques et pourrait également posséder une activité canal chlore (385). Un rôle dans le

transport de l'urée lui a également été attribué et des mutations du gène de *Npt1* pourraient être impliquées dans le développement de la goutte (386). Cependant, son rôle exact dans la régulation de l'homéostasie du phosphate reste à préciser.

Par ailleurs, une étude récente a montré que *PiT-2* était également présent au niveau des tubes contournés proximaux et qu'il était régulé par l'apport alimentaire en *Pi* (387 , 388).

3.1.3.2 Intestin

L'absorption intestinale du *Pi* se fait essentiellement via un transport passif non saturable en condition physiologique (389). Soixante à 80 % du *Pi* ingéré est absorbé. De plus, il existe un transport actif secondaire de phosphate au niveau de l'intestin qui est stimulé par des restrictions en apport de phosphate ou lors d'hypophosphatémie. En effet, des études ont montré que le cotransporteur sodium dépendant *Npt2b* est exprimé au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (390) et participerait pour plus de 90% au transport actif de phosphate dans l'absorption intestinale (389 , 391) (Figure 13). Des individus présentant des mutations perte-de-fonction pour le gène *Npt2b* développent des microlithiases au niveau pulmonaire mais ne présentent pas de perturbation de leur taux de phosphate sérique ou urinaire. Ceci laisse suggérer qu'il existerait un mécanisme compensatoire pour l'activité de ce transporteur. Ainsi, il a été montré que des souris inactivées de manière conditionnelle dans l'intestin pour ce transporteur mettent en place des mécanismes compensatoires consistant entre autres en une augmentation de l'expression de *Npt2a* (389).

3.1.3.3 Os

Au niveau du tissu osseux ont été mis en évidence des transporteurs de phosphate sodium dépendant de type III (SLC20) (Figure 14). Ces protéines ont dans un premier temps été identifiés en tant que récepteurs pour des rétrovirus d'où leur dénomination initiale de *Glv-1* (gibbon ape leukemia virus) et *Ram-1* (amphotrophic murine retrovirus) (392 , 393 , 394). Par la suite, les expérimentations ont déterminé que ces protéines sont en fait des transporteurs permettant le symport de sodium et de phosphate (395) et ils ont par conséquent été renommés *PiT-1* et *PiT-2* respectivement (396).

PiT-1 et *PiT-2* sont des protéines exprimées ubiquitairement mais leur niveau d'expression en terme d'ARNm est variable selon les tissus (365, 397). Peu de données sont actuellement disponibles en terme de protéines. Cependant, il a été montré que l'expression de *PiT-2* restait invariable au cours de la différenciation ostéoblastique et cartilagineuse dans des cultures de

MC3T3-E1 et d'ATDC-5 tandis que PiT-1 voyait son expression augmenter (186, 365 , 398). Les mécanismes de régulation de l'expression de ces transporteurs sont encore loin d'être parfaitement élucidés. L'expression ou l'activité de PiT-1 est régulée par une variété de facteurs de croissance ou d'hormones : endothéline-1 (399), PGF-2 α (400), stanniocalcine-1 (401), BMP-2 (135), IGF-1, TGF- β (402) et épinéphrine (403). Le Pi joue un rôle régulateur important de ces transporteurs, à la fois dans les ostéoblastes et les autres tissus. Ainsi, l'activité et l'expression de PiT-1 sont stimulées dans les ostéoblastes de la lignée PyMS et des ostéoblastes primaires provenant de calvaria de rats nouveaux-nés en réponse à de faibles concentrations de Pi tandis que l'expression de PiT-2 ne varie pas (404). Cependant, l'expression de PiT-1 semble être faible dans l'os et des études d'hybridation *in situ* menées *in vivo* au cours du développement n'ont pas détecté la présence du transcrite de ce transporteur dans des ostéoblastes (398). Il n'existe cependant aucune donnée chez l'adulte. De nombreuses études *in vitro* suggèrent que ces transporteurs jouent un rôle important pour la minéralisation osseuse (135, 280). Ainsi, il a été montré que le traitement de cellules ostéoblastiques en culture par du foscarnet, un inhibiteur non spécifique des transporteurs de Pi, ainsi que son injection sur des calvaria de rats nouveaux-nés, bloquaient la minéralisation osseuse (280). Ils jouent également un rôle dans l'initiation de la minéralisation dans les VSMC *in vitro* (370) comme il sera discuté plus loin.

Par ailleurs, Lundquist *et al.* ont également reporté *in vitro* l'expression de Npt2a et Npt2b dans deux lignées ostéoblastiques, les MC3T3-E1 et les UMR-106 (Figure 14). Il semblerait que le Pi stimule l'expression de Npt2a mais n'ait pas d'effet sur Npt2b dans les deux lignées cellulaires tandis qu'une déplétion en Pi n'aurait aucune influence sur l'expression de ces deux transporteurs. L'augmentation de l'expression de Npt2a pourrait permettre de réduire le taux de phosphate circulant vers les sites de minéralisation (405). Cependant, d'autres études n'ont pas pu mettre en évidence la présence de ces cotransporteurs sur des lignées ostéoblastiques (404).

Enfin, Gupta *et al.* ont montré que PiT-1 et Npt2a étaient exprimés dans les ostéoclastes. L'inhibition de l'activité de ces transporteurs réduit la quantité d'ATP ainsi que la résorption osseuse par les ostéoclastes, ce qui laisse suggérer que ces transporteurs fournissent le Pi nécessaire à la synthèse de l'ATP (406).

3.2 Calcium

3.2.1 Distribution du calcium

Le calcium total de l'organisme représente 1 à 2 kg, dont 99% est renfermé dans le tissu osseux. Le reste (1%) est distribué dans les tissus non calcifiés et le liquide extracellulaire. La concentration plasmatique en calcium est comprise entre 2,2 et 2,6 mmol/L, 50% étant sous forme ionisée, 40% attaché à des protéines, essentiellement l'albumine, et 10% lié à des ions citrate ou phosphate. Les actions biologiques du calcium sont attribuées à la fraction ionisée, qui permet les échanges avec l'os et les sites intracellulaires (Figure 15).

Au sein des cellules, la concentration calcique est de l'ordre de 100 nmol/L. Le calcium est stocké dans les organites intracellulaires, mitochondries ou réticulum endoplasmique, réalisant des réservoirs intracellulaires. Un pour cent du calcium intracellulaire se localise dans le cytosol, essentiellement lié aux protéines ou complexé à des anions, surtout au phosphate, moins de 0,1 % du calcium cytosolique étant à l'état ionisé.

3.2.2 Rôles

Le calcium intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que contraction musculaire, sécrétion hormonale, transmission neuronale, ou minéralisation. Il a également un rôle majeur dans la signalisation intracellulaire, agissant comme un second messenger. Dans ce cas, la concentration cytosolique du calcium peut atteindre des valeurs 10 à 100 fois plus élevées, par l'intermédiaire d'une entrée du calcium extracellulaire dans la cellule, ou d'une libération à partir des réserves calciques intracellulaires. Le calcium peut aussi agir en tant que cofacteur pour de nombreuses enzymes. De nombreux processus biologiques sont donc sous la dépendance de la calcémie et peuvent être influencés par des modifications même minimales de la concentration calcique extracellulaire ; c'est pourquoi une régulation fine de la calcémie est réalisée par l'organisme.

3.2.3 Organes principaux de l'homéostasie calcique

L'apport journalier de calcium est très variable mais il doit être compris entre 400 et 1000 mg chez un adulte afin de maintenir la balance calcique. Environ 400 mg de calcium est absorbé

au niveau de l'intestin grêle. L'absorption nette n'est cependant que de 200 mg car les sécrétions intestinales contiennent du calcium. Ainsi, 800 mg de calcium par jour sont éliminés par les fèces. Cette absorption nette de calcium augmente avec les apports alimentaires mais atteint un plateau quand l'ingestion dépasse 1000 mg par jour.

La filtration est réalisée au niveau des glomérules rénaux et comprend 60% de la calcémie. Elle concerne le calcium ionisé et le calcium complexé sous forme de sels de calcium. Environ 99 % de ce calcium filtré sera réabsorbé tout au long du néphron. La réabsorption atteint 70% au niveau proximal, 20% au niveau de l'anse de Henlé, et 10% au niveau du tubule distal.

Pour équilibrer les entrées et les sorties afin de maintenir une balance calcique nulle, l'excrétion urinaire du calcium doit correspondre à la quantité nette de calcium absorbé.

De plus, l'os est le réservoir principal de calcium et il joue un rôle essentiel, via le remodelage osseux, dans la maintenance de l'homéostasie calcique.

3.2.4 Transport et détection du calcium

3.2.4.1 Intestin

Deux mécanismes d'absorption du calcium ont été décrits au niveau de l'intestin : un mécanisme actif saturable, et un mécanisme passif dépendant d'un gradient électrochimique favorable entre la lumière intestinale et le sang.

L'absorption paracellulaire de calcium se fait tout le long du tube digestif de manière passive. Ce transport est permis par le gradient de concentration calcique existant entre la lumière intestinale et le sang.

L'absorption active par transport transcellulaire a lieu dans la partie proximale de l'intestin, notamment au niveau du duodénum et est régulée principalement par la vitamine D3. Le canal impliqué dans l'influx de calcium au niveau de la bordure en brosse des entérocytes est le TRPV6 (407). Cependant de nombreuses questions subsistent quant à ce mécanisme de transport. Une fois à l'intérieur de la cellule, le calcium est dirigé vers le pôle basal grâce à une CaBP diffusible (calcium binding protein) comme la calbindine 9kDa (408). La sortie du calcium au niveau basolatérale de l'entérocyte implique une pompe à calcium PMCA (Plasma Membrane Calcium-ATPase) ou un échangeur sodium/calcium (409) et se fait donc de manière active.

3.2.4.2 Rein

La réabsorption proximale de calcium au niveau du rein se fait principalement (pour 80%) selon un processus transcellulaire passif, parallèlement à la réabsorption du sodium. Les 20% restants font intervenir un processus actif via un canal, la paracelline-1, qui dépend de l'activité de la Na/K-ATPase au niveau de la branche ascendante de la anse de Henlé (410).

Au niveau distal, la réabsorption dépend d'un canal calcique, la TPRV-5 (411). Une fois dans la cellule, le calcium est transporté au niveau du pôle basolatéral grâce à la CB-28kDa, puis il est expulsé de la cellule via un échangeur sodium/calcium, et une calcium-ATPase (412).

3.2.4.3 Os

L'os est le réservoir principal de calcium et il joue un rôle essentiel, via le remodelage osseux, dans la maintenance de l'homéostasie calcique. En situation physiologique, les échanges sont équilibrés mais dans certains cas (grossesse ou situations pathologiques par exemple), le remodelage osseux est augmenté aux dépens de l'os.

Des canaux calciques dépendant du voltage de type L ou T, ainsi que des pompes calciques, sont exprimés par les ostéoblastes et permettent une entrée de calcium lors d'une augmentation de la concentration extracellulaire de calcium (413 , 414). Il semblerait que ces canaux interviennent plus dans la prolifération des cellules ostéoblastiques que dans leur différenciation (415).

Parallèlement, un autre mécanisme peut être activé lors d'une augmentation de la concentration de calcium extracellulaire. Ainsi, de nombreuses études ont montré qu'un récepteur sensible au calcium (CaSR), permettant à l'os de détecter et de répondre au calcium extracellulaire, est exprimé par les ostéoblastes, bien que cela ait été un sujet de controverses (416 , 417). Le CaSR a dans un premier temps été cloné à partir de glandes parathyroïdiennes bovines (418). Il a été montré que les lignées ostéoblastiques MC3T3-E1 (419), SaOS-2, UMR-106 (420) et MG-63 (421) exprimaient toutes ce récepteur au calcium. De plus, Chang *et al.* ont mis en évidence l'expression de la CaSR au niveau de l'ARNm et de la protéine dans des os de souris, de rats et de bœufs (422).

La structure du CaSR comporte trois domaines principaux : un domaine extracellulaire N-terminal, un domaine transmembranaire comportant sept segments et caractéristique de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, et un domaine intracellulaire.

Il existe aujourd'hui une accumulation de preuves de l'implication de ce récepteur dans les réponses des ostéoblastes face aux variations des concentrations ioniques de leur environnement (423 , 424). Le CaSR module la prolifération, la différenciation et la minéralisation dans les ostéoblastes murins et humains (425 , 426). Cependant, la capacité maintenue des ostéoblastes à détecter les cations chez des souris invalidées pour le CaSR suggère qu'une molécule autre que le CaSR pourrait être impliquée dans la détection du calcium (427). Il a ainsi été proposé que le récepteur orphelin, GPRC6A, identifié comme un nouveau membre de la famille des CaSR couplés aux protéines G, pourrait être impliqué dans ces mécanismes. Le GPRC6A est exprimée dans tous les tissus dont les os et les cellules de la calvaria de souris, ainsi que dans la lignée MC3T3-E1 (428). De plus, l'alignement de la séquence du GPRC6A avec celle du CaSR a indiqué une conservation des sites liant le calcium et les calcimimétiques tels que le Gd^{3+} (429). Une étude menée par Wellendorph *et al.* ne montre, quant à elle, aucun rôle de GPRC6A dans la physiologie normale de l'os (430). Cette équipe a généré une souris délétée totalement pour GPRC6A. Cette souris se développe normalement sans modification de la croissance osseuse, de l'histomorphologie ou du métabolisme osseux. Ces données pourraient indiquer une redondance de fonction entre ces différents récepteurs sensibles au calcium. L'absence d'un seul de ces membres pourrait être compensée par la surexpression d'un autre membre comme cela a d'ailleurs déjà été décrit pour de nombreux systèmes.

3.3 Homéostasie phosphocalcique

De nombreuses hormones participent à la régulation de la réabsorption tubulaire du phosphate: la vitamine D, l'hormone de croissance (GH), l'IGF-1, l'insuline, les hormones thyroïdiennes et la stanniocalcine stimulent la réabsorption rénale de phosphate alors que la PTH, la PTHrP, la calcitonine, les glucocorticoïdes, le glucagon, le facteur natriurétique atrial par exemple, diminuent la réabsorption rénale du phosphate. L'influence de l'apport alimentaire, des hormones calciotropes et des phosphatonines sera détaillée dans cette partie.

3.3.1 Influence de l'apport alimentaire

Lors d'une privation ponctuelle en phosphate, la filtration glomérulaire est augmentée grâce à une augmentation de la quantité du cotransporteur Npt2a au bout de quelques heures sans que son expression transcriptionnelle ne soit affectée (431 , 432). Le mécanisme d'un tel effet n'est pas clairement défini d'autant qu'un pool intracellulaire de cotransporteurs Npt2a n'a,

jusqu'à maintenant, pas été mis en évidence. En revanche, un régime chronique pauvre en phosphate conduit à une augmentation de l'activité des cotransporteurs de type II, du taux d'ARNm du fait de leur stabilisation, ainsi que de la quantité de protéines (433 , 434).

Au niveau de l'intestin, un régime chronique pauvre en phosphate conduit à l'activation de la 1α -hydroxylase dans le rein, ce qui entraîne une augmentation de la concentration de vitamine D, ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur à la vitamine D (VDR) dans les entérocytes, ce qui favorise l'absorption de calcium et de phosphate. Des expériences effectuées chez des souris VDR^{-/-} et 1α -hydroxylase^{-/-} ont montré qu'une alimentation pauvre en phosphate induit une augmentation de la quantité de Npt2b de manière indépendante de la vitamine D et du VDR (435). Par ailleurs, en conditions normales, l'absorption de calcium et l'hypophosphatémie inhibent la sécrétion de PTH, ce qui augmente la filtration rénale et l'excrétion urinaire de calcium (436). Le résultat final est donc un réajustement de la phosphatémie sans changement de la calcémie.

Au niveau osseux, des études menées chez des rats thyroïdectomisés soumis à un régime pauvre en phosphate, et présentant donc une hypophosphatémie ont montré que ces animaux présentaient des défauts de minéralisation osseuse et une concentration plasmatique de calcium augmentée (437). Ces effets seraient dus à une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes, c'est-à-dire à une augmentation de la résorption osseuse. Il a été suggéré que cette stimulation de la résorption osseuse en réponse à une hypophosphatémie serait un mécanisme d'adaptation destiné à maintenir l'homéostasie phosphocalcique au détriment du squelette (437). Des études réalisées chez des personnes hypophosphatémiques présentent des résultats similaires (438). Cependant, d'autres études ont montré chez les souris carencées en Pi et chez les souris *hyp* qui sont hypophosphatémiques, que le nombre d'ostéoclastes était diminué, et qu'ainsi la résorption osseuse était réduite (439). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de départager ces résultats contradictoires.

Des carences en phosphate peuvent également toucher d'autres organes tels que le cerveau ou les poumons et seront détaillées dans la dernière partie de l'introduction (IV).

Une alimentation riche en phosphate conduit à une excrétion rénale de phosphate suite à une internalisation des cotransporteurs Npt2a et Npt2c (440). De plus, un apport élevé en Pi entraîne une stimulation de la PTH (441). Cette stimulation de la PTH mène à une diminution de la réabsorption tubulaire et à un réajustement de la phosphatémie. Dans certains cas, une ingestion excessive de phosphate peut conduire à un hyperparathyroïdisme secondaire mais les mécanismes provoquant la survenue de cette pathologie restent à être élucidés (442 , 443).

Au niveau osseux, un régime riche en phosphate augmente le remodelage osseux et diminue les propriétés mécaniques de l'os (444).

Une déplétion calcique augmente la production de la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$, soit par stimulation directe sur la 1α -hydroxylase, soit par le biais de la PTH, et ainsi augmente l'absorption du calcium via son transport actif (445). De plus, une déplétion calcique peut également diminuer l'expression du VDR dans le rein, entraînant ainsi un effet moindre d'inhibition de la vitamine D sur sa propre synthèse (446).

L'hypercalcémie ou un régime riche en calcium diminuent la production de la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ par stimulation directe sur la 1α -hydroxylase ou par le biais de la PTH (445).

3.3.2 Les hormones calciotropes

La PTH et la vitamine D sont deux facteurs majeurs de la régulation de l'homéostasie phosphocalcique. Leurs actions au niveau de leurs organes cibles sont détaillées dans les figures 16 et 17.

3.3.2.1 Hormone parathyroïdienne (PTH)

La PTH est une hormone polypeptidique de 84 acides aminés. Le gène de la PTH code pour la pré-pro-PTH de 115 acides aminés, clivée en pro-PTH de 90 acides aminés, puis en PTH qui est la forme sécrétée, et biologiquement active. La PTH est synthétisée par les cellules parathyroïdiennes en réponse à une diminution de calcium ionisé dans le sang. La PTH peut être entièrement dégradée par un catabolisme rénal ou hépatique, ou clivée en un fragment N et un fragment C terminal selon la concentration extracellulaire de calcium (447). Le fragment N terminal est responsable de l'activation du récepteur PTH/PTHrP localisé dans les organes cibles. Ce récepteur, le PTH1R, est un récepteur à protéine G qui lorsqu'il lie son ligand, active la voie PKC ou PKA. En ce qui concerne la fraction C terminale, son rôle est inconnu bien qu'il semble qu'elle possède son propre récepteur (448).

Les tissus cibles de la PTH sont l'os et le rein et de manière indirecte l'intestin (Figure 16).

Au niveau du rein, la PTH augmente l'excrétion de phosphate en inhibant la réabsorption tubulaire de phosphate. Ce mécanisme impliquerait l'internalisation suivie de la dégradation lysosomale du cotransporteur Npt2a (449). Par ailleurs, il a été montré sur des cultures de

cellules rénales humaines embryonnaires que seul le transporteur PiT-1 était exprimé et que son expression est réduite en réponse à la PTH (450).

La PTH agit de manière indirecte sur l'intestin. Elle favorise une augmentation de l'absorption intestinale de calcium et de phosphate en augmentant la synthèse de la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ dans le rein (451).

Les effets de la PTH sur l'os sont complexes, elle peut agir à la fois comme un agent anabolique et un agent catabolique. Les effets anaboliques de la PTH sur l'augmentation du recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, ainsi que la réduction de leur apoptose, ont été longuement investigués. Il a été montré *in vitro* que des doses intermittentes de PTH favorisaient la différenciation des ostéoblastes tandis que des doses continues l'inhibaient (452). Il a également été montré *in vivo* et *in vitro* que de la PTH administrée de façon intermittente inhibait l'apoptose des ostéoblastes (453). Par ailleurs, il semblerait que l'action de la PTH ne se limite pas aux seuls ostéoblastes mais s'étendent également aux cellules bordantes ou aux ostéocytes. Ainsi, un traitement intermittent de PTH permet aux cellules bordantes de retrouver un phénotype d'ostéoblastes actifs et de synthétiser de l'os *de novo* tandis que les ostéocytes réduisent leur synthèse de sclérostine, qui est un inhibiteur de l'activité des ostéoblastes et maintiendrait les cellules bordantes dans un état quiescent (418). Les mécanismes concernant les effets cataboliques d'une dose continue de PTH sont moins connus. Certaines études suggèrent qu'un traitement continu par la PTH résulterait en une augmentation de l'expression de RANKL et par conséquent induirait une ostéoclastogenèse en culture (454).

La régulation du taux de PTH est dépendante de l'activité du CaSR présent au niveau des glandes parathyroïdiennes. Ainsi, une augmentation de la concentration de calcium extracellulaire entraîne une diminution de la sécrétion de la PTH alors qu'une diminution de la concentration calcique extracellulaire provoque l'effet inverse (455). Des travaux récents suggèrent que l'hyperphosphorémie pourrait augmenter la synthèse et la sécrétion de PTH, mais le mécanisme est mal défini (455). Enfin, la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ inhibe la production de la PTH.

3.3.2.2 $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$

La $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ ou calcitriol est le principal métabolite actif de la vitamine D. Sa fonction essentielle est le contrôle de l'homéostasie calcique et du métabolisme osseux, mais elle

intervient également dans le métabolisme musculaire et possède de nombreuses fonctions dans les systèmes endocrines et immunitaires (456).

Le terme de vitamine D regroupe de nombreux composés distincts, dont les principaux sont la vitamine D₂, présente dans les aliments d'origine végétale et la vitamine D₃, qui est produite par la peau sous l'action des rayons ultraviolets et qui constitue la source principale de vitamine D de l'organisme.

Deux hydroxylations séquentielles sont nécessaires pour la synthèse de la vitamine D biologiquement active. Ces hydroxylations sont réalisées par la 25-hydroxylase dans le foie puis par la 1 α -hydroxylase dans le rein, et elles mènent à la formation de la 1,25 dihydroxyvitamine D₃ [1,25(OH)₂D₃] qui est la forme biologiquement active (457).

La [1,25(OH)₂D₃] agit principalement en se liant à son récepteur, le VDR, qui est un récepteur nucléaire. Ainsi, une fois le complexe ligand-récepteur formé, ce complexe migre vers le noyau où il va pouvoir moduler l'expression de nombreux gènes en se liant au niveau d'éléments de réponse spécifiques (VDRE : vitamin D responsive element) situés dans la région promotrice des gènes cibles (457). Cependant certaines actions de la [1,25(OH)₂D₃] sont rapides et passent par un récepteur membranaire sans avoir d'effet transcriptionnel (458). Le VDR est exprimé dans l'intestin, le rein et l'os qui sont les tissus cibles de la [1,25(OH)₂D₃] (Figure 16).

La [1,25(OH)₂D₃] est une hormone hypercalcémiante. Au niveau de l'intestin, elle permet une augmentation de l'absorption de calcium et de phosphate. Ainsi, elle agit d'une part sur l'entrée du calcium au niveau de la bordure en brosse des entérocytes et sur sa sortie au pôle basolatéral. Elle stimule également la transcription et l'activité de transporteurs actifs de calcium tels que les calbindines ou les pompes à calcium (458). Par ailleurs, un mécanisme plus rapide n'impliquant pas de régulation transcriptionnelle a été observé pour le transport intracellulaire de calcium (458).

Au niveau rénal, la réabsorption du calcium est augmentée par la [1,25(OH)₂D₃]. De plus, l'hypercalcémie qui s'ensuit conduit à une inhibition de la PTH, ce qui a pour conséquence une réabsorption tubulaire augmentée de phosphate (459).

Au niveau osseux, l'action de la [1,25(OH)₂D₃] est complexe. Ainsi lors d'un apport suffisant en calcium, la [1,25(OH)₂D₃] favorise la minéralisation de la bordure ostéoïde. A fortes doses, ou face à une hypocalcémie, la [1,25(OH)₂D₃] augmente la résorption osseuse en activant d'une part la différenciation des ostéoclastes et en stimulant la production de facteurs

d'activation des ostéoclastes tels que l'interleukine-1 ou -6 par les ostéoblastes d'autre part (460).

La 25-hydroxylase et la 1α -hydroxylase sont principalement régulées par la PTH et la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ elle-même. La PTH stimule l'activité de la 1α -hydroxylase sur la cellule rénale, alors que la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ inhibe cette enzyme (459).

Un défaut de vitamine D_3 est la cause d'une maladie appelée rachitisme chez l'enfant ou ostéomalacie chez l'adulte. Ces pathologies sont caractérisées par une hypophosphatémie, du fait d'un défaut d'absorption de phosphate. Les symptômes sont des malformations osseuses dues à une croissance rapide, des douleurs osseuses et des fractures. Des souris invalidées pour le VDR développent une hypophosphatémie conduisant à un rachitisme. Il a été suggéré que cette hypophosphatémie conduirait à un allongement de la zone d'hypertrophie au niveau de la plaque de croissance du fait d'une absence de mort par apoptose des chondrocytes hypertrophiques (459).

3.3.3 Les phosphatonines

Une phosphatonine est un facteur circulant ayant un effet phosphaturiant majeur qui empêche l'augmentation compensatoire de la vitamine D, et qui est indépendant de l'action de la PTH. Ce terme a été introduit pour décrire des facteurs alors inconnus ayant ces propriétés et rendant compte des phénotypes observés dans certaines hypophosphatémies héréditaires (rachitisme hypophosphatémique autosomal dominant (ADHR) et l'hypophosphatémie liée à l'X (XLH)) et acquises (l'ostéomalacie oncogénique (TIO)). Le premier facteur répondant à ces critères est FGF-23. Son identification a donné lieu à la découverte d'un réseau complexe de facteurs interagissant entre eux et définissant un système complet de régulation de la phosphatémie, indépendamment du calcium et de la PTH, mais pas de la vitamine D. Ces facteurs seront décrits dans ce paragraphe, bien que tous ne correspondent pas à la définition de phosphatonine. La figure 18 résume les interactions de chacune de ces protéines.

3.3.3.1 *Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) et Klotho*

Les effets hypophosphatémiques de FGF-23 ont été mis en évidence au cours de l'étude de deux pathologies humaines que sont l'ADHR et le TIO. Ces pathologies sont dues dans le cas de l'ADHR à une mutation de FGF-23 affectant son site de clivage et conduisant à une accumulation de la forme non clivée, active, dans le sang et dans le cas de la TIO à une

surexpression de FGF-23 par la tumeur. La concentration élevée de FGF-23 dans ces pathologies conduit à une phosphaturie et une inhibition de la réabsorption rénale de phosphate. Les effets hypophosphatémiques de FGF-23 sont exercés via plusieurs mécanismes (Figure 18). Dans le rein, le FGF-23 inhibe la réabsorption sodium-dépendante de phosphate par inhibition de l'adressage à la membrane apicale des cellules tubulaires proximales des cotransporteurs Npt2a et Npt2c (461). Il inhibe également l'activité de la 1α -hydroxylase (462). Au niveau de l'intestin, le FGF-23 réduit l'absorption du P_i alimentaire par une inhibition de l'activité de Npt2b (463). Par ailleurs, le FGF-23 semble réduire la minéralisation osseuse. En effet, des souris déficientes en FGF-23 présentent des calcifications ectopiques, un retard de croissance et une minéralisation osseuse défectueuse. Ces souris sont également caractérisées par une hyperphosphatémie résultant d'une augmentation de la réabsorption rénale de phosphate et une élévation de la concentration de $[1,25(OH)_2D_3]$ sérique du fait d'une expression et d'une activité augmentées de la 1α -hydroxylase (464). Inversement, des souris qui surexpriment le FGF-23, soit par administration de FGF-23 recombinant, soit par implantation de cellules qui surexpriment le FGF-23 (465), ou des souris transgéniques pour le FGF-23 (461) présentent une phosphaturie et une hypophosphatémie dues à une réabsorption rénale de phosphate réduite et un faible taux de $[1,25(OH)_2D_3]$ ainsi qu'un rachitisme ou une ostéomalacie.

Des études *in vitro* ont montré que le FGF-23 possède une faible affinité pour les récepteurs FGF (FGFR) (466). Des études récentes ont montré que le FGF-23 se lie à FGFR-1c, et cette liaison n'est possible que grâce à klotho, protéine à un segment membranaire, qui joue le rôle de cofacteur (467). Il a par ailleurs été montré que des souris déficientes pour klotho présentent un phénotype identique à celui des souris invalidées pour le FGF-23 (468). Bien que le FGF-23 soit exprimé et sécrété de manière prédominante par les ostéocytes (469) et que FGFR1c soit exprimé ubiquitairement, leur action est limitée au rein. Cette spécificité d'action est assurée par klotho qui est exprimé dans le rein. Cependant, il semblerait que certains organes, tel l'os, qui n'expriment pas klotho soient une cible du FGF-23, mais les mécanismes par lesquels ce dernier induirait ses actions ne sont pas clairement définis.

Plusieurs mécanismes ont été décrits comme pouvant réguler la concentration ou l'activité du FGF-23. Ainsi, il a été montré que le FGF-23 est inactivé suite à un clivage protéolytique conduisant à la génération de deux fragments inactifs (470). Il a également été montré que des souris présentant une mutation spontanée de *phex* (souris *Hyp*) ou pour la DMP-1 expriment le même phénotype que les souris surexprimant FGF-23, ce qui indique que *Phex* et DMP-1 contrebalancent l'action de FGF23. Certaines études prétendent que le clivage de FGF-23

serait réalisé par Phex, cependant ces données sont remises en cause aujourd'hui (469). Enfin, des études menées chez des volontaires sains ont permis de montrer qu'un régime riche en phosphate s'accompagnait d'une augmentation de la concentration de FGF-23 sérique tandis qu'une restriction des apports en phosphate diminuait la concentration de FGF-23 (471 , 472).

3.3.3.2 Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)

La MEPE, également connue sous le nom de OF45 (osteoblasts/osteocytes factor of 45 kDa) appartient à la famille des SIBLING, et est exclusivement exprimée par les ostéoblastes, les ostéocytes et les odontoblastes (473 , 474). La MEPE a été initialement isolée de tumeurs induisant des ostéomalacies (475). L'expression de cette protéine est maximale pendant la maturation de la matrice osseuse.

Plusieurs fonctions ont été attribuées à la MEPE (Figure 18). Elle jouerait d'une part un rôle dans l'inhibition de la minéralisation (476). Ainsi des souris déficientes pour la MEPE présentent une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoblastes, ce qui leur confère une densité osseuse plus importante (477). De plus, sur des cultures *ex vivo*, des ostéoblastes de souris invalidées pour la MEPE produisent plus de nodules minéralisés que les ostéoblastes de souris sauvages (477). Enfin la MEPE inhibe de manière dose-dépendante la minéralisation de cellules ostéoblastiques murines traitées à la BMP-2 *in vitro* (478). Par ailleurs, un rôle de la MEPE dans la régulation du Pi a été avancé. Ainsi, il a été montré que la MEPE inhibait de façon dose-dépendante l'entrée de Pi sodium-dépendante au niveau des cellules humaines des tubules proximaux, ainsi que sur une lignée de cellules humaines rénales (478). De plus, une injection de MEPE dans des souris conduit à une hypophosphatémie qui serait liée à une augmentation de l'excrétion de Pi suite à une accumulation de la fraction ASARM (acidic serine-aspartate-rich MEPE associated motif) dans le tubule proximal (478). En effet, il a été montré que les effets phosphaturique et d'inhibition de la minéralisation osseuse de la MEPE dépendent de son motif ASARM, qui est libéré lors du clivage de la MEPE par la cathepsine B.

Plusieurs facteurs régulent la fonction ou l'expression de la MEPE. Ainsi, la liaison de la MEPE à la protéine Phex semble la protéger du clivage protéolytique par la cathepsine B (479). De plus, des expériences menées *in vitro* ont montré que le FGF-23 diminuait l'expression de l'ARNm de la MEPE de manière dose-dépendante dans des cellules ostéoblastiques dérivées de moelle osseuse de rat, et ce via une déstabilisation de l'ARNm par un mécanisme dépendant des MAPK (480). De plus, des ostéoblastes humains traités par de la

BMP-2 ont une expression de la MEPE diminuée (481). Enfin, la $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ serait un régulateur de la MEPE. En effet, une injection de $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ supprime l'expression de la MEPE alors que chez des souris invalidées pour le VDR, une augmentation de l'expression de la MEPE est observée (482).

3.3.3.3 *Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1)*

La DMP-1, décrite dans le chapitre précédent, est exprimée dans les ostéoblastes, les ostéocytes et les odontoblastes, et appartient à la famille SIBLING. Cette protéine possède également le motif ASARM. La DMP-1 possède ainsi le même rôle que la MEPE dans l'homéostasie du phosphate. Des souris déficientes pour la DMP-1 présentent une hypophosphatémie et un développement squelettique anormal (483). Ces souris possèdent une concentration élevée de FGF-23 sérique, qui est expliquée par une régulation de l'expression de FGF-23 par la DMP-1 (482) (Figure 18).

3.3.3.4 *Secreted frizzled-related protein-4 (sFRP-4)*

La sFRP-4 a été initialement identifiée dans des cellules tumorales d'ostéomalacie oncogénique (484). Cette protéine est exprimée de manière ubiquitaire mais avec une prédominance dans les cellules osseuses.

Des investigations menées sur des cellules rénales *in vitro* montrent que la sFRP-4 inhibe l'entrée sodium-dépendante du Pi (Figure 18). De plus, des injections intraveineuses de sFRP-4 dans des souris saines causent une augmentation de Pi excrété associée à une hypophosphatémie, ce qui indique que la sFRP-4 inhibe la réabsorption rénale (484). Il semblerait que la sFRP-4 agisse par inhibition de la voie Wnt/ β -caténine comme l'indique la production accrue de β -caténine phosphorylée (484). Cependant, des modèles invalidés ou surexprimant la sFRP-4 sont nécessaires afin d'établir clairement le rôle de cette protéine dans l'homéostasie du phosphate.

3.3.3.5 *Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked (PHEX)*

Le gène PHEX code pour une protéine de 749 acides aminés, appartenant à la famille des métalloprotéases M13 (485 , 486). PHEX est surtout exprimée dans les ostéoblastes, les ostéocytes et les odontoblastes, cependant un grand nombre de tissus tels que le cerveau, les muscles, les glandes parathyroïdiennes, mais pas le rein, l'exprime également (487 , 488). Phex est une endopeptidase dont le rôle serait, comme les autres membres de la famille des M13, de cliver des petites hormones. Cependant, les substrats spécifiques de Phex demeurent à ce jour inconnus.

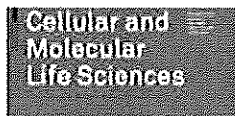
Bien qu'une mutation au niveau de Phex conduit chez l'homme à la XLH, où les patients présentent un rachitisme ou une ostéomalacie lié à une hypophosphatémie, Phex n'est pas considérée comme une phosphatonine. La séquence de Phex est très conservée parmi les différentes espèces et différentes mutations au niveau du gène de Phex conduisent à des homologues de la XLH chez la souris, incluant les souris *Hyp*, *Gy* et *Skal* (487 , 489 , 490). Ces souris sont caractérisées par une hypophosphatémie, une absence d'augmentation compensatoire de $[1,25(\text{OH})_2\text{D}_3]$ face à cette hypophosphatémie, un retard de croissance et des défauts de minéralisation osseuse (491). Par ailleurs, ces souris présentent une réduction de 50% de leur expression au niveau de l'ARNm et de la protéine de Npt2a au niveau des tubules proximaux (492 , 493), ainsi qu'une réduction de la quantité de Npt2c au niveau de la bordure en brosse des cellules rénales (494). De plus, dans les modèles de souris *hyp*, ainsi que chez des hommes présentant une mutation de Phex (495), une expression augmentée de FGF-23 dans l'os a été mise en évidence. Ces résultats suggèrent que Phex régule l'expression de FGF-23 (469) ou qu'il cliverait le FGF-23, le rendant ainsi inactif. De nombreuses données existent sur ce sujet et sont contradictoires, c'est pourquoi des études futures sont nécessaires pour mieux comprendre ces mécanismes. De plus, dans des cultures d'ostéoblastes primaires provenant de souris déficientes pour Phex, une dégradation de la MEPE a été mise en évidence, ce qui suggère que Phex aurait un rôle protecteur de la dégradation de la MEPE et de la DMP-1 par la cathepsine B (496) (Figure 18). De plus, d'autres études ont montré que le fragment ASARM, possédant un pouvoir d'inhibition de la minéralisation par son affinité pour l'apatite biologique, pouvait être dégradé par Phex (497). Ces données expliquent donc le phénotype hypophosphatémique observé chez les patients atteints d'XLH ou chez les homologues murins.

IV. EFFETS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DU PI

Le Pi, comme nous l'avons vu, doit avoir sa concentration finement régulée car il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires. De plus, il est aujourd'hui reconnu comme étant une molécule de signalisation importante qui permet la régulation de l'expression de nombreux gènes dans différents types cellulaires (498). Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans les effets du Pi restent encore à être élucidés bien que certaines données soient déjà disponibles. L'implication des ions calcium dans les effets du Pi, ainsi que les effets potentiels des cristaux de phosphate de calcium dans la régulation de l'expression des gènes seront décrits dans cette partie.

4.1 Article 1: The emergence of phosphate as a specific signaling molecule

Après une brève description de l'homéostasie du Pi, cet article s'attache à décrire les connaissances actuelles sur le phosphate en tant que molécule de signalisation dans différents tissus et en particulier dans l'os et le cartilage. De plus, des données récentes présentées dans cet article viennent renforcer l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme sensible au Pi dans différents organes. Un tel système serait capable de détecter des variations de concentration locale ou systémique de Pi et d'en informer les organes ou les cellules. Enfin cette revue discute des différentes voies de signalisation, facteurs de transcription et transporteurs de phosphate impliqués dans les effets du phosphate.



The emergence of phosphate as a specific signaling molecule

Journal:	<i>Cellular and Molecular Life Sciences</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Unsolicited Review
Key Words:	phosphate sensing, phosphate homeostasis, signalling, bone mineralization, slc20a1, slc20a2

1
2 **The emergence of phosphate as a specific signaling molecule**
3
4

5
6 Solmaz Khoshniat^{1,2}, Annabelle Bourguine^{1,2}, Marion Julien^{1,2}, Pierre Weiss^{1,2}, Jérôme Guicheux^{1,2*}, Laurent
7
8 Beck^{3,4*#}
9

10
11 ¹INSERM, U791, Centre for Osteoarticular and Dental Tissue Engineering (LIOAD), Group STEP "Skeletal
12
13 Tissue Engineering and Physiopathology", Nantes, F-44042 France

14
15 ²Pres UNAM, UFR Odontologie, Nantes, F-44042 France

16
17 ³INSERM, U845, Growth and Signalling Research Center, Paris, F-75015 France

18
19 ⁴Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, F-75015 France.
20
21

22
23 *both authors contributed equally to this work
24
25

26
27 Running title : Signalling through phosphate
28
29
30
31
32
33
34
35

36
37 # Address correspondence to:
38

39 Laurent Beck, PhD

40
41 Centre de Recherche INSERM U845

42
43 Université Paris Descartes

44
45 Faculté de Médecine

46
47 156 Rue de Vaugirard

48
49 75015 Paris, France

50
51 Phone: +33140615491

52
53 Fax: +33143060443

54
55 E-mail: laurent.beck@inserm.fr
56
57
58
59
60

Abstract

Although considerable advances in our understanding of the mechanisms of phosphate homeostasis and skeleton mineralization have been made over the past decade, very little is known about the initial events involving the detection of changes in the phosphate serum concentrations and the subsequent downstream regulation cascade. Recent data has strengthened a long established hypothesis that a phosphate-sensing mechanism may be present in various organs. Such a phosphate sensor would detect changes in serum or local phosphate concentration and would inform the body, the local environment, or the individual cell. This suggests a model in which phosphate in itself represents a signal capable of regulating multiple factors necessary for diverse biological processes. This review summarizes recent findings that support phosphate as an emerging signaling molecule, in particular in bone and cartilage, but also in other tissues. The involvement of various signaling pathways, transcription factors and phosphate transporters/sensors is discussed.

Keywords

Phosphate sensing, phosphate homeostasis, bone mineralization, signaling, SLC20a1, SLC20a2

Abbreviations

$1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$); alkaline phosphatase (ALP); inorganic phosphate (Pi); insulin Growth Factor-1 (IGF-1); end-stage renal disease (ESRD); fibroblast growth factor 7 (FGF-7); fibroblast growth factor 23 (FGF-23); human aortic smooth muscle cell (HSMC); matrix gla protein (MGP); parathyroid hormone (PTH); phosphonoformic acid (PFA);,; receptor activator of nuclear factor kappa B (NF- κ B) (RANK) ligand (RANKL); vascular smooth muscle cell (VSMC)

Introduction

Phosphorus is the second most abundant mineral in the human body and plays a critical role in vital processes. In body fluids, phosphorus is present mainly as inorganic phosphate (Pi) in the form of H_2PO_4^- / HPO_4^{2-} with a 1:4 ratio at physiological pH values. In cells and tissues, it is found in a variety of organic substances including sugars, phosphoproteins, phospholipids and nucleic acids. Approximately 85% of phosphorus is in bone, and is primarily complexed with calcium (Ca^{2+}) in hydroxyapatite crystals deposited onto the collagen matrix [1]. The remainder is in soft tissue with only about 1% in extracellular fluids [2]. Hence, phosphorus has structural roles in phospholipids of cell membranes, nucleoproteins and nucleic acids [3, 4] and is essential for bone mineralization [1]. Moreover, Pi is central to the storage and liberation of metabolic energy, cellular signaling, enzyme activity, lipid metabolism, muscle and neurological functions and the delivery of oxygen to the peripheral tissues [2, 5-10]. Prolonged deficiency of Pi results in hypophosphatemia along with serious biological consequences, including impaired mineralization of bone resulting in osteomalacia or rickets; central nervous system dysfunction; increased erythrocyte membrane rigidity, abnormal leukocyte and platelet function; rhabdomyolysis and muscle weakness; and cardiac dysfunction and respiratory failure [11-15]. On the other hand, hyperphosphatemia is now known to decrease life expectancy and lead to seizures, cardiac dysrhythmias, muscle weakness and tetany, decreased visual acuity, soft tissue calcification, renal failure and eventually death [16-21]. Therefore, controlling the serum Pi concentration is critical for the well-being of the organism.

The normal range of serum Pi changes from the neonatal period through adolescence to reach adult values towards the end of puberty (Table 1). Pi concentrations are highest in the neonatal period (1.88-2.4 mM), but fall rapidly in the first months of life and then more slowly to reach childhood levels (1.45-1.80 mM). The concentrations then remain fairly constant until adolescence, when they fall to adult values (0.85-1.44 mM) [ref [22] and Table 1]. A normal Pi serum value is the result of a properly controlled absorption, reabsorption and bodily Pi consumption. Absorption of Pi occurs primarily in the ileum, whereas Pi reabsorption occurs in the kidney, principally along the proximal convoluted tubules [23]. In states of neutral Pi balance, the amount of Pi absorbed in the intestine (approximately 0.8-1.5 g per 24 h) is equivalent to the amount excreted in the urine, reflecting that serum Pi homeostasis is maintained primarily through the control of renal Pi reabsorption.

The regulation of Pi homeostasis is classically described as a complex process involving the interplay between parathyroid hormone (PTH) and the vitamin D endocrine system. Whereas $1\alpha,25-$

1
2 dihydroxyvitamin D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) increases the efficiency of Pi absorption in the intestine [24-26], PTH
3
4 decreases the efficiency of renal Pi reabsorption [27-29], and recent advances have shed new light on the
5
6 mechanisms that specifically control Pi balance. Through the study of inherited hypophosphatemic rickets,
7
8 the existence of novel Pi regulatory pathways that are independent of the classic calcium regulation
9
10 mechanisms have been revealed [22, 30, 31]. A group of factors, collectively termed "phosphatonins", have
11
12 emerged as major regulators of Pi homeostasis and suggest the existence of an elaborate network of
13
14 humoral interactions and feedback loops involving intestine, kidney, parathyroid gland, and bone (Figure 1).
15
16 The term "phosphatonin" describes several factors including fibroblast growth factor 23 (FGF-23), secreted
17
18 frizzled-related protein 4, dentin matrix protein 1 and matrix extracellular glycoprotein. Although still under
19
20 debate, fibroblast growth factor 7 (FGF-7) may also correspond to the definition of phosphatonin, since FGF-
21
22 7 is over-expressed in tumors associated with Pi wasting and osteomalacia, and inhibits sodium-dependent
23
24 Pi transport in OK cells [32]. In addition, FGF-7 inhibits renal Pi reabsorption *in vivo*, is present in normal
25
26 plasma and is significantly increased in patients with renal failure [14]. The identification of klotho, a
27
28 transmembrane molecule expressed in the kidney acting as a co-factor to convert canonical FGF receptors
29
30 into specific receptors for FGF23 [33], further exemplifies the importance of the bone-kidney axis in the
31
32 control of Pi homeostasis. The reader can refer to numerous recent reviews concerning these various factors
33
34 and their role in controlling Pi homeostasis [14, 30, 34-36].

35
36 Although considerable progress has been made in our understanding of Pi homeostasis and the
37
38 pathogenesis of various forms of hypophosphatemic rickets, there are still many gaps in our knowledge.
39
40 Particularly, a necessary first step in the regulation of Pi homeostasis is the ability of a cell or an organism to
41
42 detect changes in Pi concentrations in its environment. This would imply the existence of a Pi-sensing
43
44 mechanism able to detect changes in the concentration of Pi. While the existence of such a mechanism still
45
46 lacks evidence in mammals, a number of recent observations suggest that Pi may act as a signaling
47
48 molecule able to modulate diverse cellular functions. This review focuses on the role of Pi as a signaling
49
50 molecule at both the cellular and whole-body level. Its role in bone and cartilage will be highlighted and
51
52 questions regarding its action mechanisms will be discussed.

53 54 55 56 57 58 **Mammalian phosphate transporters**

59
60 Because a cell's interior is electronegative relative to the exterior, the movement of Pi into the cell does not
occur by simple diffusion. In mammals Na^+ -coupled Pi cotransporters mediate the transport of Pi across cell

1 membranes [23, 37]. Currently, identified Na^+ -Pi cotransporters in mammals have been grouped into three
2 dissimilar families, based on their amino acid sequence and structural similarity [38, 39]. These families differ
3 not only by their affinities for Pi, but also by their tissue distribution, physiological regulations and roles.
4 Whilst they are often referred to in the literature as "type I, II and III" Na^+ -Pi cotransporters, a numbering
5 system based on the chronological identification of their Pi transport activity, it must be noted that all these
6 transporters are multi-spanning membrane proteins and are therefore classified as type III integral
7 membrane proteins according to the classification of membrane proteins proposed by Singer in 1990 [40-42].
8 The human gene nomenclature database (<http://www.genenames.org/>) has assigned these transporters to
9 the solute carrier series SLC17, SLC34, and SLC20. Hence, the first identified (*i.e.* "type I") membrane
10 protein bearing a Na^+ -Pi cotransport activity belongs to the SLC17 series and is known as NPT1; the second
11 identified (*i.e.* "type II") Na^+ -Pi cotransporter belongs to the SLC34 series and is known as NPT2; and the last
12 identified (*i.e.* "type III") mammalian Na^+ -Pi cotransporter belongs to the SLC20 series and is known as PiT
13 (Figure 2).

14 Although the SLC17 transporters display Pi uptake capacity [43], they also transport other anions
15 and molecules [44-48] and their physiological roles remain to be fully established [49, 50]. The SLC34
16 transporters include NPT2a, NPT2b and NPT2c. Npt2a (SLC34A1) is primarily located at the brush border of
17 proximal tubular epithelial cells, is recognized as the main transporter responsible for the renal reabsorption
18 of Pi, and is a target for most humoral factors regulating Pi homeostasis [39, 51, 52]. Npt2b (SLC34A2) is
19 expressed broadly and has recently been shown to be the main transporter for intestinal Pi absorption [53,
20 54]. Npt2c (SLC34A3) is localized in the same cells as Npt2a, and is not expressed in bone [55]. Its role is
21 still unclear and it has been suggested it plays a role during growth [56]. Recently, the Miyamoto group
22 showed that Npt2c has important physiological roles in Pi and Ca homeostasis by modulating the vitamin
23 D/fibroblast growth factor 23 axis, but also in bone mineralization [55, 57]. The SLC20 family of transporters
24 includes PiT1 (SLC20A1) and PiT2 (SLC20A2) [58]. These widely expressed proteins were originally
25 described as retroviral receptors, hence were named Givr-1 and Ram-1 [59, 60], and were later shown to be
26 Na^+ -Pi cotransporters [61]. According to their physiological function, they were renamed after their
27 prokaryotic paralogs: PiT1 for Givr-1 and PiT2 for Ram-1. The possible physiological roles of PiT1 and PiT2
28 have been recently reviewed [58, 62]. Of importance for the present article, it should be noted that PiT1 may
29 have important roles in vascular and bone physiology [63, 64], whereas PiT2 may play a role in Pi
30 reabsorption [65].

Phosphate and skeletal tissues

1
2 During skeletal growth and bone remodeling, calcium and Pi are required for the formation of biological
3 apatites. The rate at which mineralization occurs is dependent, in part, on the local availability of Pi and
4 calcium [1, 66]. In the absence of these ions, or in case of abnormal absorption or reabsorption,
5 mineralization is impaired, resulting in the formation of poorly mineralized bone that is characteristic of
6 osteomalacia or rickets [67]. However, increasing evidence indicates that Pi is also required in events other
7 than mineralization, proposing Pi itself as a signaling molecule capable of modulating multiple cellular
8 functions in bone [68].
9
10
11
12
13
14
15
16
17

18 *Pi modulates osteoblastic proliferation*

19
20 Several studies have recently implicated Pi as an important molecule capable of modulating osteoblastic
21 proliferation. Naviglio et al. reported that Pi treatment of human osteosarcoma U2OS cells resulted in a
22 decrease in both intracellular cAMP levels and adenylate cyclase activity, and in cell growth inhibition [69].
23 The use of pharmacological agents that maintain a high level of cAMP, such as forskolin, prevented the cell
24 growth inhibition in response to Pi. A large scale quantitative proteomic investigation conducted in MC3T3-
25 E1 cells, a model of preosteoblastic cells often used for studying osteoblast differentiation and activity [70],
26 showed that a 24-hour Pi treatment modulates the expression levels of a large set of proteins [68]. A
27 pathway/function analysis of these proteins revealed wide-ranging effects from transcriptional regulators to
28 signal transduction molecules. Several upregulated proteins in response to Pi were found to be involved in
29 the regulation of cell cycle, proliferation and DNA synthesis [68]. Flow cytometric analysis of MC3T3-E1 cells
30 showed that the number of cells in the S-phase increased in response to Pi treatment, suggesting an
31 increase in the proliferation in response to Pi [68, 71, 72]. Moreover, Kanatani et al. have recently shown that
32 an increase in extracellular Pi from 2 to 4mM dose-dependently stimulated DNA synthesis in MC3T3-E1 cells
33 [73]. By using an Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) antiserum or a neutralizing IGF-1 antibody, these
34 investigators inhibited partially but significantly the Pi-induced proliferation. This suggested that Pi can
35 modulate osteoblastic proliferation at least in part via IGF-1, which is known as one of the main growth
36 factors involved in osteoblastic cell proliferation [74]. However, the interaction with the IGF-1 signaling
37 pathway may not be restricted to Pi since calcium was also shown to stimulate osteoblastic proliferation in
38 relation to IGF-1 status [75], although IGF-1-independent effects of calcium on DNA synthesis were also
39 described [76].
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Pi modulates osteoblastic differentiation and activity

1
2 Pi has also been shown to play a role in osteoblastic cell differentiation and activity. These are complex
3
4 processes that involve the temporally-regulated expression of multiple markers. During the early osteoblastic
5
6 differentiation, the expression level of alkaline phosphatase (ALP) increases. In the presence of organic
7
8 phosphates such as β -glycerophosphate, ALP contributes to the local synthesis of phosphate, thus leading
9
10 to an increased Pi concentration in the extracellular environment [66]. The potential role of Pi as a signaling
11
12 molecule during the course of osteoblast differentiation was first suggested by Beck et al. [77]. They showed
13
14 that a decrease in extracellular Pi formation due to the inhibition of ALP activity correlated with a decrease in
15
16 osteopontin expression, a molecule involved in the regulation of mineralization [77]. Later on, they showed
17
18 that osteopontin expression was strongly induced in direct response to increased Pi levels in the culture
19
20 medium [78]. The authors speculated that the physiological significance of the regulation of osteopontin
21
22 expression by Pi generated via ALP was to prevent the induction of an excessive mineralization before
23
24 osteoblasts cease proliferation [78]. Once mineralized, osteoblasts may become osteocytes or bonding cells
25
26 or die by apoptosis. The work of Adams and colleagues has linked extracellular Pi to a decrease in the
27
28 mitochondrial membrane permeability leading to the apoptosis of osteoblasts [79]. It should be noted
29
30 however that osteoblasts are much less sensitive to Pi-induced apoptosis than chondrocytes, and that
31
32 calcium is required during this process [79, 80]. In a recent study conducted in the murine odontoblast-like
33
34 cell line MO6-G3 we showed an up-regulation of PIT1 and PIT2 expressions by high extracellular Pi
35
36 concentrations, which correlated with ERK1/2 phosphorylation and calcium/phosphate crystal formation [81].
37
38 Although more detailed studies are necessary, our observations support the idea that crystal formation more
39
40 than Pi itself may be required for the increase in ERK phosphorylation and PIT1 and PIT2 expression [81]. In
41
42 line with this work, we recently obtained similar data in mouse primary osteoblasts and MC3T3-E1 cells
43
44 where the Pi stimulation of MGP expression *via* the ERK1/2 pathway [82] correlated with the presence of
45
46 calcium in the medium and could be abolished by the use of crystal formation inhibitors (Khoshniat *et al.*,
47
48 unpublished observation).

51 *Pi modulates bone resorption*

52
53 Bone resorption is due to the resorbing activity of specialized cells called osteoclasts [83]. Osteoclast
54
55 precursors come from hematopoietic cells and need to couple with osteoblasts in order to differentiate into
56
57 mature resorbing osteoclasts. Thus, the receptor activator of nuclear factor kappa B (NF- κ B) (RANK) ligand
58
59 (RANKL) at the surface of osteoblasts interacts with RANK at the surface of osteoclasts and allows the
60

1
2 differentiation into mature osteoclasts [84-87], while osteoprotegerin is a molecule that inhibits osteoclast
3 differentiation by binding to RANKL and preventing the RANK-RANKL interaction [85, 88].
4

5
6 Pi depletion is well known to stimulate osteoclastic bone resorption [89-91] while increased Pi inhibits
7 both osteoclast differentiation and the bone resorption process [92]. The effect of an increase in Pi
8 concentration has recently been studied in a culture of bone marrow cells. These data show that high
9 extracellular Pi concentrations inhibit both the osteoclast differentiation and the osteoclast bone resorbing
10 activity [93]. Furthermore, it has been shown that Pi inhibits the differentiation of osteoclastic precursors by
11 stimulating osteoprotegerin expression in osteoblastic cells, and that extracellular Pi inhibits osteoclastic
12 activity at least in part by the direct induction of osteoclasts apoptosis [93]. These findings were confirmed
13 and expanded by Mozar et al. in a recent study where they showed that increased extracellular Pi
14 concentration inhibited both osteoclastic differentiation and bone resorption activity induced by RANKL. Pi
15 was found to inhibit the RANKL-induced JNK and Akt activation, while RANKL-induced p38 and ERK 1/2
16 phosphorylation were not affected [94].
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 *Pi modulates chondrocyte differentiation*

31
32 Early studies suggested a possible role of Pi in modulating chondrocyte differentiation. Using an organ
33 culture technique as a model, Bingham et al. showed in 1974 that bone shaft growth and mineralization from
34 rat fetuses increase with a Pi treatment from 1.5 to 4.5 mM [95]. Such concentrations of Pi lead to crystal
35 formation by precipitation. However, using a low-calcium medium, they showed that growth and
36 mineralization were still impaired [95]. Along the same line of evidence, a study from Kakuta et al. supports
37 the view that metabolic regulation of the Pi pool size may be a rate-limiting factor in the mineralization of
38 cartilage. These investigators analyzed sections of epiphyseal growth cartilage which revealed that very low
39 levels of Pi are present in pre-mineralized cartilage. At the mineralization front, however, a large increase in
40 Pi is correlated with mineral formation together with a decrease in the concentration of low molecular weight
41 compounds that could provide the initial source of Pi for the development of mineral [96]. In a more recent
42 study, Wang et al. examined the potential role of Pi and calcium in the regulatory pathways that mediate
43 chondrogenesis and cartilage maturation, using the CFK2 cells as a chondrocytic model [97]. They showed
44 that the response to external Pi induced a rapid up-regulation of PiT1 protein expression at the plasma
45 membrane, associated with an increase in Pi transport. However, this effect was temporally restricted to an
46 early stage of CFK2 differentiation, suggesting that extracellular Pi plays a role in the commitment of
47 chondrogenic cells to differentiation [97]. The effect of Pi on the maturation of chondrocytes was also shown
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 by the suppression of type II collagen and PTH receptor expression, and acceleration of type X collagen
3 expression in the ATDC5 cell line, a model of growth plate chondrocytes [98, 99]. Additional data obtained in
4 osteoarthritic cartilage showed that IL-8 promotes hypertrophic terminal chondrocyte differentiation by
5 modulating chondrocyte PIT1 expression and sodium-dependent Pi uptake [100]. These results demonstrate
6 that Pi can play a role in the early and late differentiation of chondrocytes, by stimulating the expression of
7 various chondrocytic markers. The exact molecular mechanisms involved in these effects have not yet been
8 deciphered and need further investigation.
9

10
11 The terminal differentiation of growth plate chondrocytes involves a hypertrophic conversion
12 associated with matrix mineralization and ultimately on their apoptosis [101]. During the calcification process,
13 chondrocytes experience high levels of extracellular Pi [102]. Several studies have shown that exposing
14 chondrocytes to a high level of Pi leads to their terminal maturation and subsequent matrix mineralization
15 [99, 100, 103-106]. The role of Pi in these processes is highlighted by the mineralization defects that could
16 be observed in the case of inherited hypophosphatemias [107]. Finally, the work of Mansfield et al. has
17 linked the elevation in environmental Pi concentration and the concomitant rise in intracellular Pi levels to
18 rapid chondrocytic death through the apoptotic pathway [105]. This effect of Pi is increased in the presence
19 of calcium [108].
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Phosphate and extraskeletal tissues**

39
40
41 The ability of Pi to alter gene expression or cell function is not restricted to bone-forming cells. Regulation of
42 osteopontin expression by Pi has been demonstrated in NIH3T3 fibroblasts as well [78], cells that do not
43 retain an ability to differentiate into osteoblast-like cells, showing that the regulation of osteopontin by
44 phosphate is not restricted to cells in the osteoblast lineage.
45
46
47
48

49
50 Pi has been linked to the regulation of Cbfa-1 and osteocalcin in human vascular smooth muscle
51 cells [109, 110]. When cultured in media containing normal physiological levels of Pi (1.4 mM), human aortic
52 smooth muscle cell (HSMC) grew in monolayers and did not mineralize. In contrast, HSMC cultured in media
53 containing Pi levels comparable to those seen in hyperphosphatemic individuals (>1.4 mM), showed dose-
54 dependent increases in cell culture calcium deposition. High Pi also enhanced the expression of osteocalcin
55 and Cbfa-1. The effects of high Pi were suggested to be mediated by PIT1. This data suggests that high Pi
56 may directly stimulate HSMC to undergo phenotypic changes that predispose to calcification and may help
57 explain the phenomenon of human metastatic calcification under hyperphosphatemic conditions.
58
59
60

1
2 Phosphate has been shown to regulate the SLC34 Na⁺-Pi cotransporter in the murine kidney [111,
3
4 112]. Kido et al. showed that feeding mice with a low-Pi diet for 4 days led to a 2-fold increase in *Npt2a*
5 mRNA abundance. They identified and characterized a DNA sequence responsible for the Pi response,
6 designated as a phosphate response element in the *Npt2a* gene. This response element shares a region
7 with 9 of 10 bp identity to yeast phosphate-responsive transcription factor Pho4 binding element. At the
8 center of this region is a CACGTG motif sufficient to confer the transactivation by dietary Pi deprivation. The
9 authors have also identified the mouse transcription factor mE3 (TFE3), with structural features very similar
10 to those of Pho4, that is up-regulated by low Pi diet. These results emphasize the role of Pi as a direct
11 regulator of gene transcription.
12
13

14
15 The group of Cho has published a series of papers during the past 5 years describing the effect of
16 high or low dietary Pi on the growth of diverse organs, including brain [113, 114], liver [115] and lungs [116-
17 119]. Their studies clearly show that Pi alters the growth of these organs, most probably through the
18 Akt/mTOR pathway, as well as the Raf/MEK/ERK pathway. However, the precise mechanisms are still to be
19 clarified since both high and low Pi diets act similarly on both of these pathways. Moreover, the Pi
20 transporters that may be involved in this process are not clearly identified since for example, either *Npt2a*
21 [116] or *Npt2b* [117-119] have been implicated in the same organ, and that SLC20 transporters were not
22 investigated.
23
24

25
26 Finally, changes in extracellular Pi (and intracellular Pi) were thought to be responsible for the
27 increased survival of cultured fetal rat cortical neurons after an excitotoxic or oxidative insult [120]. Pi was
28 also implicated as a triggering signal for PTH induction and secretion in parathyroid tissue *in vivo* and *in vitro*
29 [121-123].
30
31
32
33
34

35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 **Phosphate as a signaling molecule: mechanistic issues** 48 49

50
51 As the biological role of Pi as a signaling molecule is emerging, questions regarding its mechanism of action
52 have arisen. One of the first issues to address is whether any known signaling pathways are activated and if
53 there is the need for a nuclear response. Another critical aspect is whether or not Pi needs to be transported
54 into the cell to fulfill its signaling role. A close examination of the available data reveals that answering this
55 latter point is not straightforward. Moreover, in the event that Pi acts as an extracellular signal, the
56 requirement of membrane proteins capable of mediating the effects of Pi within the cell has to be
57 conceptualized.
58
59
60

1
2
3
4 *What are the signaling pathways involved?*

5
6 The specific intracellular signaling pathways activated by Pi are poorly elucidated. Beck et al. have found
7 that Pi selectively activates the extracellular signal regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway to mediate
8 its effect on osteopontin expression in MC3T3 cells [82, 124]. Increased extracellular Pi concentration
9 caused a rapid and biphasic phosphorylation of ERK1/2 but did not activate the other mitogen activated
10 protein kinase (MAPK) signaling proteins, p38 or the c-jun N-terminal kinase (JNK). Other pathways
11 including PI3-kinase, protein kinase A, and protein kinase G were not involved. These observations are in
12 agreement with a study demonstrating an increase in ERK1/2 phosphorylation, but not p38 or JNK, in
13 response to bisphosphonates that is further induced by the addition of 3 mM Pi [125]. In a recent study, we
14 obtained similar results and confirmed that Pi effect induces the specific activation of the ERK1/2 signaling
15 pathway in osteoblasts [82]. We have shown that this pathway is required for the effect of Pi on the
16 expression of matrix gla protein (MGP), a known inhibitor of calcification. We have also obtained similar
17 results in ATDC5 and primary chondrocytes. Most importantly we have shown that, as in osteoblasts, Pi
18 stimulates the ERK1/2 pathway in chondrocytes to mediate its effects on MGP expression, suggesting a
19 negative feedback loop for the control of mineralization induced by Pi in cartilage [126]. Although further
20 investigation is needed to fully understand the mechanisms by which an increased intracellular Pi might
21 regulate gene expression and ultimately cell function, this data collectively demonstrates that several specific
22 signaling pathways are involved in the effects of Pi in the regulation of gene expression.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 *Are transcription factors involved?*

43
44 Very little data is available on the transcription factors that might be involved in the gene regulation by
45 extracellular Pi, and most of the studies have been conducted in bone-forming cells. In osteoblastic MC3T3-
46 E1, chondrocytic ATDC5 and osteocytic MLO-Y4 cell lines, Runx2 was shown to be exported from the
47 nucleus to the cytoplasm in response to extracellular Pi, but its expression was not regulated at the mRNA
48 level by Pi treatment [127]. Accordingly, osteocalcin gene expression was repressed by the lack of Runx2 in
49 the nucleus after Pi treatment [127], which appears contradictory to the physiological expression of
50 osteocalcin occurring during MC3T3-E1 differentiation [72]. Runx2 was also suggested to mediate the effects
51 of Pi in an *in vitro* model of vascular calcification [109]. In this study, treatment with high level Pi enhanced
52 the expression of the osteoblastic differentiation markers osteocalcin and Runx2 by vascular smooth muscle
53 cells (VSMCs). The ability of Pi to regulate gene transcription and cellular function represents a potentially
54
55
56
57
58
59
60

1
2 novel extracellular signaling mechanism. Accordingly, Beck et al. have identified a discrete set of genes
3
4 increased by Pi in MC3T3-E1 cells including the transcription factor Nrf2 which was shown to be regulated at
5
6 the transcriptional level [72]. These authors further compared transcriptome and proteome datasets with the
7
8 goal of identifying a number of candidate proteins that are post-transcriptionally regulated by elevated Pi
9
10 [68]. From their data, Fra-1, a member of the AP-1 family of transcription factors, seems to be such a
11
12 candidate as it is not regulated at the mRNA level but its protein level increases in response to Pi. Moreover,
13
14 the use of inhibitors of transcription and translation did not affect the effects of Pi on Fra-1 expression thus
15
16 suggesting a post translational regulation of Fra-1 in response to Pi [68]. Accordingly, in a recent report, we
17
18 have observed that the regulation of MGP expression by Pi through the ERK1/2 signaling pathway involves
19
20 the stimulation of the DNA binding activity of Fra-1 to specific sequences in the MGP promoter [82].
21
22

23 *Does Pi have to enter the cell?*

24
25
26 It is commonly believed that Pi must enter the cell to affect cell functions, hence involving Pi transporters at
27
28 the plasma membrane. To investigate this issue, most studies have used phosphonoformic acid (PFA), a
29
30 well-known competitive inhibitor of the SLC34-mediated renal Pi transport [128]. However, the inhibition of
31
32 renal Pi transport by PFA is an exception, because PFA competitively inhibits SLC34-mediated Pi transport
33
34 via a direct interaction with the renal transporters [62, 128]. Contrary to general belief, recent reports clearly
35
36 demonstrated that PFA is a very poor inhibitor of Pi transport mediated by PIT1 and PIT2, both in oocytes
37
38 and in native rat vascular smooth muscle [129-131]. This observation has major consequences on the
39
40 interpretation of numerous studies which have speculated that PiT-mediated Pi transport was involved in the
41
42 observed mechanism. Indeed, in most studies, conclusions were based on the assumption that PFA would
43
44 inhibit SLC20 transporters, but not on actual Pi transport measurements. Consistently, Villa-Bellosta *et al.*
45
46 clearly showed that although PFA does inhibit Pi-induced VSMC calcification and that PIT1 and PIT2 are
47
48 indeed expressed in these cells, this is not due to a blockade of Pi transport into the cell [129]. Rather, they
49
50 elegantly showed that the effects of PFA are related to the structural similarity with pyrophosphate, an
51
52 inhibitor of calcification [132, 133], and to competition for the same binding site, implying that PFA is acting
53
54 not as an inhibitor of Pi transport, but as a inhibitor of mineralization [129]. Despite this observation, this
55
56 issue remains controversial [63]. As a consequence, based on the available literature it is difficult to get a
57
58 clear answer as to whether Pi needs to enter the cells to mediate its signaling effect. Because most of the
59
60 studies using PFA as an inhibitor of Pi transport were conducted in osteoblasts, chondrocytes and VSMCs in
which only SLC20 Pi transporters were expressed, data obtained might have been misinterpreted and a

1 possible role of Pi as an extracellular signaling molecule must be seriously considered. We and others have
2 recently generated mice carrying conditional and null alleles of the Pi transporter PiT1 [134, 135]. Such
3 animal models will be invaluable tools to investigate the role of SLC20 Pi transporters in mediating the
4 effects of Pi on cell functions.
5
6
7
8
9

10 11 12 13 14 **Phosphate sensing in mammals**

15 Although long-term Pi homeostasis is controlled by a variety of hormones, peptides and small molecules that
16 regulate the efficiency of Pi absorption in the intestine and Pi excretion in the renal tubule, recent data
17 suggests the existence of a Pi-sensing mechanism on the surface of cells that is able to detect changes in Pi
18 concentration [136].
19
20
21
22
23

24 *In vitro*, renal and intestinal cells are able to respond to changes in Pi concentration in the
25 extracellular medium. A low-Pi medium increased Pi uptake, whereas a high-Pi medium decreased Pi uptake
26 in renal [137] and intestinal cells [138, 139]. Osteoblast and bone-marrow stromal cells respond to changes
27 in external Pi concentrations by altering the expression, localization or secretion of growth factors,
28 transcription factors or enzymes [127, 138, 140, 141].
29
30
31
32
33

34 *In vivo*, a chronic elevation of Pi concentration in the serum, which can result from genetic
35 syndromes or renal insufficiency, is associated with severe defects in humans, such as vascular calcification
36 and secondary hyperparathyroidism [63, 142]. Genetic disorders due to mutations in GALNT3 [143], FGF23
37 [144] or Klotho [145] genes cause familial tumoral calcinosis, a rare autosomal recessive disorder
38 manifesting with severe hyperphosphatemia and widespread ectopic calcifications [146]. Likewise, targeted
39 deletion of either FGF23 or Klotho in mice leads to hyperphosphatemia and vascular calcification [147-149].
40 Hyperphosphatemia and vascular calcification are also prevalent in patients with end-stage renal disease
41 (ESRD) [142]. Elevated serum Pi concentration (greater than 2.1 mM) was shown to be positively correlated
42 with mortality in ESRD patients [150], and even small elevations in Pi concentration in the high-normal range
43 (1.1-1.45 mM) have been correlated with increased risk of cardiovascular mortality in ESRD patients and in
44 the general population [151, 152]. A recent review of the literature shows that there is a graded independent
45 association between serum Pi levels and mortality, mainly cardiovascular events, and the progression of
46 renal disease [20]. Lowering serum Pi levels with a non-calcium containing Pi binder slows the progression
47 of vascular calcification in ESRD patients [153, 154].
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The hyperphosphatemia seen in ESRD patients will also eventually lead to secondary

1 hyperparathyroidism with attendant increased PTH synthesis, secretion, and parathyroid cell proliferation.
2
3 Secondary hyperparathyroidism can be controlled by a Pi-restricted diet, as this was shown in dogs [155,
4
5 156]. Importantly, these studies showed that dietary Pi restriction corrected the secondary
6
7 hyperparathyroidism independently from changes in serum calcium and $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ levels. In addition, *in*
8
9 *vitro* studies have shown that the effect of serum Pi on the parathyroid was direct. Although high Pi
10
11 concentration stimulated PTH secretion, this direct effect required the maintenance of tissue architecture
12
13 [121, 122, 157]. The work of Silver and colleagues suggests that the effect of Pi on PTH gene expression is
14
15 post-transcriptional and involves the regulated interaction of parathyroid cytosolic proteins to a defined cis-
16
17 acting sequence in the PTH mRNA [158]. Two of the PTH mRNA-binding proteins, acting as stabilizing or
18
19 degrading factors, were identified as AU-rich binding factor (AUF1) and Upstream of N-ras (Unr). Their
20
21 regulated binding to the PTH cis-acting element located on its 3'UTR determine the PTH mRNA half-life
22
23 [158].
24

25
26 The existence of a Pi-sensing mechanism in the parathyroid gland was suggested in the experiments
27
28 of Martin *et al.* [159]. These investigators showed that when uremic rats were administered a low-Pi diet by
29
30 force-feeding, this induced a decrease in PTH and serum Pi concentration within 15 min. The infusion of Pi
31
32 into the duodenum or the circulation led to a rapid increase in PTH, without change in Pi or calcium
33
34 concentration, suggesting that the parathyroid gland is capable of sensing Pi in the absence of changes of
35
36 serum calcium. In addition, Berndt *et al.* [160] recently demonstrated that Pi administration into the
37
38 duodenum of intact or parathyroidectomized rats was associated with very rapid change in the fractional
39
40 excretion of phosphorus in the kidney, with no change in PTH, FGF-23 or s-FRP-4 concentration. Thus, the
41
42 intestine is able to sense an increase in luminal Pi concentration and signal to the kidney [160]. Enteric-renal
43
44 signaling mechanisms exist in the case of other ions as well, including sodium [161, 162], potassium [163]
45
46 and calcium [164].

47
48 The molecular nature of the Pi sensor still remains to be identified. Bacteria and yeasts both have
49
50 well developed Pi sensing mechanisms [165, 166]. In *Escherichia coli*, the phosphate transporter PstS and
51
52 other periplasmic proteins (PstC, Pst and PstB/PhoU) detect low external Pi concentration and increase the
53
54 efficiency of Pi retention in the bacteria [165]. In *Saccharomyces cerevisiae*, a low external Pi concentration
55
56 inactivates the Pho80-Pho85 complex by the cyclin-dependent kinase inhibitor Pho81, resulting in the
57
58 activation of the transcription factor Pho4 and subsequent induction of the Pi transporter Pho84, along with
59
60 other *PHO* genes [166]. Although the response to Pi variations in the environment has been well
characterized in unicellular organisms, it is unclear as to whether a single molecule acts as the sensor for Pi
on the surface of the cells or whether (or in addition to) many of the observed changes occur as a result of

1
2 altered intracellular Pi concentrations [136, 167]. In mammals, as in unicellular organisms, extracellular Pi
3 regulates the activity of specific Na⁺-dependent Pi transporters and modulates the cell cycle, as in unicellular
4 organisms [168-170]. PiT1 has been proposed to play a role in sensing Pi in parathyroid cells [171-173],
5 whereas, based on *in vitro* studies of transport-deficient mutants, a Pi-sensing function was proposed for
6 PiT2, independently of its transport function [174]. It is not known whether a Pi-sensing mechanism in
7 mammals would involve a local cell-to-cell regulation or a central or hormonal control. Since PiT1 and PiT2
8 are expressed ubiquitously, their putative role in sensing extracellular Pi may relate to a cell-to-cell based
9 regulation, enabling a fine tuning depending on individual Pi cellular needs. Of course, the involvement of
10 PiT transporters and their mode of action remain entirely a hypothesis, and physiological evidence is lacking.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Conclusion**

24
25
26 Considerable progress has been made over the past decade in our understanding of the mechanisms of Pi
27 homeostasis and skeleton mineralization. Still, very little is known about the initial events involving the
28 detection of a change in the Pi serum concentration and the subsequent appropriate regulation cascade.
29
30 Future studies should be directed at uncovering the nature and identity of the Pi-sensing mechanism. This
31 knowledge is essential to the proper understanding of the global regulation of Pi homeostasis and would
32 most certainly change the current concepts of this field. It is now clear that Pi represents a signal molecule
33 capable of modulating the expression or regulation of multiple factors necessary for diverse biological
34 processes. Increased knowledge of Pi biology and mode of action is essential for the development of
35 therapeutic strategies that may prevent the consequences of hyperphosphataemia in patients with chronic
36 renal failure.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Acknowledgments**

52
53
54 The authors gratefully acknowledge Joanna Ashton-Chess for critical reading of the manuscript. This work
55 was partially supported by grants from INSERM, ANR (PHYSIOPATH ANR-07-PHYSIO-017-01), La
56 Fondation pour la Recherche Médicale (AAP "Vieillessement ostéoarticulaire"), BIOREGOS and Région des
57 Pays de la Loire. Marion Julien received a fellowship from INSERM/Région des Pays de la Loire and La
58
59
60

1
2 Fondation pour la Recherche Médicale, Solmaz Khoshniat from the French Ministry of Research and la
3
4 Fondation pour la Recherche Médicale and Annabelle Bourguine from INSERM/Région des Pays de la Loire.
5
6
7
8

9
10 **References**

- 11
12 1. Hansen NM, Felix R, Bisaz S, and Fleisch H (1976) Aggregation of hydroxyapatite crystals. *Biochim*
13 *Biophys Acta* 451:549-559.
14
15 2. Crook M, and Swaminathan R (1996) Disorders of plasma phosphate and indications for its
16 measurement. *Ann Clin Biochem* 33 (Pt 5):376-396.
17
18 3. Kornberg A (1979) The enzymatic replication of DNA. *CRC Crit Rev Biochem* 7:23-43.
19
20 4. Rothfield L, and Finkelstein A (1968) Membrane biochemistry. *Annu Rev Biochem* 37:463-496.
21
22 5. Lehninger AL, and Wadkins CL (1962) Oxidative phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 31:47-78.
23
24 6. Hubbard SR, and Till JH (2000) Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*
25 69:373-398.
26
27 7. Krebs EG, and Beavo JA (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev*
28 *Biochem* 48:923-959.
29
30 8. Stock AM, Robinson VL, and Goudreau PN (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev*
31 *Biochem* 69:183-215.
32
33 9. Fruman DA, Meyers RE, and Cantley LC (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem*
34 67:481-507.
35
36 10. Bessman SP, and Carpenter CL (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev*
37 *Biochem* 54:831-862.
38
39 11. Prié D, Beck L, Friedlander G, and Silve C (2004) Sodium-phosphate cotransporters, nephrolithiasis
40 and bone demineralization. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 13:675-681.
41
42 12. Knochel JP, Barcenas C, Cotton JR, Fuller TJ, Haller R, and Carter NW (1978) Hypophosphatemia
43 and rhabdomyolysis. *J Clin Invest* 62:1240-1246.
44
45 13. Knochel JP (1977) The pathophysiology and clinical characteristics of severe hypophosphatemia.
46 *Arch Intern Med* 137:203-220.
47
48 14. Berndt T, and Kumar R (2009) Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis.
49 *Physiology (Bethesda, Md)* 24:17-25.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2 15. Hruska K, and Slatopolsky E (1997) Disorders of phosphorus, calcium, and magnesium metabolism.
3
4 In *Diseases of the Kidney*. Schrier R, and Gottschalk C, editors. Boston: Little and Brown.
- 5
6 16. Rutecki GW, Cugino A, Jarjoura D, Kilner JF, and Whittier FC (1997) Nephrologists' subjective
7
8 attitudes towards end-of-life issues and the conduct of terminal care. *Clin Nephrol* 48:173-180.
- 9
10 17. Weisinger JR, and Bellorin-Font E (1998) Magnesium and phosphorus. *Lancet* 352:391-396.
- 11
12 18. Shiber JR, and Mattu A (2002) Serum phosphate abnormalities in the emergency department. *J*
13
14 *Emerg Med* 23:395-400.
- 15
16 19. Hruska KA, Mathew S, Lund RJ, Memon I, and Saab G (2009) The pathogenesis of vascular
17
18 calcification in the chronic kidney disease mineral bone disorder: the links between bone and the
19
20 vasculature. *Semin Nephrol* 29:156-165.
- 21
22 20. Kanbay M, Goldsmith D, Akcay A, and Covic A (2009) Phosphate - the silent stealthy cardiorenal
23
24 culprit in all stages of chronic kidney disease: a systematic review. *Blood Purif* 27:220-230.
- 25
26 21. Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, and Pratt R (2008) Hyperphosphatemia of chronic kidney
27
28 disease. *Kidney Int* 74:148-157.
- 29
30 22. Pettifor JM (2008) What's new in hypophosphataemic rickets? *Eur J Pediatr* 167:493-499.
- 31
32 23. Murer H, Hernando N, Forster I, and Biber J (2000) Proximal tubular phosphate reabsorption:
33
34 molecular mechanisms. *Physiol Rev* 80:1373-1409.
- 35
36 24. Tanaka Y, and Deluca HF (1973) The control of 25-hydroxyvitamin D metabolism by inorganic
37
38 phosphorus. *Arch Biochem Biophys* 154:566-574.
- 39
40 25. DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin*
41
42 *Nutr* 80:1689S-1696S.
- 43
44 26. Berndt TJ, Schiavi S, and Kumar R (2005) "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus
45
46 homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F1170-1182.
- 47
48 27. Berndt T, and Knox F (1992) Renal regulation of phosphate excretion. In *The kidney: Physiology and*
49
50 *Pathophysiology*. Seldin D, and Giebish G, editors. New York: Raven Press. 2511-2532.
- 51
52 28. Chase LR, and Aurbach GD (1967) Parathyroid function and the renal excretion of 3'5'-adenylic acid.
53
54 *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:518-525.
- 55
56 29. Muff R, Fischer JA, Biber J, and Murer H (1992) Parathyroid hormone receptors in control of
57
58 proximal tubule function. *Annu Rev Physiol* 54:67-79.
- 59
60 30. Kiela PR, and Ghishan FK (2009) Recent advances in the renal-skeletal-gut axis that controls
phosphate homeostasis. *Lab Invest* 89:7-14.

- 1
2 31. Strom TM, and Jüppner H (2008) PHEX, FGF23, DMP1 and beyond. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 17:357-362.
- 3
4
5
6 32. Carpenter TO, Ellis BK, Insogna KL, Philbrick WM, Sterpka J, and Shimkets R (2005) Fibroblast
7 growth factor 7: an inhibitor of phosphate transport derived from oncogenic osteomalacia-causing
8 tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1012-1020.
- 9
10
11
12 33. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, and
13 Yamashita T (2006) Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23.
14 *Nature* 444:770-774.
- 15
16
17 34. Jüppner H (2007) Novel regulators of phosphate homeostasis and bone metabolism. *Therapeutic*
18 *apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the*
19 *Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy* 11 Suppl 1:S3-22.
- 20
21
22
23 35. Shaikh A, Berndt T, and Kumar R (2008) Regulation of phosphate homeostasis by the
24 phosphatonins and other novel mediators. *Pediatr Nephrol* 23:1203-1210.
- 25
26
27 36. Renkema K, Alexander RT, Bindels R, and Hoenderop J (2008) Calcium and phosphate
28 homeostasis: Concerted interplay of new regulators. *Ann. of Med.* 40:82-91.
- 29
30
31 37. Werner A, and Kinne RK (2001) Evolution of the Na-P(i) cotransport systems. *Am J Physiol Regul*
32 *Integr Comp Physiol* 280:R301-312.
- 33
34
35 38. Beck L, and Silve C (2001) [Molecular aspects of phosphate homeostasis in mammals]. *Nephrologie*
36 22:149-159.
- 37
38
39 39. Prie D, Urena Torres P, and Friedlander G (2009) Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney*
40 *Int* 75:882-889.
- 41
42
43 40. Singer SJ (1990) The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu Rev Cell Biol*
44 6:247-296.
- 45
46
47 41. Chou KC, and Elrod DW (1999) Prediction of membrane protein types and subcellular locations.
48 *Proteins* 34:137-153.
- 49
50
51 42. Chou KC, and Cai YD (2005) Using GO-PseAA predictor to identify membrane proteins and their
52 types. *Biochem Biophys Res Commun* 327:845-847.
- 53
54
55 43. Werner A, Moore ML, Mantei N, Biber J, Semenza G, and Murer H (1991) Cloning and expression of
56 cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9608-9612.
- 57
58
59 44. Busch AE, Schuster A, Waldegger S, Wagner CA, Zempel G, Broer S, Biber J, Murer H, and Lang F
60 (1996) Expression of a renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi-1) induces a conductance in

- 1
2 Xenopus oocytes permeable for organic and inorganic anions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5347-
3 5351.
4
5
6 45. Yabuuchi H, Tamai I, Morita K, Kouda T, Miyamoto K, Takeda E, and Tsuji A (1998) Hepatic
7 sinusoidal membrane transport of anionic drugs mediated by anion transporter Npt1. *J Pharmacol*
8 *Exp Ther* 286:1391-1396.
9
10
11 46. Uchino H, Tamai I, Yamashita K, Minemoto Y, Sai Y, Yabuuchi H, Miyamoto K, Takeda E, and Tsuji
12 A (2000) p-aminohippuric acid transport at renal apical membrane mediated by human inorganic
13 phosphate transporter NPT1. *Biochem Biophys Res Commun* 270:254-259.
14
15
16 47. Uchino H, Tamai I, Yabuuchi H, China K, Miyamoto K, Takeda E, and Tsuji A (2000) Faropenem
17 transport across the renal epithelial luminal membrane via inorganic phosphate transporter Npt1.
18 *Antimicrob Agents Chemother* 44:574-577.
19
20
21 48. Cheret C, Doyen A, Yaniv M, and Pontoglio M (2002) Hepatocyte nuclear factor 1 alpha controls
22 renal expression of the Npt1-Npt4 anionic transporter locus. *J Mol Biol* 322:929-941.
23
24
25 49. Reimer RJ, and Edwards RH (2004) Organic anion transport is the primary function of the
26 SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch* 447:629-635.
27
28
29 50. Urano W, Taniguchi A, Anzai N, Inoue E, Kanai Y, Yamanaka M, Kamatani N, Endou H, and
30 Yamanaka H (2009) Sodium-dependent phosphate cotransporter type 1 (NPT1) sequence
31 polymorphisms in male patients with gout. *Ann Rheum Dis*.
32
33
34 51. Murer H, Hernando N, Forster I, and Biber J (2003) Regulation of Na/Pi transporter in the proximal
35 tubule. *Annu Rev Physiol* 65:531-542.
36
37
38 52. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, and Tenenhouse HS (1998) Targeted
39 inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal
40 abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5372-5377.
41
42
43 53. Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I, Murer H, and Biber J (1998) Characterization of a
44 murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc Natl*
45 *Acad Sci U S A* 95:14564-14569.
46
47
48 54. Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C, and Schiavi SC (2009)
49 Intestinal npt2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *J Am Soc Nephrol*
50 20:2348-2358.
51
52
53 55. Segawa H, Onitsuka A, Furutani J, Kaneko I, Aranami F, Matsumoto N, Tomoe Y, Kuwahata M, Ito
54 M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, and Miyamoto K (2009) Npt2a and Npt2c in mice play distinct
55
56
57
58
59
60

- 1
2 and synergistic roles in inorganic phosphate metabolism and skeletal development. *Am J Physiol*
3 *Renal Physiol* 297:F671-678.
- 4
5
6 56. Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S, and Miyamoto K (2002)
7 Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J Biol Chem* 277:19665-19672.
- 8
9
10 57. Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami F,
11 Matsumoto N, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, and Miyamoto K (2009) Type IIc sodium-
12 dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Soc Nephrol* 20:104-113.
- 13
14
15 58. Collins JF, Bai L, and Ghishan FK (2004) The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-
16 phosphate cotransporters and viral receptors. *Pflugers Arch* 447:647-652.
- 17
18
19 59. Miller DG, Edwards RH, and Miller AD (1994) Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine
20 retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*
21 91:78-82.
- 22
23
24 60. Miller DG, and Miller AD (1994) A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for
25 cell entry. *J Virol* 68:8270-8276.
- 26
27
28 61. Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, and Miller AD (1994) Cell-surface
29 receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-
30 dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7071-7075.
- 31
32
33 62. Virkki LV, Biber J, Murer H, and Forster IC (2007) Phosphate transporters: a tale of two solute carrier
34 families. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F643-654.
- 35
36
37 63. Giachelli CM (2009) The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int* 75:890-897.
- 38
39
40 64. Li X, and Giachelli CM (2007) Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular
41 calcification. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 16:325-328.
- 42
43
44 65. Villa-Bellosta R, Ravera S, Sorribas V, Stange G, Levi M, Murer H, Biber J, and Forster IC (2009)
45 The Na⁺-Pi cotransporter PIT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal
46 proximal tubules and regulated by dietary Pi. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F691-699.
- 47
48
49 66. Bellows CG, Heersche JN, and Aubin JE (1992) Inorganic phosphate added exogenously or
50 released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner*
51 17:15-29.
- 52
53
54 67. Kumar R, and Riggs B (1980) Pathologic bone physiology. In *Fundamental and Clinical Bone*
55 *Physiology*. Urist M, editor. Philadelphia: Lippincott. 394-406.
- 56
57
58
59
60

- 1
2 68. Conrads K, Yi M, Simpson K, Lucas D, Camalier C, Yu L, Veenstra T, Stephens R, Conrads T, and
3 Beck G (2005) A combined proteome and microarray investigation of inorganic phosphate-induced
4 pre-osteoblast cells. *Mol Cell Proteomics* 4:1284-1296.
5
6
7 69. Naviglio S, Spina A, Chiosi E, Fusco A, Illiano F, Pagano M, Romano M, Senatore G, Sorrentino A,
8 Sorvillo L, and Illiano G (2006) Inorganic phosphate inhibits growth of human osteosarcoma U2OS
9 cells via adenylate cyclase/cAMP pathway. *J Cell Biochem* 98:1584-1596.
10
11
12 70. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, and Wenstrup RJ (1992) Distinct proliferative and
13 differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast
14 development. *J Bone Miner Res* 7:683-692.
15
16
17 71. Conrads K, Yu L, Lucas D, Zhou M, Chan K, Simpson K, Schaefer C, Issaq H, Veenstra T, Beck G,
18 and Conrads T (2004) Quantitative proteomic analysis of inorganic phosphate-induced murine
19 MC3T3-E1 osteoblast cells. *Electrophoresis* 25:1342-1352.
20
21
22 72. Beck G, Moran E, and Knecht N (2003) Inorganic phosphate regulates multiple genes during
23 osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res* 288:288-300.
24
25
26 73. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, and Chihara K (2002) IGF-I mediates the stimulatory effect of high
27 phosphate concentration on osteoblastic cell proliferation. *J Cell Physiol* 190:306-312.
28
29
30 74. Baylink DJ, Finkelman RD, and Mohan S (1993) Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone*
31 *Miner Res* 8 Suppl 2:S565-572.
32
33
34 75. Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Fukase M, and Chihara K (1994) IGF-I
35 mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation. *Am J*
36 *Physiol* 266:E709-716.
37
38
39 76. Schmid C, Keller C, Schlapfer I, Veldman C, and Zapf J (1998) Calcium and insulin-like growth factor
40 I stimulation of sodium-dependent phosphate transport and proliferation of cultured rat osteoblasts.
41 *Biochem Biophys Res Commun* 245:220-225.
42
43
44 77. Beck GR, Jr., Sullivan EC, Moran E, and Zerler B (1998) Relationship between alkaline phosphatase
45 levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell*
46 *Biochem* 68:269-280.
47
48
49 78. Beck G, Zerler B, and Moran E (2000) Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin
50 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8352-8357.
51
52
53 79. Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, and Shapiro IM (2001) Matrix regulation of skeletal cell
54 apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276:20316-20322.
55
56
57
58
59
60

- 1
2 80. Meleti Z, Shapiro IM, and Adams CS (2000) Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-
3 like cells in culture. *Bone* 27:359-366.
4
5 81. Wittrant Y, Bourguine A, Khoshniat S, Alliot-Licht B, Masson M, Gadius M, Rouillon T, Weiss P, Beck
6 L, and Guicheux J (2009) Inorganic phosphate regulates Glvr-1 and -2 expression: role of calcium
7 and ERK1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 381:259-263.
8
9 82. Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A, Gadius M, Bozec A, Wagner EF, Wittrant Y, Masson M, Weiss
10 P, Beck L, Magne D, and Guicheux J (2009) Phosphate-Dependent Regulation of MGP in
11 Osteoblasts: Role of ERK1/2 and Fra-1. *J Bone Miner Res*.
12
13 83. Teitelbaum SL (2000) Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289:1504-1508.
14
15 84. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC,
16 DuBose RF, Cosman D, and Galibert L (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand
17 enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 390:175-179.
18
19 85. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G,
20 Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I,
21 Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, and Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine
22 that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176.
23
24 86. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, 3rd,
25 Frankei WN, Lee SY, and Choi Y (1997) TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor
26 receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 272:25190-25194.
27
28 87. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K,
29 Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, and Suda T
30 (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory
31 factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3597-3602.
32
33 88. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S,
34 Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J,
35 Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G,
36 Tarpley J, Derby P, Lee R, and Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved
37 in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319.
38
39 89. Baylink D, Wergedal J, and Stauffer M (1971) Formation, mineralization, and resorption of bone in
40 hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 50:2519-2530.
41
42 90. Bruin WJ, Baylink DJ, and Wergedal JE (1975) Acute inhibition of mineralization and stimulation of
43 bone resorption mediated by hypophosphatemia. *Endocrinology* 96:394-399.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2 91. Thompson ER, Baylink DJ, and Wergedal JE (1975) Increases in number and size of osteoclasts in
3 response to calcium or phosphorus deficiency in the rat. *Endocrinology* 97:283-289.
4
5 92. Yates AJ, Oreffo RO, Mayor K, and Mundy GR (1991) Inhibition of bone resorption by inorganic
6 phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of mature
7 osteoclasts. *J Bone Miner Res* 6:473-478.
8
9 93. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Kanzawa M, and Chihara K (2003) Effect of high phosphate
10 concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. *J Cell Physiol* 196:180-
11 189.
12
13 94. Mozar A, Haren N, Chasseraud M, Louvet L, Maziere C, Wattel A, Mentaverri R, Morliere P, Kamel
14 S, Brazier M, Maziere JC, and Massy ZA (2008) High extracellular inorganic phosphate
15 concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol* 215:47-54.
16
17 95. Bingham PJ, and Raisz LG (1974) Bone growth in organ culture: effects of phosphate and other
18 nutrients on bone and cartilage. *Calcif Tissue Res* 14:31-48.
19
20 96. Kakuta S, Golub EE, and Shapiro IM (1985) Morphochemical analysis of phosphorus pools in
21 calcifying cartilage. *Calcif Tissue Int* 37:293-299.
22
23 97. Wang D, Canaff L, Davidson D, Corluka A, Liu H, Hendy GN, and Henderson JE (2001) Alterations
24 in the sensing and transport of phosphate and calcium by differentiating chondrocytes. *J Biol Chem*
25 276:33995-34005.
26
27 98. Fujita T, Meguro T, Izumo N, Yasutomi C, Fukuyama R, Nakamuta H, and Koida M (2001)
28 Phosphate stimulates differentiation and mineralization of the chondroprogenitor clone ATDC5. *Jpn J*
29 *Pharmacol* 85:278-281.
30
31 99. Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J,
32 Weiss P, Daculsi G, and Guicheux J (2003) Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte
33 maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the
34 regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 18:1430-1442.
35
36 100. Cecil DL, Rose DM, Terkeltaub R, and Liu-Bryan R (2005) Role of interleukin-8 in Pit-1 expression
37 and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 52:144-154.
38
39 101. Magne D, Julien M, Vinatier C, Merhi-Soussi F, Weiss P, and Guicheux J (2005) Cartilage formation
40 in growth plate and arteries: from physiology to pathology. *Bioessays* 27:708-716.
41
42 102. Anderson HC (2003) Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 5:222-226.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2 103. Alini M, Carey D, Hirata S, Grynblas MD, Pidoux I, and Poole AR (1994) Cellular and matrix changes
3 before and at the time of calcification in the growth plate studied in vitro: arrest of type X collagen
4 synthesis and net loss of collagen when calcification is initiated. *J Bone Miner Res* 9:1077-1087.
5
6
7 104. Mansfield K, Rajpurohit R, and Shapiro IM (1999) Extracellular phosphate ions cause apoptosis of
8 terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. *J Cell Physiol* 179:276-286.
9
10 105. Mansfield K, Teixeira CC, Adams CS, and Shapiro IM (2001) Phosphate ions mediate chondrocyte
11 apoptosis through a plasma membrane transporter mechanism. *Bone* 28:1-8.
12
13 106. Teixeira CC, Mansfield K, Hertkorn C, Ischiropoulos H, and Shapiro IM (2001) Phosphate-induced
14 chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C833-839.
15
16 107. Sabbagh Y, Carpenter TO, and Demay MB (2005) Hypophosphatemia leads to rickets by impairing
17 caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9637-
18 9642.
19
20 108. Mansfield K, Pucci B, Adams CS, and Shapiro IM (2003) Induction of apoptosis in skeletal tissues:
21 phosphate-mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent. *Calcif Tissue Int* 73:161-
22 172.
23
24 109. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, and Giachelli CM (2000)
25 Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87:E10-17.
26
27 110. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, and Morii H (2001) Vascular calcification and
28 inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis* 38:S34-37.
29
30 111. Kido S, Miyamoto K, Mizobuchi H, Taketani Y, Ohkido I, Ogawa N, Kaneko Y, Harashima S, and
31 Takeda E (1999) Identification of regulatory sequences and binding proteins in the type II
32 sodium/phosphate cotransporter NPT2 gene responsive to dietary phosphate. *J Biol Chem*
33 274:28256-28263.
34
35 112. Biber J, Forgo J, and Murer H (1988) Modulation of Na⁺-Pi cotransport in opossum kidney cells by
36 extracellular phosphate. *Am J Physiol* 255:C155-161.
37
38 113. Jin H, Hwang SK, Yu K, Anderson HK, Lee YS, Lee KH, Prats AC, Morello D, Beck GR, Jr., and Cho
39 MH (2006) A high inorganic phosphate diet perturbs brain growth, alters Akt-ERK signaling, and
40 results in changes in cap-dependent translation. *Toxicol Sci* 90:221-229.
41
42 114. Jin H, Hwang SK, Kwon JT, Lee YS, An GH, Lee KH, Prats AC, Morello D, Beck GR, Jr., and Cho
43 MH (2008) Low dietary inorganic phosphate affects the brain by controlling apoptosis, cell cycle and
44 protein translation. *J Nutr Biochem* 19:16-25.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2 115. Xu CX, Jin H, Lim HT, Kim JE, Shin JY, Lee ES, Chung YS, Lee YS, Beck G, Jr., Lee KH, and Cho
3
4 MH (2008) High dietary inorganic phosphate enhances cap-dependent protein translation, cell-cycle
5
6 progression, and angiogenesis in the livers of young mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*
7
8 295:G654-663.
- 9
10 116. Chang SH, Yu KN, Lee YS, An GH, Beck GR, Jr., Colburn NH, Lee KH, and Cho MH (2006)
11
12 Elevated inorganic phosphate stimulates Akt-ERK1/2-Mnk1 signaling in human lung cells. *Am J*
13
14 *Respir Cell Mol Biol* 35:528-539.
- 15
16 117. Jin H, Chang SH, Xu CX, Shin JY, Chung YS, Park SJ, Lee YS, An GH, Lee KH, and Cho MH
17
18 (2007) High dietary inorganic phosphate affects lung through altering protein translation, cell cycle,
19
20 and angiogenesis in developing mice. *Toxicol Sci* 100:215-223.
- 21
22 118. Jin H, Xu CX, Lim HT, Park SJ, Shin JY, Chung YS, Park SC, Chang SH, Youn HJ, Lee KH, Lee YS,
23
24 Ha YC, Chae CH, Beck GR, Jr., and Cho MH (2009) High dietary inorganic phosphate increases
25
26 lung tumorigenesis and alters Akt signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 179:59-68.
- 27
28 119. Xu CX, Jin H, Chung YS, Shin JY, Hwang SK, Kwon JT, Park SJ, Lee ES, Minai-Tehrani A, Chang
29
30 SH, Woo MA, Noh MS, An GH, Lee KH, and Cho MH (2009) Low dietary inorganic phosphate
31
32 affects the lung growth of developing mice. *J Vet Sci* 10:105-113.
- 33
34 120. Glinn M, Ni B, Irwin RP, Kelley SW, Lin SZ, and Paul SM (1998) Inorganic Pi increases neuronal
35
36 survival in the acute early phase following excitotoxic/oxidative insults. *J Neurochem* 70:1850-1858.
- 37
38 121. Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, and Brown AJ (1996)
39
40 Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH
41
42 secretion in vitro. *J Clin Invest* 97:2534-2540.
- 43
44 122. Almaden Y, Canalejo A, Hernandez A, Ballesteros E, Garcia-Navarro S, Torres A, and Rodriguez M
45
46 (1996) Direct effect of phosphorus on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro. *J*
47
48 *Bone Miner Res* 11:970-976.
- 49
50 123. Silver J, Kilav R, and Naveh-Many T (2002) Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J*
51
52 *Physiol Renal Physiol* 283:F367-376.
- 53
54 124. Beck G, and Knecht N (2003) Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein
55
56 kinase C-, and proteasome-dependent. *J Biol Chem* 278:41921-41929.
- 57
58 125. Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Yasutomi C, Nakamuta H, and Koida M (2001)
59
60 Incadronate and etidronate accelerate phosphate-primed mineralization of MC4 cells via ERK1/2-
Cbfa1 signaling pathway in a Ras-independent manner: further involvement of mevalonate-pathway
blockade for incadronate. *Jpn J Pharmacol* 86:86-96.

- 1
2 126. Julien M, Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz C, Cherel Y,
3 Weiss P, and Guicheux J (2007) Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in
4 chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology*
5 148:530-537.
6
7
8
9
10 127. Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T, and Koida M (2001) Phosphate
11 provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem*
12 *Biophys Res Commun* 280:348-352.
13
14
15 128. Szczepanska-Konkel M, Yusufi AN, VanScoy M, Webster SK, and Dousa TP (1986)
16 Phosphonocarboxylic acids as specific inhibitors of Na⁺-dependent transport of phosphate across
17 renal brush border membrane. *J Biol Chem* 261:6375-6383.
18
19
20
21 129. Villa-Bellosta R, and Sorribas V (2009) Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell
22 calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:761-766.
23
24
25 130. Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, and Sorribas V (2007) Characterization of phosphate transport
26 in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc*
27 *Biol* 27:1030-1036.
28
29
30
31 131. Ravera S, Virkki LV, Murer H, and Forster IC (2007) Deciphering PiT transport kinetics and substrate
32 specificity using electrophysiology and flux measurements. *Am J Physiol Cell Physiol* 293:C606-620.
33
34
35 132. Fleisch H, Russell RG, and Straumann F (1966) Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its
36 implications in calcium homeostasis. *Nature* 212:901-903.
37
38
39 133. Johnson K, and Terkeltaub R (2005) Inorganic pyrophosphate (PPI) in pathologic calcification of
40 articular cartilage. *Front Biosci* 10:988-997.
41
42
43 134. Beck L, Leroy C, Beck-cormier S, Forand A, Salaun C, Paris N, Bernier A, Urena-Torres P, Prié D,
44 Ollero M, Coulombel L, and Friedlander G (2010) The phosphate transporter PIT-1 (SLC20A1)
45 revealed as a new essential gene for mouse liver development. *PLoS ONE* In Press.
46
47
48 135. Festing MH, Speer MY, Yang HY, and Giachelli CM (2009) Generation of mouse conditional and null
49 alleles of the type III sodium-dependent phosphate cotransporter PiT-1. *Genesis* 47:858-863.
50
51
52
53 136. Kumar R (2009) Phosphate sensing. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 18:281-284.
54
55 137. Markovich D, Verri T, Sorribas V, Forgo J, Biber J, and Murer H (1995) Regulation of opossum
56 kidney (OK) cell Na/Pi cotransport by Pi deprivation involves mRNA stability. *Pflugers Arch* 430:459-
57 463.
58
59
60

- 1
2 138. Segawa H, Kaneko I, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Inoue Y, Kato S, and Miyamoto K (2004)
3 Intestinal Na-P(i) cotransporter adaptation to dietary P(i) content in vitamin D receptor null mice. *Am*
4 *J Physiol Renal Physiol* 287:F39-47.
5
6
7
8 139. Rizzoli R, Fleisch H, and Bonjour JP (1977) Role of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on intestinal
9 phosphate absorption in rats with a normal vitamin D supply. *J Clin Invest* 60:639-647.
10
11
12 140. Goseki-Sone M, Yamada A, Hamatani R, Mizoi L, Iimura T, and Ezawa I (2002) Phosphate depletion
13 enhances bone morphogenetic protein-4 gene expression in a cultured mouse marrow stromal cell
14 line ST2. *Biochem Biophys Res Commun* 299:395-399.
15
16
17 141. Goseki-Sone M, Yamada A, Asahi K, Hirota A, Ezawa I, and Iimura T (1999) Phosphate depletion
18 enhances tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression in a cultured mouse marrow
19 stromal cell line ST2. *Biochem Biophys Res Commun* 265:24-28.
20
21
22
23 142. Delmez JA, and Slatopolsky E (1992) Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in
24 patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 19:303-317.
25
26
27
28 143. Topaz O, Shurman DL, Bergman R, Indelman M, Ratajczak P, Mizrachi M, Khamaysi Z, Behar D,
29 Petronius D, Friedman V, Zelikovic I, Raimer S, Metzker A, Richard G, and Sprecher E (2004)
30 Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral
31 calcinosis. *Nat Genet* 36:579-581.
32
33
34
35 144. Benet-Pages A, Orlik P, Strom TM, and Lorenz-Depiereux B (2005) An FGF23 missense mutation
36 causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia. *Hum Mol Genet* 14:385-390.
37
38
39 145. Ichikawa S, Imel EA, Kreiter ML, Yu X, Mackenzie DS, Sorenson AH, Goetz R, Mohammadi M,
40 White KE, and Econs MJ (2007) A homozygous missense mutation in human KLOTHO causes
41 severe tumoral calcinosis. *J Clin Invest* 117:2684-2691.
42
43
44
45 146. Chefetz I, Kohno K, Izumi H, Uitto J, Richard G, and Sprecher E (2009) GALNT3, a gene associated
46 with hyperphosphatemic familial tumoral calcinosis, is transcriptionally regulated by extracellular
47 phosphate and modulates matrix metalloproteinase activity. *Biochim Biophys Acta* 1792:61-67.
48
49
50
51 147. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K,
52 and Yamashita T (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of
53 FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113:561-568.
54
55
56
57 148. Stubbs JR, Liu S, Tang W, Zhou J, Wang Y, Yao X, and Quarles LD (2007) Role of
58 hyperphosphatemia and 1,25-dihydroxyvitamin D in vascular calcification and mortality in fibroblastic
59 growth factor 23 null mice. *J Am Soc Nephrol* 18:2116-2124.
60

- 1
2 149. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M,
3
4 Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, and Nabeshima YI
5
6 (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45-
7
8 51.
9
10 150. Block GA (2000) Prevalence and clinical consequences of elevated Ca x P product in hemodialysis
11
12 patients. *Clin Nephrol* 54:318-324.
13
14 151. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, and Curhan G (2005) Relation between serum phosphate level
15
16 and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation* 112:2627-2633.
17
18 152. Foley RN (2009) Phosphate levels and cardiovascular disease in the general population. *Clin J Am*
19
20 *Soc Nephrol* 4:1136-1139.
21
22 153. Loghman-Adham M (1999) Phosphate binders for control of phosphate retention in chronic renal
23
24 failure. *Pediatr Nephrol* 13:701-708.
25
26 154. Russo D, Miranda I, Ruocco C, Battaglia Y, Buonanno E, Manzi S, Russo L, Scafarto A, and
27
28 Andreucci VE (2007) The progression of coronary artery calcification in predialysis patients on
29
30 calcium carbonate or sevelamer. *Kidney Int* 72:1255-1261.
31
32 155. Slatopolsky E, and Bricker NS (1973) The role of phosphorus restriction in the prevention of
33
34 secondary hyperparathyroidism in chronic renal disease. *Kidney Int* 4:141-145.
35
36 156. Lopez-Hilker S, Dusso AS, Rapp NS, Martin KJ, and Slatopolsky E (1990) Phosphorus restriction
37
38 reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol. *Am J*
39
40 *Physiol* 259:F432-437.
41
42 157. Nielsen PK, Feldt-Rasmussen U, and Olgaard K (1996) A direct effect in vitro of phosphate on PTH
43
44 release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells. *Nephrol Dial*
45
46 *Transplant* 11:1762-1768.
47
48 158. Silver J, and Naveh-Many T (2009) Phosphate and the parathyroid. 75:898-905.
49
50 159. Martin DR, Ritter CS, Slatopolsky E, and Brown AJ (2005) Acute regulation of parathyroid hormone
51
52 by dietary phosphate. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E729-734.
53
54 160. Berndt T, Thomas LF, Craig TA, Sommer S, Li X, Bergstralh EJ, and Kumar R (2007) Evidence for a
55
56 signaling axis by which intestinal phosphate rapidly modulates renal phosphate reabsorption. *Proc*
57
58 *Natl Acad Sci U S A* 104:11085-11090.
59
60 161. Lennane RJ, Carey RM, Goodwin TJ, and Peart WS (1975) A comparison of natriuresis after oral
and intravenous sodium loading in sodium-depleted man: evidence for a gastrointestinal or portal
monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med* 49:437-440.

- 1
2 162. Lennane RJ, Peart WS, Carey RM, and Shaw J (1975) A comparison on natriuresis after oral and
3 intravenous sodium loading in sodium-depleted rabbits: evidence for a gastrointestinal or portal
4 monitor of sodium intake. *Clin Sci Mol Med* 49:433-436.
5
6
7 163. Lee FN, Oh G, McDonough AA, and Youn JH (2007) Evidence for gut factor in K⁺ homeostasis. *Am*
8 *J Physiol Renal Physiol* 293:F541-547.
9
10
11 164. Conigrave AD, and Brown EM (2006) Taste receptors in the gastrointestinal tract. II. L-amino acid
12 sensing by calcium-sensing receptors: implications for GI physiology. *Am J Physiol Gastrointest*
13 *Liver Physiol* 291:G753-761.
14
15
16
17 165. Lamarche MG, Wanner BL, Crepin S, and Harel J (2008) The phosphate regulon and bacterial
18 virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS*
19 *Microbiol Rev* 32:461-473.
20
21
22
23 166. Mouillon JM, and Persson BL (2006) New aspects on phosphate sensing and signalling in
24 *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:171-176.
25
26
27
28 167. Silver J, and Dranitzki-Elhalel M (2003) Sensing phosphate across the kingdoms. *Curr Opin Nephrol*
29 *Hypertens* 12:357-361.
30
31
32 168. Carroll AS, and O'Shea EK (2002) Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends Biochem*
33 *Sci* 27:87-93.
34
35
36 169. Wilson WA, and Roach PJ (2002) Nutrient-regulated protein kinases in budding yeast. *Cell* 111:155-
37 158.
38
39
40 170. Silver J (2001) Cycling with the parathyroid. *J Clin Invest* 107:1079-1080.
41
42 171. Miyamoto K, Tatsumi S, Morita K, and Takeda E (1998) Does the parathyroid 'see' phosphate?
43 *Nephrol Dial Transplant* 13:2727-2729.
44
45 172. Miyamoto K, Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Nii T, Fujioka A, Kitano M, Inoue Y, and Takeda E
46 (1999) Regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate co-transporter in rat parathyroid glands.
47 *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 1:73-75.
48
49
50
51 173. Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, Inoue Y, Nii T, Katai K, Taketani
52 Y, Miyamoto KI, and Takeda E (1998) Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-
53 dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology* 139:1692-1699.
54
55
56
57 174. Salaun C, Marechal V, and Heard JM (2004) Transport-deficient Pit2 phosphate transporters still
58 modify cell surface oligomers structure in response to inorganic phosphate. *J Mol Biol* 340:39-47.
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

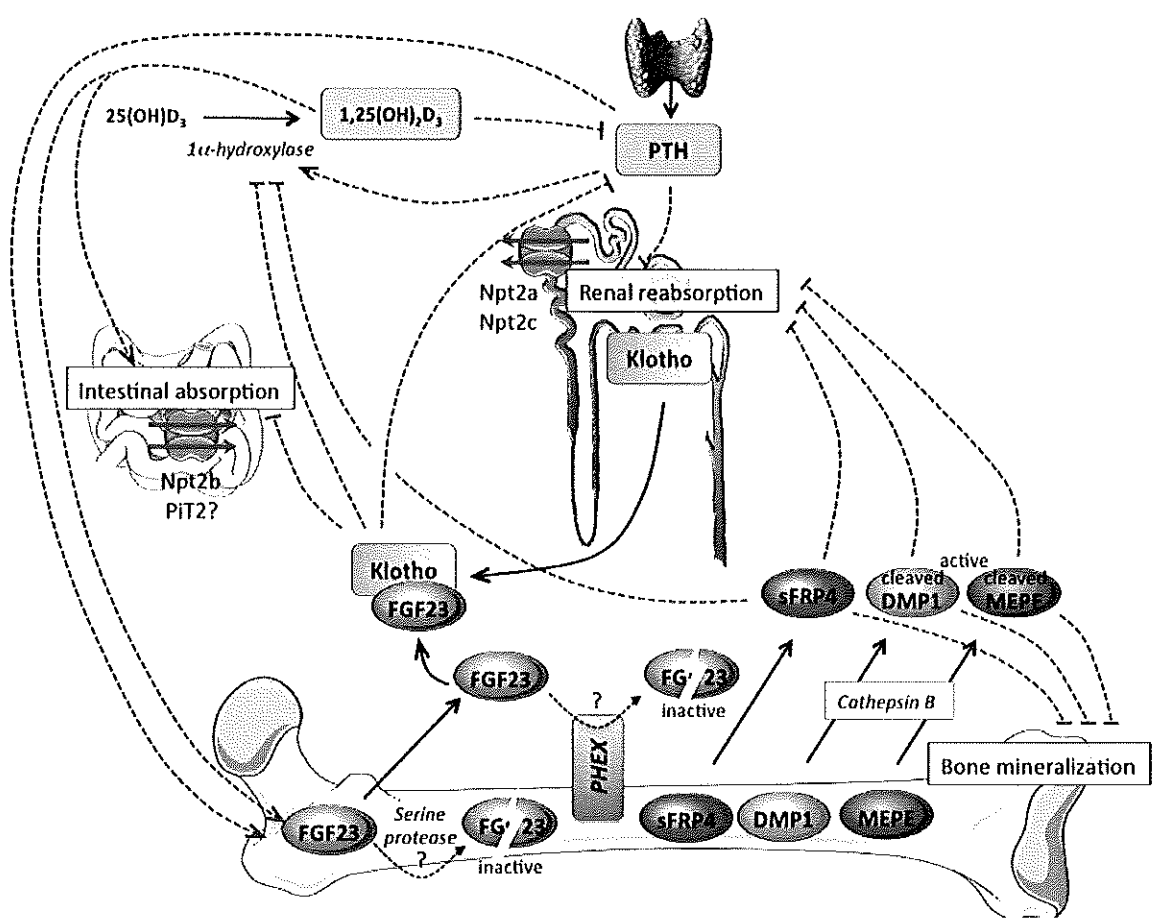


Figure 1. Simplified overview of the interrelationships between organs, hormones and transporters involved in the maintenance of phosphate homeostasis. Major regulators that inhibit (red lines) or stimulate (green lines) phosphate absorption or reabsorption, and bone mineralization are shown. The reader can refer to the text for more details, and to references [14, 30, 34-36].

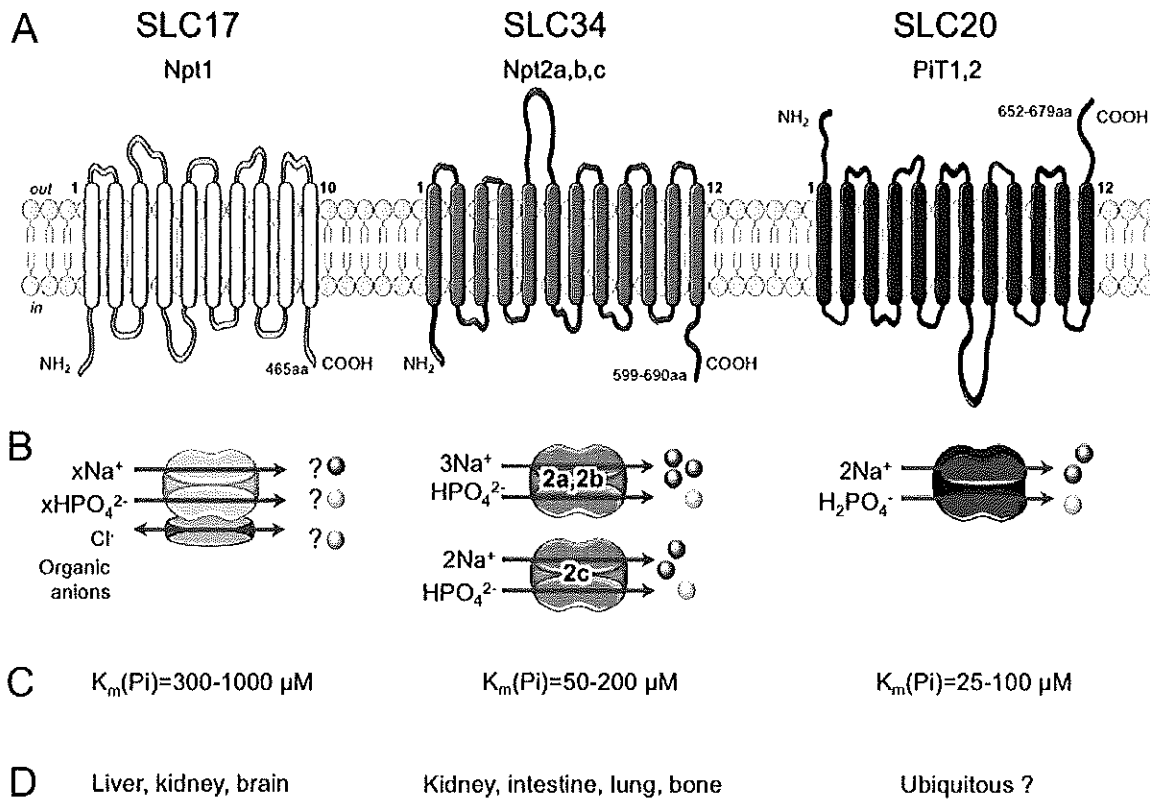


Figure 2. The three families of mammalian Na^+ -phosphate cotransporters. A) Assignment to solute carrier series and schematic representation of membrane topology according to current accepted models, as indicated. B) Substrate specificity and stoichiometry of Pi transport. C) Affinity for phosphate (Michaelis-Menten K_m value). D) Main site of expression in adults.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Normal serum values of Pi, Ca, magnesium and potassium in children and adults.

	Pi (mM)	Total Ca (mM)	Ionized Ca (mM)	Mg (mM)	K (mM)
Neonatal period	1.88-2.4	1.8-1.9	1.0-1.3	ND	ND
Childhood	1.45-1.8	2.2-2.6	1.1-1.4	0.6-0.9	3.5-5
Adulthood	0.85-1.44	2.2-2.6	1.1-1.4	0.7-0.9	3.5-5

Pi: inorganic phosphate; Ca: calcium; Mg : magnesium; K : potassium; ND not determined

4.2 Effets du Pi

Le tissu squelettique, de par son rôle de réservoir de calcium et de Pi expose les cellules qui le constituent à de fortes concentrations en Pi et en calcium. En effet, d'une part, au niveau des sites de résorption, la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite par les ostéoclastes conduit à la libération d'ions phosphate et calcium et à une augmentation locale de leur concentration, jusqu'à des valeurs atteignant 40 mM pour le calcium (499). Les valeurs de concentration du Pi ne sont pas clairement définies. Par ailleurs, les cellules squelettiques présentent la particularité d'exprimer des phosphatases telles que la TNAP ou la Phospho-1, décrites précédemment, qui en hydrolysant leurs substrats phosphatés, augmentent la concentration locale des ions Pi dans l'environnement de ces cellules. Enfin, il a été montré que la concentration des ions calcium et Pi dans la bordure ostéoïde est élevée comparée à celle mesurée dans le liquide extracellulaire, et que le transfert de phosphate et de calcium depuis la circulation sanguine vers la matrice osseuse pourrait intervenir dans la minéralisation osseuse et l'homéostasie ionique (405, 500). Les chondrocytes hypertrophiques sont également au contact du liquide extracellulaire, et donc du Pi, lors de la vascularisation de la plaque de croissance.

Les premières études à s'être intéressées aux effets du phosphate sur les cellules squelettiques ont été menées en 1974 par Bingham *et al.*, qui ont montré qu'une concentration croissante de Pi de 1,5 à 4,5 mM, sur une culture d'os longs de fœtus de rat, augmentait le taux de collagène et la synthèse d'hydroxyproline (501). Puis de nombreuses études ont permis la reconnaissance du Pi en tant que molécule de signalisation importante capable de réguler l'expression de nombreux gènes et impliquée dans différentes fonctions des cellules squelettiques telles que la prolifération, la différenciation ou la minéralisation comme cela va être décrit dans les paragraphes suivants. Par ailleurs, les effets du Pi ne sont pas restreints aux seuls tissus minéralisés mais touchent également d'autres types cellulaires tels que les VSMC ou les cellules rénales par exemple.

4.2.1 Effets du Pi sur les ostéoblastes

Il a été montré que le traitement de cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 par du Pi extracellulaire (entre 2 et 10 mM) stimulait leur prolifération par une augmentation de

l'expression des protéines du cycle cellulaire de manière dose et temps-dépendants (entre 3h et 24h) (502 , 503 , 504 , 505). De plus, comme le suggère l'utilisation d'anticorps anti-IGF-1 et anti-IGF-1R, cet effet du Pi sur la prolifération des MC3T3-E1 semble être partiellement médié par l'IGF-1, dont l'expression et la sécrétion sont augmentées par le Pi (502). Cependant, des données contradictoires circulent quant à l'effet du Pi sur la prolifération des cellules ostéoblastiques. Ainsi, certaines études ont montré que le Pi inhibait la prolifération de cellules d'ostéosarcome humain U2OS via une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase et ainsi une diminution de la concentration d'AMPc (506). Ces données semblent être renforcées par une étude sur des cellules U2OS indiquant une relation inverse entre la mitogénicité des cellules d'ostéosarcome et l'expression de la TNAP, qui initie une augmentation de la concentration de Pi (507). Cependant ces effets antiprolifératifs du Pi semblent être limités à ce type cellulaire. D'autres études n'ont pas montré d'effet du β -glycérophosphate sur la prolifération de cellules progénitrices d'ostéoblastes de poulet (508).

Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que le Pi était important dans la différenciation ostéoblastique (501, Gerstenfeld, 1987 #161, Bellows, 1991 #162, Tenenbaum, 1992 #163). Pendant cette phase, les cellules expriment progressivement des marqueurs phénotypiques, et notamment l'expression de la TNAP augmente, ce qui est corrélé à une augmentation de la concentration de Pi provenant de l'hydrolyse du β -glycérophosphate ou d'autres substrats de la TNAP (509 , 510). Les cellules ostéoblastiques sont donc en contact de fortes concentrations en Pi. Beck *et al.* ont mis en évidence la capacité du Pi à réguler l'expression de gènes dans les ostéoblastes via l'activité de la TNAP. Ainsi, ils ont montré que l'expression de l'OPN, aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine, dépendait de l'augmentation de la concentration de Pi suite à l'activité de la TNAP (224). La confirmation de cette donnée est obtenue par la répression de la TNAP dans des ostéoblastes, qui conduit à une répression de l'induction de l'expression de l'OPN, puis leur traitement avec de la TNAP exogène, qui conduit à une stimulation de l'expression de l'OPN (220). De plus, il a été montré que les facteurs qui augmentaient l'activité de la TNAP, tels que le TGF- β , l'acide rétinoïque, l'endothéline, la BMP ou la vitamine D, et qui par ce biais augmentaient la concentration en Pi, permettaient la stimulation de l'expression de l'OPN (511). La concentration minimale de Pi requise pour observer l'induction de l'expression de l'OPN dans les expérimentations de Beck *et al.* est de 4 mM tandis qu'elle est de 10 mM pour un effet maximum (220). Afin de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la stimulation de l'expression de l'OPN par le Pi, un certain nombre d'inhibiteurs de voies de

signalisation intracellulaires a été utilisé. Il a été montré que le Pi régula l'expression des gènes via l'activation de voies de signalisation spécifiques incluant notamment ERK1/2, la PKC et le protéasome (498). Il a d'ailleurs été montré que ces voies étaient activées non seulement dans les cellules osseuses (292, 498), mais également dans des cellules de tissus non minéralisés tels que le cerveau ou les poumons (512). Par la suite, des analyses de puces à ADN ont permis d'identifier un grand nombre de gènes dont l'expression est stimulée ou inhibée par 10 mM de Pi (504). Les gènes stimulés sont essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans la différenciation des ostéoblastes ou la minéralisation tels que l'OPN ou Fra-2. Cette approche transcriptionnelle a également permis de mettre en évidence la stimulation par le Pi de l'expression d'autres gènes dont les fonctions ne sont pas élucidées dans l'os comme HMGA1 ou la Gadd153. La majeure partie des gènes dont l'expression est réduite en réponse au Pi code pour des protéines matricielles inhibitrices de la minéralisation, telles que twist et la périostine ou pour des protéines de la matrice extracellulaire associées à un stade précoce de la différenciation ostéoblastique telles que les collagènes de type I et III ou la thrombospondine. D'après les auteurs de ces études, le phosphate semble donc aider à coordonner la transition entre la formation de la matrice et sa minéralisation (504). Afin d'évaluer l'effet d'une concentration élevée de Pi au niveau protéomique, une analyse de puces à ADN a été combinée à une analyse protéomique. Cette étude a pu mettre en évidence que le Pi régule de nombreuses protéines, que ce soit au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel. Parmi ces protéines, Fra-1, un facteur de transcription de la famille AP-1, a retenu l'attention des auteurs car comme mentionné lors de la première partie, il joue un rôle important dans le développement osseux (91), et d'autre part, il est un modèle de protéine régulée par le Pi (505). Ainsi, le Pi stimule faiblement Fra-1 au niveau de l'ARNm, en revanche l'expression protéique de Fra-1 est fortement stimulée par le Pi sans que l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription ou de la traduction n'affecte cette stimulation par le Pi. Ces données suggèrent donc que Fra-1 est régulé de manière post-traductionnelle par le Pi (505). Nous nous sommes basés sur ces données afin de déterminer si dans notre modèle cellulaire (MC3T3-E1), le Pi stimulait l'expression et la phosphorylation de Fra-1 (article 2). Par ailleurs, d'autres facteurs de transcription peuvent également être régulés par le Pi au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel. Ainsi, il a été mis en évidence que l'expression de la Nrf-2 est stimulée au bout de deux heures de traitement au Pi (503). De plus, il est possible que Runx-2 soit un médiateur de la réponse au Pi dans les ostéoblastes. En effet, Runx-2 n'est pas régulé au niveau de l'ARNm par le Pi (503). Cependant, le Pi stimule l'export nucléaire de Runx-2, qui est connu pour contrôler l'expression de l'OCN. Par

ailleurs, une diminution de l'expression de l'OCN a été observée en réponse au Pi, qui serait corrélée à l'exportation de Runx-2 (513).

Enfin, des études *in vitro* ont montré que des concentrations élevées (de 3,5 à 10 mM) de Pi étaient capables d'induire la minéralisation dans des cultures de cellules ostéoblastiques (136, 509). De plus, il a été mis en évidence que les processus de transcription et de traduction étaient requis pour que la minéralisation soit induite soit par le β -glycérophosphate soit par le Pi en présence de calcium (514). Cependant, il a été montré que le Pi était important pour l'initiation de la phase de minéralisation (515) mais pas pour sa progression (516, 517). Ainsi, l'expression de protéines présentes sur les VM telles que PiT-1, TNAP ou Anx V est augmentée en réponse au β -glycérophosphate ou au Pi, ce qui souligne l'importance du rôle du Pi dans l'accumulation des ions Pi et calcium dans les VM et donc dans la minéralisation des cellules ostéoblastiques (365, Orimo, 2006 #176, 504, Garcia, 2002 #164). Il a également été montré qu'une augmentation de Pi (de 1 à 7 mM) provoquait l'apoptose de manière dose et temps-dépendants de cellules ostéoblastiques (518). Ces données sont confirmées au niveau des sites de résorption osseuse, où les concentrations des ions phosphate et calcium sont élevées (499) et où un grand nombre de cellules ostéoblastiques en apoptose a été décrit (519). Physiologiquement, au cours de sa maturation, l'ostéoblaste peut évoluer en cellules bordantes, en ostéocytes ou mourir par apoptose et le Pi pourrait être l'une des causes de l'apoptose des ostéoblastes.

Comme précisé précédemment (paragraphe 1.3.4), des transporteurs de type III, PiT-1 et PiT-2 sont exprimés par les cellules ostéoblastiques. De nombreuses études utilisant le foscarnet (ou PFA), qui est un inhibiteur compétitif des cotransporteurs Na^+ -Pi, suggèrent la nécessité de l'entrée de Pi dans les cellules osseuses (280). La capacité de 300 μM de foscarnet à bloquer l'induction de l'OPN suggère que l'internalisation du Pi est nécessaire pour son activité en tant que molécule de signalisation (220). Cependant, le foscarnet d'une part n'a pas d'effet spécifique sur les transporteurs de Pi présents dans les ostéoblastes car il n'inhibe pas les transporteurs de phosphate de type III et d'autre part, il est connu également pour bloquer la formation des cristaux de phosphate de calcium (520), ces derniers pouvant ainsi être à l'origine des effets observés sur les cellules.

4.2.2 Effets du Pi sur les autres cellules des tissus squelettiques

Des effets du Pi ont également été décrits dans les chondrocytes de la plaque de croissance, dans les ostéoclastes ainsi que dans les cellules du tissu dentaire et seront détaillés dans cette partie.

Au niveau de la plaque de croissance existe un gradient de Pi et de calcium, qui va en s'accroissant vers les sites de minéralisation (521). Les chondrocytes de la plaque de croissance sont donc soumis à de fortes concentrations en Pi et en calcium. De nombreuses études ont montré que le Pi jouait un rôle déterminant dans la différenciation, la minéralisation et l'apoptose des chondrocytes de la plaque de croissance (35, 36, 522, 523). L'effet du Pi dans la différenciation des cellules chondrocytaires vers un phénotype hypertrophique a été mis en évidence par le traitement de cellules ATDC5 par 10 mM de Pi. Ainsi, il a été montré que le Pi entraînait une suppression de l'expression de collagène de type II dans ces cellules et stimulait l'expression du collagène de type X (35, 524). Julien *et al.* ont également montré que le Pi stimulait l'expression de la MGP dans les ATDC5 via la voie ERK1/2 (292). De plus, comme cela a été décrit pour les ostéoblastes, le Pi induit la mort par apoptose des chondrocytes de la plaque de croissance (35, 36). Les mécanismes conduisant à ces phénomènes apoptotiques impliquent l'activation de caspases-3 et -9 et la réduction du ratio Bcl-2/Bax (35, 525). Le Pi peut également entraîner une perméabilité au niveau de la membrane mitochondriale via une production de NO conduisant à l'activation de caspases (526, 527). L'importance de cet effet apoptotique du Pi sur les chondrocytes de la plaque de croissance est également soulignée par des études menées *in vitro* et *in vivo*. En effet, il a été montré que des souris rachitiques suite à une invalidation génique de l'expression du VDR (528) ou suite à une mutation de Phex (souris *hyp*) (525) présentaient une expansion de leur zone de chondrocytes hypertrophiques. Cette expansion est secondaire à un défaut d'apoptose des cellules chondrocytaires hypertrophiques et est associée à l'hypophosphatémie observée chez ces animaux. D'ailleurs le rétablissement de l'homéostasie phosphocalcique chez ces animaux empêche les troubles de la croissance osseuse (525, 528).

Il semblerait que ces effets du Pi passent par une accumulation de phosphate intracellulaire (529, 530). En effet, PiT-1 et PiT-2 ont été décrits dans les chondrocytes de la plaque de croissance *in vitro* et *in vivo* (187, 398, 531). Les données *in vitro* obtenues sur des ATDC5 ont montré que PiT-1 était exprimé à tous les stades de différenciation avec un maximum d'expression au cours de la prolifération (186). Palmer *et al.* ont montré par la technique d'hybridation *in situ* au niveau des métatarses de souris que PiT-1 était exprimé *in vivo* au

cours du développement embryonnaire dans des chondrocytes au stade hypertrophique et non prolifératif comme cela a été montré *in vitro* dans la plaque de croissance (398). De plus, des transporteurs PiT-1 ont été identifiés au niveau des membranes des VM isolées à partir de chondrocytes de plaques de croissance de poulet (184). Il a été montré que l'activité de transport mesurée au niveau des VM est maximale de manière concomitante à l'expression du collagène de type X dans les chondrocytes de plaque de croissance (186). L'importance de l'entrée du Pi dans les chondrocytes via les transporteurs de phosphate sodium-dépendants est mise en évidence par l'utilisation de foscarnet, avec cependant les mêmes réserves émises pour les ostéoblastes. Ainsi, il a été montré que le foscarnet bloquait l'expression des gènes régulés par le Pi ainsi que l'apoptose et la minéralisation induites par le Pi (529 , 532). Etant donné l'absence d'inhibition des PiT par le foscarnet et l'inhibition de la formation de précipités de phosphate de calcium, de nouvelles hypothèses peuvent être émises telles que l'implication des cristaux sur ces effets apoptotiques ou le rôle des transporteurs de Pi en tant que senseurs et non de transporteurs de Pi. Différentes molécules modulent l'activité ou l'expression des transporteurs de Pi. Ainsi, par exemple, le TGF- β 1 augmente l'activité et la synthèse de PiT-1 mais n'a en revanche aucun effet sur PiT-2 (402). De plus, il a été montré que PiT-1 et PiT-2 ont leurs expressions augmentées en réponse à une déplétion en Pi (395 , 533). Globalement, ces données nous permettent de conclure quant au rôle du Pi en tant que molécule de signalisation capable de réguler l'expression de nombreux gènes via différentes voies de signalisation dans les cellules chondrocytaires.

Au niveau des sites de résorption osseuse, les ostéoclastes sont également soumis à de fortes concentrations de Pi et de calcium du fait de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. Des études ont montré *in vitro* que de fortes concentrations de Pi inhibaient la formation des ostéoclastes à partir de précurseurs provenant de moelle osseuse ainsi que leur différenciation et leur activité de résorption (534 , 535). Il a été suggéré que les ostéoblastes, via une augmentation de leur activité TNAP, et donc d'une augmentation de la concentration locale de Pi, pouvaient être à l'origine d'une diminution de l'ostéoclastogenèse (536). Par ailleurs, une autre étude suggère que le Pi, en augmentant la synthèse d'OPG par les ostéoblastes, réduisait la liaison de RANKL à son récepteur et inhibait ainsi la différenciation des précurseurs ostéoclastiques (535). Cette même étude a suggéré que le Pi pourrait également induire l'apoptose des ostéoclastes et empêcher ainsi leur activité de résorption (535). D'autres études *in vitro* menées sur des précurseurs ostéoclastiques montrent qu'une augmentation de Pi (1,5 à 4,5 mM) inhibait leur différenciation (537). Parallèlement à ces

données, il a été suggéré par des études sur des souris en conditions hypophosphatémiques, que de faibles concentrations en Pi pouvaient également inhiber la différenciation ostéoclastique. Ainsi des souris *hyp* nourries avec un régime pauvre en Pi présentent peu d'ostéoclastes tandis que ces mêmes souris nourries avec un régime riche en Pi voient leur nombre d'ostéoclastes augmenter (439). Par ailleurs, la présence de transporteurs de phosphate sodium dépendants (Npt2a et PiT-1) a également été montrée dans les cellules ostéoclastiques (406) mais leur rôle dans la médiation des effets du Pi dans ces cellules reste à être clarifié.

Dans le tissu dentaire, les études de l'effet des ions Pi se sont focalisées sur les cellules cémentoblastiques *in vitro*. Un traitement par 5 mM de Pi de cellules provenant d'une lignée immortalisée de cémentoblastes conduit à une régulation de plusieurs gènes impliqués entre autres dans la formation du ciment. Parmi les gènes régulés se trouvent des membres de la famille des SIBLING. Ainsi, l'expression de l'OPN et de la Dmp-1 est stimulée, tandis que celle de la Bsp est inhibée (538). En plus de leur rôle dans le processus de minéralisation, ces protéines de la famille SIBLING activent les membres de la famille des métalloprotéinases, les MMP-2, MMP-3 et MMP-9 dont l'expression est également régulée par le Pi dans les cémentoblastes *in vitro* (538). Il a également été rapporté une stimulation de l'expression de Ank, Pit-1, Tnap/Akp-2 dans ces cémentoblastes (538). Des analyses de microarray ont par ailleurs montré que de nombreux gènes, dont des facteurs de transcription, sont régulés par le Pi (539) et qu'ainsi le Pi jouerait également un rôle de molécule de signalisation dans les cellules du tissu dentaire. Cependant aucune donnée concernant l'implication de voies de signalisation n'est disponible à ce jour. Ces études sont destinées à permettre une meilleure compréhension du rôle du Pi dans le développement des racines et des applications thérapeutiques qui pourraient en découler.

Peu d'études se sont penchées sur l'effet des ions Pi dans les autres cellules de la dent. Cependant, il a été montré que PiT-1 et PiT-2 sont exprimés dans les cellules odontoblastiques (540). Il a également été montré *in vivo* par immunohistochimie que les transporteurs Npt2a et Npt2b étaient exprimés dans les cellules odontoblastiques de souris. (540). Ces résultats suggèrent un rôle pour le Pi dans les cellules odontoblastiques et des études seront nécessaires pour déterminer s'il peut agir en tant que molécule de signalisation au sein de ces cellules. Dans ce contexte, les travaux des **articles 4 et 5** ont cherché à déterminer le rôle du Pi en tant que molécule de signalisation dans un modèle de culture odontoblastique.

4.2.3 Effets du Pi sur les cellules des tissus non squelettiques

La régulation de l'expression des gènes par le Pi n'est pas restreinte aux seuls tissus minéralisés. Ainsi, les gènes des cellules rénales, parathyroïdiennes, neuronales, et des cellules musculaires lisses des vaisseaux, entre autres, sont régulés par le Pi.

Une concentration élevée de phosphate (2 mM pendant 6 jours de traitement) entraîne la conversion de cellules musculaires lisses des vaisseaux vers un phénotype ostéoblastique ou chondrocytaire *in vitro*, avec une stimulation de l'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que le Runx-2, l'OPN, la TNAP et l'OCN et une diminution de l'expression de marqueurs phénotypiques des VSMC (359). Ce phénomène pourrait jouer un rôle dans la calcification vasculaire, particulièrement chez des personnes présentant des pathologies rénales chroniques associées à une hyperphosphatémie (359). Cet effet du Pi sur les VSMC serait dépendant d'une entrée de Pi dans les cellules via les transporteurs de phosphate PiT-1 et PiT-2. Ces données sont confirmées par l'utilisation d'ARN interférants de PiT-1 dans un modèle de cellules vasculaires, qui inhibe la minéralisation en réponse au Pi (319). La minéralisation est rétablie lors d'une surexpression de PiT-1 dans ces cellules. Bien que l'implication de ces transporteurs ait été clairement démontrée dans ces cellules, leur rôle précis *in vivo* dans les calcifications ectopiques reste à être déterminé. Ainsi, des publications récentes ont montré que ces transporteurs sont saturés dans des concentrations physiologiques en Pi. Ceci implique qu'une augmentation de l'influx de Pi peut seulement être médiée par une augmentation de l'expression des transporteurs de Pi, ce qui n'a pour l'instant pas été mis en évidence. Des données complémentaires sont donc nécessaires à la compréhension du rôle des transporteurs dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux (541). Par ailleurs, dans une étude récente, Villa Bellosta et *al.* ont utilisé le foscarnet, qui avait été montré inhiber la calcification induite par le Pi. Cependant, ils ont montré que le foscarnet agissait non pas en réduisant l'entrée de Pi comme il a été suggéré auparavant mais en empêchant la précipitation physique des cristaux (387). Les données de cette étude concernant l'action du foscarnet rejoignent les restrictions sur les conclusions des tests réalisés avec le foscarnet et mentionnées précédemment.

Par ailleurs des études préliminaires sur les effets du Pi dans des cellules épithéliales bronchiques ou les cellules du cerebellum ont été effectuées et montrent que le Pi jouerait un rôle, non encore clairement défini, sur la croissance cellulaire via l'activation d'une voie de

signalisation impliquant ERK1/2-Akt (512). Ainsi, des études *in vivo* sur des souris soumises à un régime riche en phosphate montrent une altération de la croissance cérébrale tandis que des études *in vitro* ont montré que 10 mM de Pi augmentait la viabilité cellulaire et la croissance des cellules épithéliales bronchiques, ces deux effets dépendant d'un mécanisme impliquant la phosphorylation de ERK1/2 (512).

4.3 Implication du calcium dans les effets du Pi

Toutes les études menées précédemment *in vitro* et décrivant les effets du Pi sur les différentes fonctions des ostéoblastes ont été menées dans des milieux de culture contenant du calcium. Or le calcium est une molécule de signalisation qui régule différentes fonctions ostéoblastiques telles que la prolifération en augmentant la synthèse d'ADN des MC3T3-E1 via une augmentation de la production et de la sécrétion d'IGF-1 (542 , 543). Maeno *et al.* ont montré qu'en présence de phosphate, entre 2 et 6 mM de calcium permettaient la survie et la prolifération d'ostéoblastes primaires en culture, entre 6 et 10 mM de calcium favorisaient leur différenciation. Au-delà de 10 mM, les ostéoblastes entraient en apoptose (544). De plus, des études utilisant des chélateurs de calcium et des inhibiteurs de canaux calciques suggèrent que le phosphate n'agit ni en diminuant le pool de calcium intracellulaire, ni en entraînant un influx de calcium dans la cellule (498). Cependant, une autre étude s'est penchée sur les effets du calcium (1 à 4 mM) et du phosphate (1 à 4 mM) dans les MC3T3-E1 et a mis en évidence que l'utilisation d'un inhibiteur du canal calcique de type L ou de foscarnet bloquait l'induction de l'expression de l'OPN (545). Des études *in vitro* ont montré que des concentrations élevées des deux ions Pi (5 mM) et calcium (3,6 mM) étaient nécessaires pour que la minéralisation ait lieu dans des cultures d'ostéoblastes de rat (514). De plus, Adams *et al.* ont étudié les effets d'une augmentation de la concentration du phosphate et du calcium sur des ostéoblastes. Ils ont montré qu'une faible augmentation de la concentration en calcium (de 1,9 à 3 mM) amplifiait l'effet d'une forte concentration de phosphate (3 à 7 mM) sur l'apoptose des cellules ostéoblastiques (546). Par ailleurs, il a également été montré que le calcium est impliqué dans l'apoptose médiée par le phosphate dans les cellules chondrocytaires (530). Il a été supposé que le phosphate extracellulaire jouait un rôle dans la différenciation précoce des cellules chondrogéniques, tandis que le calcium extracellulaire intervenait dans un stade plus tardif de leur différenciation (547). Dans ce contexte, nous

avons cherché à déterminer via l'article 3 l'implication du calcium dans les effets du phosphate sur la différenciation des MC3T3-E1.

Les mécanismes par lesquels le calcium médie ses effets semblent passer par un récepteur sensible au calcium (CaSR). Le CaSR est exprimé par de nombreuses cellules, y compris les cellules du tissu osseux. Ainsi, il a été montré que les ostéoclastes (548) et les ostéoblastes (549) expriment ce récepteur. Cependant une controverse quant à l'expression du CaSR par les ostéoblastes existe (416, 429). En effet, la capacité d'ostéoblastes provenant de souris invalidées pour le CaSR à répondre au calcium extracellulaire (429) suggère qu'un senseur au calcium différent du CaSR peut être impliqué. De récentes études ont montré qu'il existait un récepteur sensible au calcium d'une autre famille, le GPRC6-A, qui est exprimé par les ostéoblastes (428). Des études ont montré qu'un mécanisme de CaSR est impliqué dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la minéralisation des ostéoblastes. De plus, différentes voies de signalisation peuvent être déclenchées lors de l'activation du CaSR par le calcium, dont les voies médiées par la phospholipase C ou ERK1/2 et p38 (550) entre autres.

4.4 Effets du phosphate et cristaux phosphocalciques

Comme il a été décrit précédemment, le phosphate peut constituer un signal extracellulaire, capable de réguler l'expression de nombreux gènes dans différents types cellulaires. Parallèlement, le calcium extracellulaire, principalement via le CaSR, joue également un rôle de molécule signal. Ces deux éléments constituent les deux composants majeurs de la phase minérale du cartilage de la plaque de croissance, de l'os, de la dentine et des sites de calcifications ectopiques. Il est intéressant de déterminer si les deux ions calcium et phosphate, sous la forme de précipités de phosphate de calcium sont capables d'activer des réponses cellulaires spécifiques.

4.4.1 Sur les ostéoblastes

Afin de déterminer l'effet des cristaux d'apatite utilisés dans le cadre des ingénieries osseuses sur des ostéoblastes, ces cellules ont été soumises à des traitements avec des cristaux d'hydroxyapatite de différentes tailles. Les résultats montrent que suivant la taille des particules, le profil protéomique des ostéoblastes est différent et que des gènes différents sont stimulés mais qu'en majorité, ce sont des gènes impliqués dans le métabolisme calcique qui

ont une expression stimulée par les cristaux (551). Cependant, cette étude n'explore pas les mécanismes qui sont mis en jeu au cours de la régulation de l'expression des gènes. D'autre part, sans préciser la nature des particules d'hydroxyapatite utilisées, Sun et *al.* observent une différence de réponse des ostéoblastes selon la taille des cristaux utilisée (552). Ainsi en présence de petites particules de l'ordre de 53 μm ou moins, les cellules prolifèrent moins et sécrètent moins de TGF- β 1 (552). Une autre étude a montré des effets dose dépendants et ostéogéniques des cristaux octocalciques sur des cellules du stroma médullaire de souris (553). Les mécanismes impliqués dans la réponse aux cristaux des ostéoblastes ne sont pas connus, cependant il a été montré que des cellules ostéoblastiques primaires et des lignées MC3T3-E1 mises en présence de particules synthétiques d'hydroxyapatite les endocytèrent (554). Aucun autre mécanisme d'endocytose n'a été décrit à notre connaissance dans les ostéoblastes en réponse à des cristaux, contrairement à ce qui a été montré se produire dans les chondrocytes ou dans des cellules non squelettiques.

Peu de données sont disponibles concernant l'effet de cristaux d'hydroxyapatite sur les ostéoblastes au niveau moléculaire. Une étude *in vitro* menée sur des MC3T3-E1 a exploré l'expression des gènes en réponse à de l'hydroxyapatite par une approche de puces à ADN. Les auteurs ont montré que l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme du calcium ou dans la formation de la matrice osseuse était stimulée en réponse aux cristaux (555). De plus, les résultats montrent également que la voie ERK1/2 est activée en réponse à l'hydroxyapatite.

4.4.2 Sur les autres cellules

Il n'existe pas de modèle physiologique d'interaction entre cellules et cristaux dans la littérature. En revanche, de nombreuses situations pathologiques impliquant différents types de cristaux ont été décrites. Nous nous focaliserons sur les effets des cristaux de phosphate de calcium basiques (BCP) comprenant les octocalciums de phosphate (OCP), les carbapatites (CA) et les hydroxyapatites (HA). Ces cristaux sont impliqués principalement dans l'arthrose, mais également dans les calcifications ectopiques des tissus mous, l'athérosclérose, le cancer du sein ou dans d'autres arthropathies dégénératives (556). L'un des premiers effets observés sur un modèle de fibroblastes humains était une augmentation de concentration de calcium intracellulaire par des BCP (557). La même équipe a ensuite montré que les cristaux de BCP étaient capables de favoriser l'endocytose de petits peptides ou de fragments d'ADN qui

pouvaient être à l'origine des pathologies associées aux cristaux (558). Par la suite, il a été montré que les BCP avaient un effet mitogène *in vitro* sur plusieurs lignées cellulaires telles que les lignées fibroblastiques, chondrocytaires ou macrophagiques. Il a été suggéré que cet effet nécessitait l'endocytose et la dissolution intracellulaire des cristaux. Cet effet passerait par une stimulation de la PLC qui conduirait à une augmentation de la concentration de PKC et de DAG dans les cellules (559). En plus de cet effet mitogène, Cheung *et al.* ont montré que les BCP stimulaient l'expression des métalloprotéinases, qui sont des protéases capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire dans des cellules fibroblastiques et des chondrocytes (560). Parallèlement, les BCP inhibent l'expression des inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMP) (561). L'endocytose des cristaux s'avère également nécessaire dans ces effets des cristaux. L'utilisation du phosphocitrate, connu comme étant un inhibiteur de la formation et de l'endocytose des cristaux (562), bloque la réponse des cellules aux cristaux (561). Les voies impliquant la PKC et ERK1/2, ainsi que les facteurs de transcription de la famille AP-1 (c-fos et c-jun), ont été identifiées dans la médiation de ces effets (563). Plus précisément, l'implication des différents isoformes des PKC dans l'activation des MMP a été examinée et il a été montré que le PKC α agissait via une voie dépendante du calcium tandis que le PKC μ activait la voie ERK1/2 indépendamment du calcium (564). De plus, il a été montré que non seulement les cristaux phosphocalciques mais d'autres cristaux tels que les cristaux d'oxalate de calcium également impliqués dans différentes pathologies articulaires ou rénales, pouvaient médier leurs effets via leur endocytose par les cellules macrophagiques, fibroblastiques (565) ou rénales (566). Les cristaux de BCP, retrouvés lors de cancers du sein, favorisent la mitogenèse et augmentent les niveaux de COX-2, du PGE2 et de MMP dans les lignées cellulaires tumorales humaines Hs578T. L'utilisation du phosphocitrate bloque ces effets médiés par les cristaux. Ces études suggèrent que ces cristaux peuvent amplifier le processus pathologique du cancer du sein (556).

Par ailleurs, une étude a montré que selon le type des cristaux de BCP (l'OCP, le CA ou l'HA) présent dans le liquide articulaire, les effets sur les chondrocytes articulaires sont différents. Ainsi, les cristaux OCP et CA sont responsables de la synthèse de monoxyde d'azote NO via les voies p38 et JNK, tandis que les HA n'ont pas d'effet sur les chondrocytes articulaires (567). Selon les types cellulaires, les cristaux n'activent pas les mêmes voies de signalisation intracellulaire et n'ont pas le même effet sur les cellules. Ainsi, d'autres études qui se sont penchées sur les particules d'HA dans les macrophages/monocytes, ont montré que selon la forme de ces particules (en aiguille ou sphérique), les réponses cellulaires étaient différentes. Ainsi, il a été montré que les cristaux en forme d'aiguille provoquaient la plus

forte production de cytokines inflammatoires, et de production de MMP par les macrophages (568). Ces particules d'HA sont d'ailleurs les cristaux majoritairement retrouvés dans l'intima des artères lors de l'athérosclérose et sont associées avec les phénomènes inflammatoires observés au cours de cette pathologie. Des études ont montré dans un modèle de cellules épithéliales de reins que les cristaux d'HA adhéraient aux cellules via des résidus d'acide sialique présents à la membrane, et ainsi que ces résidus agissaient comme des récepteurs de cristaux (569). De plus, Ea *et al.* ont montré que les microcristaux de BCP entraînaient l'apoptose de chondrocytes suite à la phagocytose et l'interaction des cristaux avec l'Anx V, et que ce phénomène apoptotique nécessitait une dissolution intralysosomale des cristaux (260). Il a également été montré que les cristaux stimulent les cellules via des mécanismes autres que l'endocytose des cristaux. Ainsi, les cristaux contenant du calcium et les cristaux de monosodium urate médient leurs effets dans les chondrocytes articulaires non seulement par endocytose et dissolution intracellulaire des cristaux mais également en interagissant avec des mécanorécepteurs ou des récepteurs Toll-like 2 et 4 (570) ou la protéine CD-14 (571).

Chapitre II : Effets du phosphate inorganique sur la différenciation des cellules ostéoblastiques et analyse des mécanismes moléculaires impliqués

Article 2:

Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1

Julien M. *, Khoshniat S. *, Lacreusette A., Gadius M., Bozec A., Wagner EF., Wittrant Y, Masson M., Weiss P., Beck L., Magne D., Guicheux J.

J Bone Miner Res. 2009 Nov ; 24 (11): 1856-68.

*co-premiers auteurs

Article 3 :

Phosphate-dependent Stimulation of MGP and OPN Expression in Osteoblasts *via* the Erk1/2 Pathway is modulated by Calcium

Khoshniat S., Julien M., Bourguine A., Petit M., Rouillon T. , Masson M., Gadius M., Weiss P., Beck L., Guicheux J.

Soumis Cell Research Journal, 2010

I. PROBLEMATIQUE

Le processus de différenciation des cellules ostéoblastiques et des chondrocytes de la plaque de croissance conduisant à la formation osseuse est une succession d'évènements coordonnés dans le temps et l'espace. Ce processus aboutit finalement à la création d'une matrice minéralisée qui est principalement composée de protéines collagéniques, non collagéniques et de cristaux d'apatite. Au cours de cette différenciation, les cellules squelettiques sont exposées à des concentrations variables en Pi. L'importance du Pi en tant que molécule de signalisation capable d'activer des voies de signalisation et de réguler l'expression de nombreux gènes est aujourd'hui bien établie. Des études antérieures ont montré que le Pi était impliqué dans la différenciation, l'apoptose et la minéralisation des chondrocytes de la plaque de croissance (35, 292) et des ostéoblastes (220, 503). Ainsi, des analyses de puces à ADN effectuées sur des ostéoblastes ont montré que le Pi régulait positivement ou négativement un certain nombre de gènes (503). Plus particulièrement, il a été montré que le Pi stimule l'expression de la protéine gla matricielle (MGP) (292) et de l'ostéopontine (OPN) (498) via la voie ERK1/2 des MAP kinases dans les chondrocytes de la plaque de croissance et les ostéoblastes respectivement. L'OPN et la MGP et sont deux protéines matricielles impliquées dans la régulation de la minéralisation. Ces protéines sont synthétisées par différents types cellulaires dont les cellules musculaires lisses des vaisseaux et les ostéoblastes (93, 293, 311, 312). Des souris invalidées pour l'OPN et la MGP présentent respectivement des os plus minéralisés que ceux des souris témoins (322) et des calcifications ectopiques, notamment au niveau de la plaque de croissance et des artères, entraînant la mort au bout de un à trois mois (572). Par ailleurs, il a été montré que l'expression de la MGP pouvait être régulée par un facteur de transcription de la famille AP-1 nommé Fra-1 (93). Ainsi, des souris délétées pour Fra-1 développent une ostéopénie avec une réduction de l'expression de la MGP associée à une perte de masse osseuse progressive tandis que des souris transgéniques surexprimant ce facteur de transcription ont un phénotype opposé. Fra-1 est l'un des quatre membres de la famille Fos, qui comprend également les protéines c-Fos, FosB et Fra-2. Ces protéines peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec des membres de la famille Jun (c-Jun, JunB et JunD) et se lier à une séquence consensus TGA(C/G)TCA, ce qui permet d'activer la transcription de gènes. De plus, il a été montré que ces différents membres de la famille AP-1 subissent des modifications post-traductionnelles pour être actifs, et notamment une phosphorylation par certains membres de la famille des MAPK dont ERK1/2. L'hypothèse

selon laquelle Fra-1 régulerait directement l'expression de la MGP est supportée par le fait que des sites putatifs de liaison pour des facteurs de la famille AP-1 ont été mis en évidence sur le promoteur de la MGP (573).

Dans ce contexte, les objectifs de ce premier travail ont consisté à mieux comprendre les effets régulateurs du Pi sur l'expression de la MGP dans les cellules ostéoblastiques ainsi que les mécanismes intracellulaires mis en jeu au cours de cette régulation. L'utilisation de la technique d'immunoprécipitation de la chromatine et d'ostéoblastes provenant de souris délétées pour Fra-1 nous ont permis d'évaluer l'implication du facteur de transcription Fra-1 dans les effets du Pi sur la régulation de l'expression de la MGP. Les données obtenues lors de cette étude ont fait l'objet d'un premier article publié dans le *Journal of Bone and Mineral Research* (article 2).

Nous avons ensuite souhaité comprendre les mécanismes en amont impliqués dans la stimulation de la phosphorylation de ERK1/2 et de l'expression de la MGP ainsi que de l'OPN en réponse au Pi dans les ostéoblastes. L'environnement des ostéoblastes est riche en phosphate et en calcium du fait du remodelage osseux permanent qui conduit à la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. Or le calcium, comme il a été mentionné pour le Pi précédemment, est largement décrit en tant que molécule de signalisation impliquée dans la différenciation de nombreux types cellulaires. Dans de nombreux cas, cet ion agit par l'intermédiaire de récepteurs à protéine G, les récepteurs sensibles au calcium, afin de mener ses effets dans les cellules. Par ailleurs, les ions phosphate et calcium ont la possibilité de former dans des conditions favorables des précipités de phosphate de calcium. Il a été montré que dans certaines situations pathologiques, différents types de cristaux (cristaux de phosphate de calcium basique ou cristaux de monosodium urate) pouvaient être à l'origine de l'activation de voies de signalisation telles que celles des MAPK et pouvaient conduire à la stimulation de l'expression de certains gènes. Cependant, les mécanismes d'activation de ces voies ne sont pas clairement identifiés et nécessitent d'être explorés.

Ces données nous ont conduits à nous demander d'une part quelle était l'implication des ions calcium et/ou des précipités de phosphate de calcium dans les effets cellulaires dépendant du Pi et d'autre part quels pouvaient être les mécanismes mis en jeu dans ces effets. L'utilisation d'un agoniste des récepteurs sensibles au calcium, le gadolinium, et d'un inhibiteur des protéines G, la toxine pertussique, nous a permis d'évaluer l'implication de récepteurs sensibles au calcium dans les effets du Pi. De plus, l'utilisation de précipités de phosphate de calcium exogènes, ainsi que des inhibiteurs de la formation et de l'endocytose des cristaux, ont été utilisés afin de déterminer l'action de ces précipités dans les effets observés sur la

phosphorylation de ERK1/2 et l'expression des gènes dans notre modèle. Les résultats provenant de ces études ont permis la soumission d'un papier dans Cell Research Journal (article 3).

1.1 Article 2 : Rôle de ERK1/2 et Fra-1 dans la stimulation de l'expression de la MGP par le phosphate dans les ostéoblastes

RESUME

Le phosphate inorganique (Pi) et la protéine Gla matricielle MGP (Matrix Gla Protein) sont des régulateurs majeurs de la minéralisation. Récemment, nous avons montré que le Pi régule l'expression de la MGP dans les chondrocytes de la plaque de croissance via la voie MAP kinase ERK1/2, ce qui représenterait un rétrocontrôle négatif de la minéralisation. De plus, la délétion génique du facteur de transcription Fos-related antigen-1 (Fra-1) entraîne une ostéopétrose, tandis que les souris transgéniques surexprimant Fra-1 présentent au contraire une ostéopénie et une augmentation de l'expression de la MGP. Ceci suggère que la MGP pourrait être une cible de Fra-1. Dans ce contexte, les objectifs de cette étude étaient de déterminer si le Pi régule l'expression de la MGP dans les ostéoblastes et d'analyser le rôle de ERK1/2 et Fra-1 dans cette régulation. La lignée cellulaire murine ostéoblastique, MC3T3-E1, ainsi que des ostéoblastes primaires isolés à partir de calvaria de souris nouveaux-nés ont été utilisés. Les résultats montrent que le Pi stimule l'expression de la MGP et Fra-1 au niveau de l'ARNm et de la protéine. Nous avons également montré que le Pi stimulait la phosphorylation de ERK1/2. L'U0126, un inhibiteur de MEK1/2, inhibe la stimulation de l'expression de la MGP et de Fra-1 en réponse au Pi, ce qui indique que ERK1/2 est impliqué dans la régulation de l'expression de ces gènes en réponse au Pi. Afin de mettre en évidence une relation entre Fra-1 et la MGP, nous avons testé les effets du Pi sur la liaison de Fra-1 au niveau du promoteur de la MGP. Dans un premier temps, l'analyse par la technique du NoShift nous a permis de vérifier que Fra-1 est capable de se lier *in vitro* aux différents sites putatifs de liaison pour des facteurs de la famille AP-1 présents sur le promoteur de la MGP. L'analyse menée sur des MC3T3-E1 par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) indique que le Pi augmente la liaison de Fra-1 sur le promoteur de la MGP en position -3402 et -3079/3058, ce qui indique que ce facteur de transcription pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression de la MGP par le Pi. De plus, l'effet du Pi sur l'expression de la MGP a été étudié d'une part dans des MC3T3-E1 dans lesquelles l'expression de Fra-1 était abolie par une approche d'ARN interférence, et d'autre part dans des ostéoblastes primaires provenant de souris délétées pour Fra-1. Les résultats montrent que dans ces cellules, l'expression de la MGP n'est pas stimulée en réponse au Pi. En conclusion, nos données

suggèrent pour la première fois que le Pi stimule l'expression de MGP dans les ostéoblastes via ERK1/2 et Fra-1.

Phosphate-Dependent Regulation of MGP in Osteoblasts: Role of ERK1/2 and Fra-1

Marion Julien,^{1,2} Solmaz Khoshniat,^{1,2} Aline Lacreusette,³ Maithé Gatus,¹ Aline Bozec,⁴ Erwin F. Wagner,⁴
Yohann Wittrant,¹ Martial Masson,¹ Pierre Weiss,¹ Laurent Beck,⁵ David Magne,⁶ and Jerome Guicheux¹

ABSTRACT: Inorganic phosphate (Pi) and the matrix Gla protein (MGP) are key regulators of bone formation. We have recently shown that Pi upregulates MGP in growth plate chondrocytes, which may represent a negative feedback loop for the control of mineralization. Osteoblasts from Fra-1–deleted mice express low levels of MGP, whereas the expression of MGP is elevated in Fra-1 transgenic osteoblasts, suggesting a role for Fra-1 in MGP expression and bone formation. In this study, we aimed at deciphering the relationships between Pi and MGP in osteoblasts to determine the molecular mechanisms involved in the Pi-dependent regulation of MGP. In MC3T3-E1 cells and primary calvaria-derived osteoblasts, Pi increased MGP and Fra-1 expression at both the mRNA and protein levels. We also found that Pi enhanced the phosphorylation of ERK1/2. U0126 (MEK1/2 inhibitor) suppressed Pi-stimulated MGP and Fra-1 expression, indicating that ERK1/2 is required for Pi-dependent regulation of MGP and Fra-1. In addition, using *in vitro* DNA binding and chromatin immunoprecipitation assays, we showed that Fra-1 interacts with the MGP promoter in response to Pi in MC3T3-E1 cells. Finally, we found that in fra-1 knockdown MC3T3-E1 osteoblasts, the level of MGP expression is no more significantly upregulated by Pi. We further showed that primary osteoblasts from Fra-1–deficient mice failed to exhibit a Pi-dependent stimulation of MGP expression. These data show, for the first time, that Pi regulates MGP expression in osteoblasts through the ERK1/2–Fra-1 pathway.

J Bone Miner Res 2009;24:1856–1868. Published online on May 4, 2009; doi: 10.1359/JBMR.090508

Key words: osteoblast, phosphate, matrix gla protein, MAP kinase

Address correspondence to: Jérôme Guicheux, PhD, INSERM, U 791, Laboratoire d'Ingénierie des Tissus Ostéo-Articulaires et Dentaires (LIOAD), 1 Place Alexis Ricordeau, Nantes 44042, France, E-mail: jerome.guicheux@inserm.fr

INTRODUCTION

IN VIVO BONE formation progresses through distinctive developmental stages that include commitment of mesenchymal-derived cells to the osteoblast lineage, proliferation of osteoblast precursors, expression of the differentiated osteoblast phenotype, and ultimately, formation of mineralized extracellular matrix by terminally differentiated osteoblasts and osteocytes.

It is assumed that inorganic phosphate (Pi) plays a key role in extracellular matrix mineralization and is able to induce calcium deposition *in vitro*.^(1,2) A role for Pi in osteoblast differentiation has also been suggested with respect to anabolic or catabolic effects on bone structure and bone metabolism both *in vitro*⁽³⁾ and *in vivo*.^(4,5) Recently, Pi has been shown to act as a signaling molecule responsible for altering the expression of various genes during osteoblast differentiation.^(6–8) Despite the large body of evidence indicating a role for Pi in the regulation of mineralization-associated genes, few studies have analyzed the molecular mechanisms by which Pi may control gene expression. Specific signaling pathways involved in the

regulation of osteopontin (OPN) in response to Pi have been identified in osteoblastic MC3T3-E1 cells.⁽⁶⁾ Although the regulation of OPN⁽⁶⁾ or osteocalcin (OCN)⁽⁸⁾ by Pi has not yet been linked to a physiological role of OPN or OCN in the calcification process, these extracellular matrix proteins are well acknowledged as regulators of mineralization.^(9,10) Among the extracellular matrix proteins that have been reported to regulate osteoblast-dependent mineralization, matrix Gla protein (MGP) is one of the most potent inhibitors of calcification.^(11,12) MGP has been found to be expressed in mineralizing tissues including bone, cartilage, and tooth cementum,^(13–15) and in soft tissues such as kidney, lung, and heart.^(16,17) It is well established that MGP is a potent inhibitor of mineralization in both bony and ectopic sites. Mice deficient for MGP show severe vascular calcification, premature mineralization of long bones, and osteopenia.⁽¹²⁾ Other evidence that MGP functions as a regulator of mineralization comes from experiments performed with transgenic mice overexpressing MGP in osteoblasts under the control of the α -1(I)-collagen promoter.⁽¹⁸⁾ These mice exhibit a decrease in intramembranous bone mineralization.⁽¹⁸⁾

Despite the importance of MGP as an inhibitor of calcification and its potential role in vascular calcification,

The authors state that they have no conflicts of interest.

¹INSERM, U 791, Laboratoire d'Ingénierie des Tissus Ostéo-Articulaires et Dentaires (LIOAD), Groupe "Physiopathologie des Tissus Squelettiques et Ingénierie du Cartilage," Nantes, France; ²These authors contributed equally to this work; ³INSERM, U601, Centre de Recherche en Cancérologie, Nantes, France; ⁴Institut de Recherche en Pathologie Moléculaire (IMP), Vienne, Autriche; ⁵INSERM, U 845, Centre de Recherche "Croissance et Signalisation," Université Paris Descartes Site Necker, Paris, France; ⁶EA2603, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Boulogne-sur-mer, France.

little is known about its regulation. We recently showed that MGP is stimulated by Pi in growth plate chondrocytes, at least in part through the ERK1/2 signaling pathway.⁽¹⁹⁾ Transcription factors controlling MGP expression have not been identified. The human and murine MGP promoters have been cloned and sequenced.^(20,21) A number of putative consensus sequences for known transcription factors have been identified including binding sites for AP-1 (activating protein-1) transcription factors.⁽²⁰⁾ The AP-1 proteins are composed of transcription factors belonging to Jun, Fos, ATF/CREB (activating transcription factor/cAMP-response element-binding protein), and MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma) families.⁽²²⁾ In mammalian cells, the main AP-1 proteins are composed of three members of the Jun family (*c-jun*, JunB, and JunD) and four members of the Fos family (*c-fos*, FosB, Fra-1, Fra-2). Both family members can form Jun/Jun homodimers or Fos/Jun heterodimers, which, when bound to a recognition sequence, can activate gene transcription.⁽²³⁾ Fos and Jun proteins can also form heterodimers with ATF/CREB family proteins.^(24,25) The activation of AP-1 transcription factors is caused by increased expression of Fos and Jun proteins but also by post-translational modification by phosphorylation that can be mediated by MAPK.^(26,27)

There is mounting evidence suggesting that Fra-1 may be a key regulator of MGP expression and Pi may modulate Fra-1 expression. Mice deficient in Fra-1 show reduced expression of MGP mRNA in both calvarial osteoblasts and long bones,⁽²⁸⁾ whereas transgenic mice overexpressing Fra-1 show increased MGP mRNA expression.⁽²⁸⁾ In addition, a combined microarray and proteomic analysis performed in osteoblastic MC3T3-E1 cells suggested that Pi stimulates Fra-1 expression.⁽²⁹⁾ In this context, and to better understand the role of Pi in bone-forming cells, we studied the molecular mechanisms involved in the regulation of Pi-induced MGP expression. In addition, to obtain new insights into a possible role of MAPK and Fra-1 in the regulation of osteoblastic activity, we sought to determine whether ERK1/2 and Fra-1 are involved in Pi-regulated MGP expression.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell culture plasticware was purchased from Corning-Costar (Corning BV Life Sciences, Schiphol-Rijk, The Netherlands). FCS was obtained from Dominique Dutscher (Brumath, France). α MEM, MEM, L-glutamine, penicillin and streptomycin (P/S), trypsin/EDTA, TRIzol reagent, deoxyribonuclease I (DNase I), deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs), *Taq* DNA polymerase, NuPAGE 4–12% Bis-Tris gel, PVDF (polyvinylidene difluoride) Invitrolon membrane, and protein G-sepharose were obtained from Invitrogen (Paisley, UK). Anisomycin, cycloheximide, collagenase type II, irrelevant rabbit IgG, and salmon sperm DNA were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). U0126 was purchased from CalBiochem (Merck Eurolab). Avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase (AMV-RT),

random hexaprimers, and recombinant ribonuclease inhibitor (RNasin) were purchased from Promega (Madison, WI, USA). Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix was obtained from Stratagene Europe (Amsterdam Zuidoost, The Netherlands). NucBuster protein extraction and NoShift transcription factor assay kits were purchased from Novagen (Darmstadt, Germany).

Protein content was determined using the Pierce Coomassie plus assay (Pierce, Rockford, IL, USA). The anti-phospho-ERK1/2 (9101), phospho-JNK1/2 (9251), phospho-p38 (9211), ERK1/2 (9102), p38 (9212), JNK1/2 (9252), and anti-rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)-linked (7074) and anti-mouse IgG HRP-linked (7076) antibodies were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). The anti-MGP antibody was purchased from Alexis (Lausen, Switzerland). The anti-actin antibody was obtained from Chemicon International (Hampshire, UK). The anti-Fra-1 antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Europe, Heidelberg, Germany). The Western blot detection system was obtained from GE, Healthcare (Buckinghamshire, UK). Specific shRNA sequences for Fra-1, scrambled sequences, and the SureSilencing shRNA plasmids (pGeneClip™ Neomycin Vector) were obtained from Promega. Lipofectamine and G418 were from Invitrogen.

All other chemicals were from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

Cells and culture conditions

MC3T3-E1 cells were seeded at 10,000 cells/cm² and cultured for 10 days in α MEM containing 10% FCS, 1% P/S, and 1% L-glutamine. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air, and the medium was replaced every 2 days. Pi or fresh culture medium containing 20% FCS was added 24 h after incubation in MEM (containing 1 mM Pi) with low serum levels (0.5%). Pi (9mM) was added as a mixture of NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄ (pH 7.2) as previously described.⁽¹⁹⁾ U0126 or cycloheximide were added 1 h before Pi treatment, and an equivalent amount of DMSO was used as a control.

Primary mouse osteoblasts were prepared from calvaria of 3-day-old mice as previously described.⁽³⁰⁾ Calvaria were removed from the animals under aseptic conditions and incubated in PBS containing 4 mM EDTA at 37°C for 30 min under continuous agitation. The supernatant was discarded, and α MEM containing 3 mg/ml type II collagenase was added. Calvaria were subjected to five sequential enzymatic digestions, each conducted at 37°C for 20 min. Cells from fractions 1–2 and 3–5 were pooled, centrifuged, and resuspended in α MEM containing 10% FCS, 1% P/S, and 1% L-glutamine. Cells were seeded at a density of 15,000 cells/cm² in α MEM containing 10% FCS, 1% P/S, and 1% L-glutamine and cultured until confluence at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. The medium was replaced every 2 days. Cultures were treated with Pi 24 h after incubation in MEM containing low serum levels (0.5%). Primary osteoblasts were also prepared from calvaria of wildtype and *fra-1*^{ΔΔ} mice as previously reported⁽²⁸⁾ and cultured as described above.

RNA isolation

Cells were seeded in 25-cm² flasks for RNA isolation. Total RNA was extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. Briefly, lysis of the cells in TRIzol was followed by centrifugation at 10,000g for 15 min at 4°C in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected, and the RNA was precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 7500g for 5 min at 4°C. RNA pellets were washed with cold 75% ethanol, dried, reconstituted in sterile water, and quantified by spectrometry.

Reverse transcription and real-time PCR

After DNase I digestion, RNA samples (1 µg) were reverse transcribed using AMV-RT and random hexamer primers in a total volume of 30 µl. Real-time quantitative PCR was performed in the Mx 3000P System (Stratagene) using Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix according to the manufacturer's recommendations. The following temperature profile was used: 40 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 60°C, and 30 s at 72°C. Expression of the target gene was normalized to β-actin levels. The δCt (cycle threshold) method was used to calculate relative expression levels, as previously described.⁽¹⁹⁾ The sequences of primers (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) were as follows—mouse MGP cDNA: 5'-TCAACAGGAGA AATGCCAACAC-3' (forward) and 5'-CGGTTGTAGG CAGCGTTGT-3' (reverse) generating a 178-bp fragment. Mouse OPN cDNA: 5'-AAGCAGACACTTTCCTCCA ATCG-3' (forward) and 5'-TGACCTCAGTCCATAAG CCAAGC-3' (reverse) generating a 83-bp fragment. Mouse β-actin cDNA: 5'-AGTTCTACAAATGTGGCTGAGGAC-3' (forward) and 5'-TTTGGGAGGGTGAGGGACTTC-3' (reverse) generating a 131-bp fragment. Mouse Fra-1 cDNA: 5'-TGACCACACCCTCTCTGACTCC-3' (forward) and 5'-TCGCCACTGCTGCTGCTAC-3' (reverse) generating a 109-bp fragment.

Western blotting

As previously described,⁽¹⁹⁾ cells were rapidly frozen in liquid nitrogen before lysis at 4°C and conserved at -80°C until use. Cells were lysed by addition of a RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM potassium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 20 mM β-glycerophosphate, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, and 1 mM NaF). The insoluble material was pelleted at 12,000g for 10 min at 4°C. The protein concentration of cell lysates was determined with a Pierce Coomassie plus protein assay. Twenty micrograms of total protein was resolved by SDS-polyacrylamide gels. After electrophoresis, proteins were transferred to a PVDF membrane according to the manufacturer's protocol. Membranes used for immunodetection of JNK1/2 and phospho-JNK1/2 were blocked in 5% nonfat dry milk in PBS/Tween20 and probed in 5% BSA in PBS/Tween20. For all other antibodies, membranes were blocked and probed in 5% nonfat dry milk in PBS/Tween20. The ERK1/2, phospho-ERK1/2, p38, phospho-p38, JNK1/2, phospho-JNK1/2,

TABLE 1. Forward (fw) and Reverse (Rev) Oligonucleotide Sequences Used for the NoShift Assay

Oligonucleotide	Sequence
fw AP-1	5'-TGTCTCTGACTCCCCGGGGA-3'
rev AP-1	3'-ACAGAGACTGAGGGGCCCT-5'
fw -4714	5'-TACACTATGACTCATAACAG-3'
rev -4714	3'-ATGTGATACTGAGTATTGTC-5'
fw -4387	5'-ATAGACTTGAGTCAATAAAG-3'
rev -4387	3'-TATCTGAACTCAG TTATTC-5'
fw -3402	5'-AGATGGATGAGTGAGTGGGT-3'
rev -3402	3'-TCTACCTACTCACTCACCCA-5'
fw -3079	5'-GACAGATGATTCAG AATTTA-3'
rev -3079	3'-CTGTCTACTAAGTC TAAAT-5'
fw -3058	5'-GTTATCTGAGTTA GGAAAC-3'
rev -3058	3'-CAATAGACTCAAT CCTTTG-5'
fw -2130	5'-GGCTTGTGAGTAATGTTTAC-3'
rev -2130	3'-CCGAACACTCATTACAAATG-5'
fw -1552	5'-TGATACTGATTCAATCCCTG-3'
rev -1552	3'-ACTATGACTAAGTTAGGGAC-5'
fw -816	5'-GTCTCTGACTCCCCGGGAG-3'
rev -816	3'-CAGAGACTGAGGGGCCCTC-5'
fw scrambled	5' AACAGGCTTACCGGGAGGC 3'
rev scrambled	3'-TTGTCCGAGATGGCCCTCCG-5'

Numbers indicate the location of the AP-1 binding sites found in the murine MGP promoter.

AP-1, AP-1 consensus sequence.

and Fra-1 antibodies were diluted 1/1000, the MGP antibody was diluted 1/500, and the actin antibody was diluted 1/2000. Primary antibodies were detected using anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies diluted 1/2000 in 5% nonfat dry milk in PBS/Tween20. The blots were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) development using a Western blotting detection system.

Nuclear extract preparation and NoShift transcription factor assay

The nuclear extracts from MC3T3-E1 cells were prepared with the NucBuster Protein Extraction kit according to the manufacturer's instructions. An ELISA-based EMSA was carried out using the NoShift transcription factor assay kit according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 1 µl of Pi-treated and untreated nuclear extracts from 1.10⁷ cells were incubated on ice for 30 min with consensus or specific biotinylated AP-1 sequences (10 pmol), together with 500 ng salmon sperm DNA and 0.01U Poly(dI-dC) in 5 µl of 4× NoShift binding buffer. Simultaneously, a competition assay was performed with a 50-fold molar excess (500 pmol) of nonbiotinylated AP-1 consensus sequence added before the addition of extracts. After incubation at 37°C for 1 h on streptavidin-coated microassay plates, samples were treated with an anti-Fra-1 antibody for 1 h. The bound antibodies were finally detected with a specific secondary HRP-conjugated antibody. The TMB specific substrate was finally added for an optical density reading at 450 nm. The sequences of the 3' end biotinylated oligonucleotides used are given in Table 1.

TABLE 2. Primers Used for ChIP Analysis

Primer	Position	Annealing temperature (°C)	Amplicon (bp)	Sequence
m fp AP-1 816	-816	60	214	5'-AGTCAAGGGTAAACGGCACAGG-3'
m rp AP-1 816		60		5'-CTCTCGGGCTGATGGCACTG-3'
m fp AP-1 1552	-1552	60	75	5'-CCAGCCACACAACCTGATGATAC-3'
m rp AP-1 1552		60		5'-ACCATAGGAGCATTGGGACTGTAG-3'
m fp AP-1 2130	-2130	60	178	5'-TGGTGTATGAGTGGCTTGTGAG-3'
m rp AP-1 2130		60		5'-TTGCTTTAATGCTGCTGTATCGG-3'
m fp AP-1 3058/3079	-3058 and -3079	60	265	5'-GTCACCTCCACTAGGTAGCAC-3'
m rp AP-1 3058/3079		60		5'-GCCCTTAGATGTACTGAAGAGACG-3'
m fp AP-1 3402	-3402	60	200	5'-TGGATGGATGGATGGATGGATGG-3'
m rp AP-1 3402		60		5'-TCAAGCAAGACTGGCAGGGTAG-3'
m fp AP-1 4387	-4387	60	202	5'-TCTGGTGTGTCTGAAGACTGTGC-3'
m rp AP-1 4387		60		5'-AAGAGAGGTAGCAAGCAGAAGCC-3'
m fp AP-1 4714	-4714	60	99	5'-AGTGGGAAATTACACCTGTGAAG-3'
m rp AP-1 4714		60		5'-TCCTAATGCCGCCGTTCTTTAAC-3'

m, mouse; fp, forward primer; rp, reverse primer.

Quantitative chromatin immunoprecipitation assay

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis was performed according to a modified protocol of upstate Biotechnology (Dundee, UK) and essentially as described previously.^(31,32) Briefly, MC3T3-E1 cells were cultured as described above. Cells underwent a 24-h Pi treatment or not (control cells) with or without preincubation with U0126. MC3T3-E1 cells were fixed, lysed, and sonicated to shear DNA. After 1 h of preclearing with 50 µl protein G-sepharose, samples were incubated overnight at 4°C with 5 µg of anti-Fra-1 antibody or irrelevant rabbit IgG in the presence of 2 µg of salmon sperm DNA. Immune complexes were recovered with 100 µl of salmon sperm DNA-saturated protein G-sepharose. After elution and purification, the ChIP-captured DNA was subjected to real-time PCR using specific primers designed to amplify fragments of the murine MGP promoter (Table 2). Primers for mouse β-actin were used as negative controls of PCR amplification. Serial dilutions of input DNA (acquired before precipitation) were used to generate a standard curve to determine the relative amount of precipitated DNA. Duplicates for standards and triplicates for the samples were simultaneously amplified, and at least two independent immunoprecipitations were analyzed.

ShRNA knockdown of Fra-1

Specific shRNA sequences for Fra-1 and its scrambled sequences were designed by Promega. ShRNA knockdown experiments were conducted with the SureSilencing shRNA plasmids according to the manufacturer's recommendations. The pGeneClip Neomycin Vector containing the shFra-1 and scrambled sequences were first amplified and then transfected into MC3T3-E1 cells using lipofectamine. After 48 h, cells were selected in αMEM supplemented with G418 (800 µg/ml). G418-resistant clones were amplified and screened by real-time PCR using specific primers for Fra-1 expression. Cells stably transfected with a scrambled nontargeting sequence have been used as negative control.

Statistical analysis

Unless stated otherwise, each experiment was performed three times with similar results. Results are expressed as mean ± SE of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed using one-way ANOVA followed by a posthoc test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significance at $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of Pi on MGP gene expression in MC3T3-E1 cells

To determine whether Pi regulates the expression of MGP in osteoblasts, we first tested the effect of Pi in MC3T3-E1 cells on day 10 at a stage when MGP is expressed⁽¹¹⁾ (Fig. 1A). MC3T3-E1 cells were treated with 10 mM Pi for up to 24 h, and MGP expression was examined by real-time PCR. Our data indicated that MGP expression was significantly stimulated after 8 h of Pi treatment compared with the control, and after 24 h of exposure to Pi, the level of mRNA encoding MGP was stimulated by >7-fold over steady-state levels compared with the control (Fig. 1A). We examined whether the changes in the MGP mRNA levels correlated to an increase in the MGP protein. MC3T3-E1 cells were treated with 10 mM Pi for 12, 24, and 32 h, and the MGP protein level was analyzed by Western blot. Immunoblots of cell lysates showed that the increase in MGP mRNA level was accompanied by an increase in MGP protein (Fig. 1B). No change in the level of actin was noted at any time point examined. To further decipher the mechanisms by which Pi stimulates MGP expression in osteoblastic cells, we questioned whether protein synthesis was required for this effect. To this end, we used an inhibitor of protein synthesis to block translation (Fig. 1C). After 24 h, Pi stimulated the level of mRNA encoding MGP in MC3T3-E1 cells; however inhibiting translation, using cycloheximide (5 µg/ml), significantly decreased Pi-stimulated MGP mRNA expression.

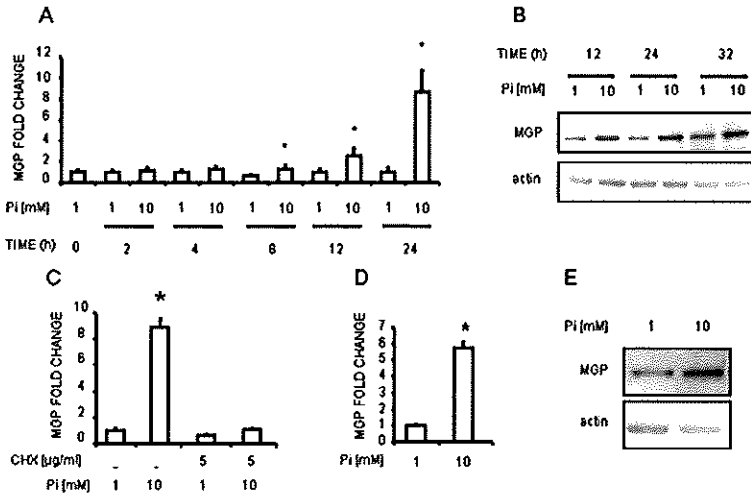


FIG. 1. Effect of Pi on MGP expression in osteoblasts. MC3T3-E1 cells (A–C) and primary mouse calvaria-derived osteoblasts (D and E) were cultured before treatment with 10 mM Pi for the indicated times (A and B) or for 24 h (C–E) in the presence or absence of cycloheximide (5 μ g/ml) (C). The effect of 10 mM Pi on MGP expression was assessed by real-time PCR (A, C, and D) and by Western blot (B and E). Real-time PCR results are reported as fold change in gene expression. Data are representative of experiments with similar results. * $p < 0.05$ compared with untreated cells.

This suggests that Pi stimulated MGP mRNA expression requires protein synthesis.

To further show the stimulatory effect of Pi, we used primary osteoblasts isolated from calvaria of newborn mice. A treatment time of 24 h, which corresponded to the maximal stimulation of MGP mRNA level in MC3T3-E1 cells, was chosen to test the effect of Pi in primary osteoblasts. Exposure of primary osteoblasts to Pi for 24 h resulted in a significant 6-fold increase in MGP mRNA expression compared with the control (Fig. 1D). Immunoblots of cell lysates showed an increase in MGP protein after Pi treatment (Fig. 1E). Taken together, these results suggest that, in both MC3T3-E1 and primary osteoblasts, Pi stimulates expression of MGP.

Effect of Pi on MAPK phosphorylation in osteoblasts

To determine whether Pi can affect the phosphorylation of MAPK in osteoblasts, we first performed a time course experiment in MC3T3-E1 cells. Our results indicated that Pi enhanced the phosphorylation of ERK1/2 as early as 30 min (Fig. 2A). The ERK1/2 phosphorylation returned to basal levels after 1 h, but the ERK1/2 stimulation was detectable again after 4 h, peaked at 8 h, and was still enhanced after 24 h. Analysis of the phosphorylation of the other MAPK showed no detectable phosphorylation of either p38 or JNK1/2 in response to Pi (Fig. 2B). To ensure that the absence of p38 and JNK1/2 phosphorylation was not caused by a technical problem, MC3T3-E1 cells were treated with anisomycin and used as a positive control.⁽³³⁾ In these conditions, a phosphorylation of p38 and JNK1/2 was observed in MC3T3-E1 cells (Fig. 2B). The phosphorylation of the various MAPK was not associated with changes in the respective basal level of MAPK, suggesting that their phosphorylation results from the stimulation of regulatory upstream kinases. To further address whether Pi may affect MAPK phosphorylation in osteoblasts, we tested the effect of Pi on MAPK phosphorylation in primary osteoblasts derived from mouse calvaria. As found in

MC3T3-E1 cells, Pi triggered a marked increase in the phosphorylation of ERK1/2 after 30 min and 24 h without affecting basal levels of ERK1/2 (Fig. 2C). Pi did not affect the phosphorylation of p38 and JNK1/2 in primary osteoblasts (data not shown).

Effect of U0126 on Pi-stimulated MGP expression in osteoblasts

To identify a possible relationship between the ERK1/2 phosphorylation and MGP gene expression induced by Pi in osteoblasts, we sought to determine the effects of U0126, a widely used inhibitor of MEK1/2, the upstream kinases of ERK1/2.⁽³⁴⁾ With respect to our previous report analyzing the role of ERK1/2 in growth plate chondrocytes, we found that 30 μ M U0126 was an optimal dose for inhibiting ERK1/2.⁽¹⁹⁾ This concentration was therefore used to evaluate the role of ERK1/2 in Pi-stimulated MGP expression in MC3T3-E1 cells and primary osteoblasts.

To confirm the inhibitory effect of U0126 on ERK1/2 phosphorylation in response to Pi, we performed Western blot analysis on Pi-stimulated MC3T3-E1 cells in the presence and absence of the inhibitor. Our results indicated that U0126 completely blocked the Pi-induced phosphorylation of ERK1/2 without affecting the basal level of ERK1/2 (Fig. 3B). We studied the effect of U0126 on the expression of MGP. Interestingly, pretreatment with U0126 completely blunted Pi-stimulated MGP expression at both the mRNA and protein level (Figs. 3A and 3B). We studied the effect of U0126 on Pi-stimulated MGP expression in primary osteoblasts. Although Pi stimulated the expression of MGP in primary osteoblasts after 24 h at both the mRNA and protein levels, pretreatment of cells with U0126 suppressed the Pi-stimulated induction of MGP at both the mRNA and protein level (Figs. 3C and 3D). The inhibitory effect of U0126 on the ERK1/2 phosphorylation in response to Pi in primary osteoblasts was also confirmed (Fig. 3D).

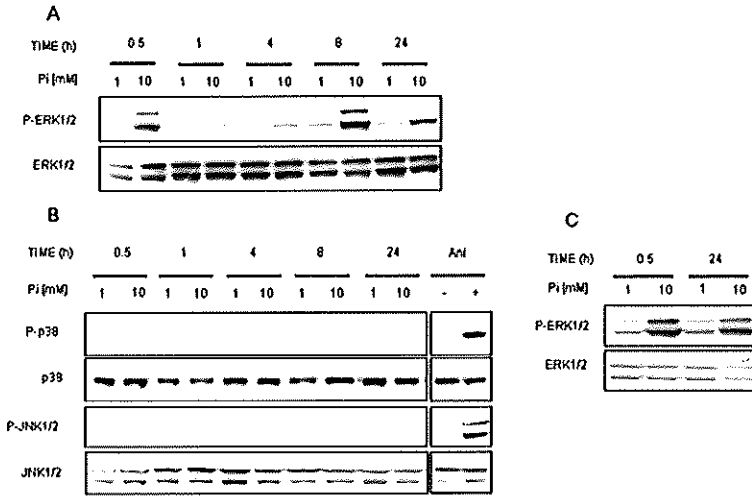


FIG. 2. Effect of Pi on MAPK phosphorylation in osteoblasts. MC3T3-E1 cells (A and B) and primary mouse calvaria-derived osteoblasts (C) were cultured before treatment with 10 mM Pi for the indicated times. Confluent MC3T3-E1 cells treated with 5 µg/ml anisomycin (Ani) for 30 min were used as a control for the phosphorylation of p38 and JNK1/2 MAPK (B). At the end of the incubation period, cells were rapidly frozen in liquid nitrogen before lysis at 4°C. The resulting samples were analyzed by Western blot using specific antibodies against P-ERK1/2, P-p38, and P-JNK1/2 or antibodies against ERK1/2, p38, and JNK1/2 as indicated. Data are representative of experiments with similar results.

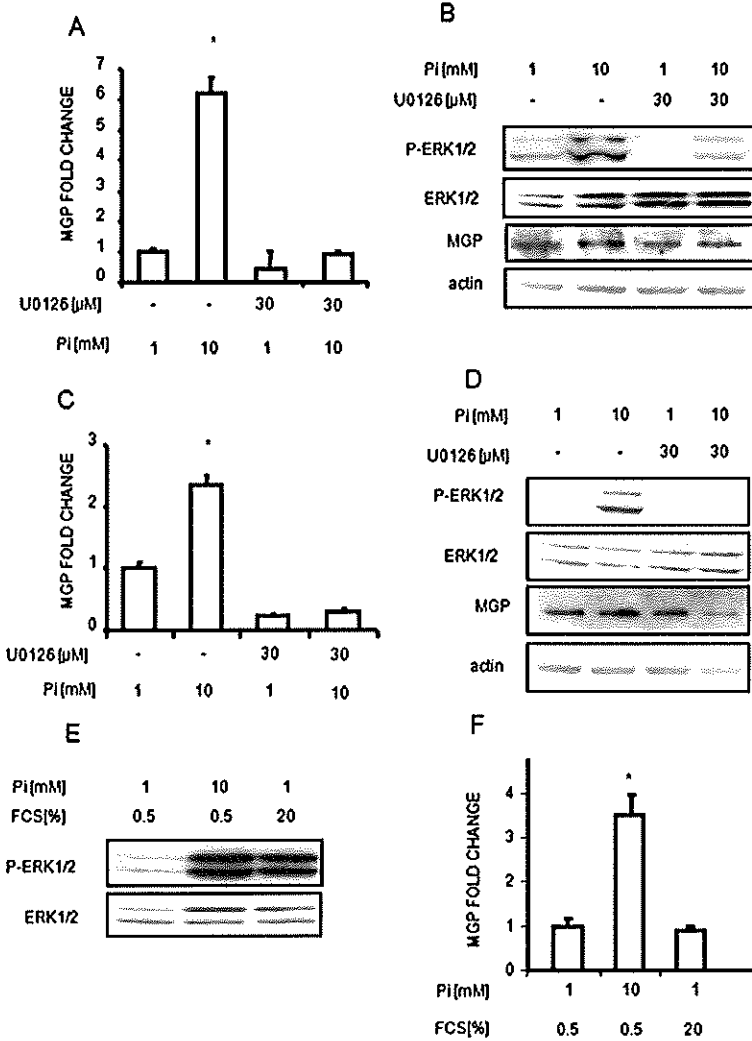


FIG. 3. Role of ERK1/2 in Pi-stimulated MGP expression in osteoblasts. MC3T3-E1 cells (A, B, E, and F) and primary mouse calvaria-derived osteoblasts (C and D) were pretreated or not with U0126 (30 µM) for 1 h followed by treatment with 10 mM Pi or 20% FCS for 24 h. ERK1/2 phosphorylation and MGP protein expression were analyzed by Western blot (B, D, and E). The expression level of MGP transcripts was assessed by real-time PCR (A, C, and F). Real-time PCR results are reported as fold change in gene expression. Data are representative of experiments with similar results. **p* < 0.05 compared with untreated cells.

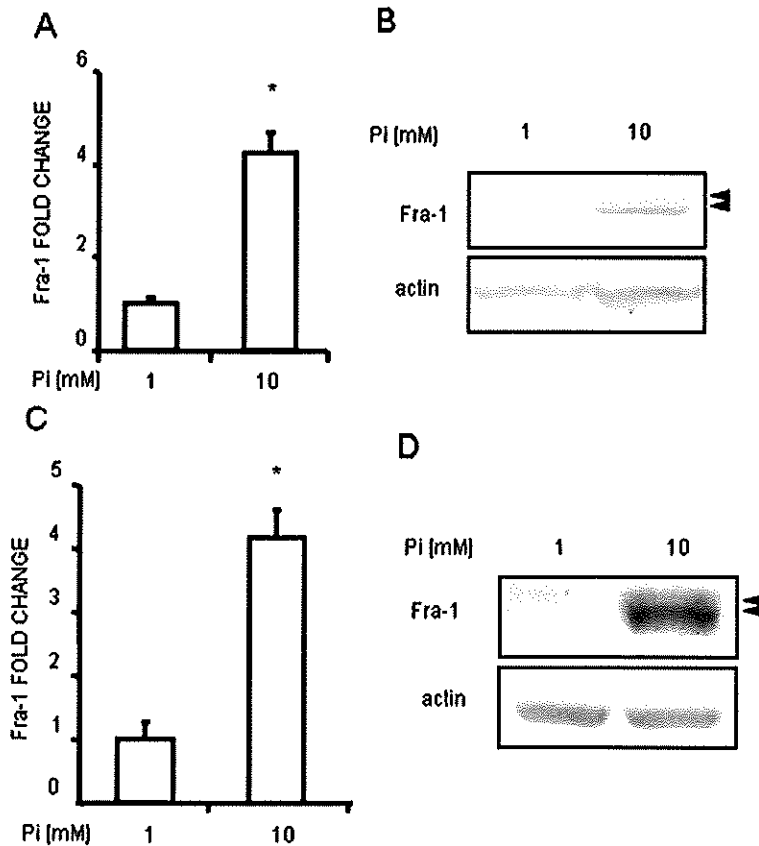


FIG. 4. Effect of Pi on Fra-1 expression in osteoblasts. MC3T3-E1 cells (A and B) and primary mouse calvaria-derived osteoblasts (C and D) were cultured before treatment with 10 mM Pi for 24 h. The effect of 10 mM Pi was assessed by real-time PCR (A and C) and Western blot (B and D). Real-time PCR results are reported as fold change in gene expression. Arrowheads indicate the phosphorylated (top band) and the unphosphorylated (bottom band) form of Fra-1. Data are representative of experiments with similar results. * $p < 0.05$ compared with untreated cells.

To determine whether a nonspecific activation of ERK1/2 could lead to a stimulation of MGP expression, we used FCS, a well-acknowledged nonspecific activator of ERK1/2 phosphorylation. As expected, the treatment of MC3T3-E1 cells with 20% FCS caused a marked increase in ERK1/2 phosphorylation (Fig. 3E), but the expression level of transcripts coding for MGP was not significantly affected (Fig. 3F).

Effect of Pi on Fra-1 expression in osteoblasts

Because MGP has been suggested as a potential target of Fra-1 in bone-forming cells,^(28,35) we sought to examine whether Fra-1 could be an intermediate protein required for the Pi-stimulated MGP expression in osteoblasts. We thus analyzed whether Pi could stimulate Fra-1 mRNA and protein expression in MC3T3-E1 cells and primary osteoblasts (Fig. 4). Our results indicate that a 24-h treatment of MC3T3-E1 cells with Pi induced a 4-fold increase in the steady-state level of mRNA encoding Fra-1 compared with the control in both MC3T3-E1 cells (Fig. 4A) and primary osteoblasts (Fig. 4C). The stimulation of Fra-1 at the mRNA level was accompanied by an increase in Fra-1 protein in the osteoblastic cell line (Fig. 4B), as well as in primary osteoblasts (Fig. 4D). Interestingly, we detected two bands of Fra-1 in response to Pi (Figs. 4B and 4D). The presence of two bands has already been described, corresponding to the presence of the phosphorylated and unphosphorylated forms of Fra-1.⁽³⁶⁾

Effect of U0126 on Pi-stimulated Fra-1 expression

We next studied whether Pi stimulates Fra-1 expression through the ERK1/2 pathway. We tested the effect of U0126 on the expression of Fra-1 at the mRNA and protein levels. Real-time PCR analysis showed that Pi stimulated the steady-state level of Fra-1 and that this effect was inhibited by U0126 in MC3T3-E1 cells (Fig. 5A). Western blot analysis indicated an increase in Fra-1 protein expression in response to Pi. The top band of Fra-1 was suppressed in the presence of U0126 (Fig. 5B), and the bottom band of Fra-1 was also slightly reduced. We analyzed the effect of U0126 in primary osteoblasts. We found similar results as those observed in MC3T3-E1 cells (Figs. 5C and 5D). Pi induced an increase in the expression of Fra-1 mRNA (Fig. 5C). This effect was blocked in the presence of U0126 (Fig. 5C). At the protein level, we observed a Pi-dependent increase in Fra-1. The top band was completely suppressed in the presence of U0126 (Fig. 5D), and the intensity of the bottom band was reduced.

Analysis of Fra-1 binding to the MGP promoter in osteoblasts

To determine whether Fra-1 can bind to AP-1 motifs in the MGP promoter, we first determined the putative AP-1 binding sites in the 5-kb sequence of the murine MGP promoter using a computer-assisted program (<http://>

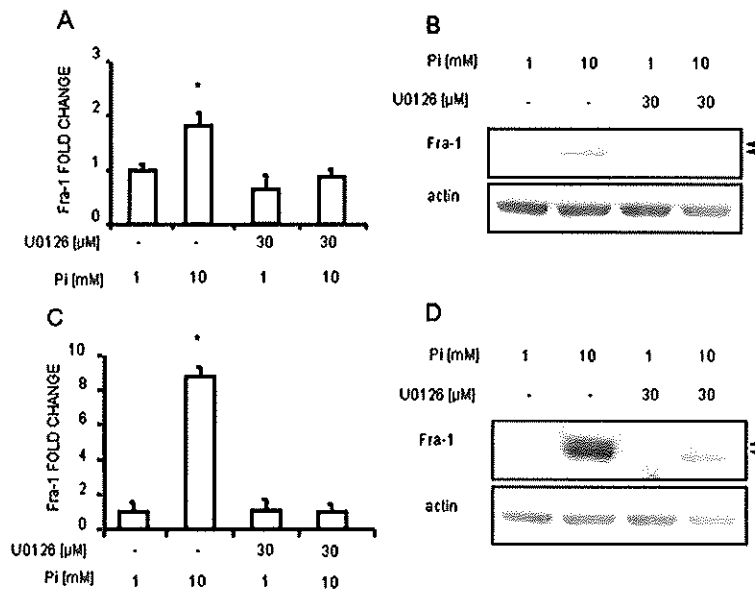


FIG. 5. Effect of U0126 on Fra-1-stimulated expression in osteoblasts. MC3T3-E1 cells (A and B) and primary mouse calvaria-derived osteoblasts (C and D) were pretreated with U0126 (30 μ M) for 1 h, followed by treatment with 10 mM Pi for 24 h. The effect of U0126 on Pi-stimulated Fra-1 expression was assessed by real-time PCR (A and C) and by Western blot (B and D). Real-time PCR results are reported as fold change in gene expression. Arrowheads indicate the phosphorylated (top band) and the unphosphorylated (bottom band) form of Fra-1. Data are representative of experiments with similar results. * $p < 0.05$ compared with untreated cells.

www.genomatix.de). We identified several putative AP-1 binding sequences at -4714, -4387, -3402, -3079, -3058, -2130, -1552, and -816 from the transcription start site (Fig. 6B). Using DNA transfection experiments, both the 5 and 0.8 kb of the 5' flanking sequence of the *MGP* gene were shown to display transcriptional activity in osteoblastic UMR106 cells.⁽²¹⁾

We next examined the *in vitro* binding of Fra-1 to these eight putative AP-1 binding motifs found in the murine *MGP* promoter and to an AP-1 consensus binding sequence as a control. We performed a NoShift transcription factor assay on nuclear extracts obtained from both Pi-treated and control MC3T3-E1 cells (Fig. 6A). Our results indicated that 24-h treatment with Pi increased the binding of Fra-1 to an AP-1 consensus binding site. Interestingly, our results also showed that Pi treatment induced a significant increase in the *in vitro* binding of Fra-1 to all the putative AP-1 sites found in the *MGP* promoter except at the -1552 location. Pi-induced Fra-1 binding to an AP-1 consensus binding sequence was blunted in a competition assay with a 50-fold molar excess (500 pM) of nonbiotinylated AP-1 oligomers. No binding of Fra-1 was observed in both control and Pi-treated cells when nuclear extracts were incubated with a scrambled sequence (Fig. 6A). These results indicate that Pi stimulates the *in vitro* binding of Fra-1 to several AP-1 motifs found in the murine *MGP* promoter.

To further examine the *in vivo* specific binding of Fra-1 to the *MGP* promoter in osteoblasts, a ChIP assay was performed. After exposure to Pi for 24 h, MC3T3-E1 cells were fixed and lysed, and the sonicated chromatin was precipitated using a Fra-1-specific antibody. The primers were designed to include the putative AP-1 binding sites previously identified in the *MGP* promoter and used for the NoShift assays. DNA was amplified by real-time PCR targeting the various AP-1 binding sites of the

MGP promoter. ChIP analysis showed that Pi treatment of MC3T3-E1 cells induced a 6-fold increase in the level of Fra-1 recruitment to the *MGP* promoter in position -3402 and a 5-fold increase in positions -3079/-3058 (Fig. 6B). Pi did not significantly increase the binding in the other sites. Mouse β -actin primers, used as independent negative controls, showed no amplification (data not shown). Finally, to establish a link between ERK1/2 and the recruitment of Fra-1 to the *MGP* promoter in response to Pi, the ChIP assay was performed on MC3T3-E1 cells treated with Pi in the presence or absence of U0126 (Fig. 6C). Our data show that the increased binding of Fra-1 to the -3402 and -3079/-3058 sites in response to Pi is inhibited by U0126. Pretreatment of the cells with the inhibitor had no effect on the other sites (Fig. 6C). Results for the -1552 site are shown as a representative response for sites that do not show an increased binding of Fra-1 after Pi treatment. Taken together, these data suggest that the ERK1/2 signaling pathway is involved in the Pi-stimulated binding of Fra-1 to the *MGP* promoter.

Effect of Pi on MGP expression in osteoblasts depleted for Fra-1

To determine the role of Fra-1 in Pi-stimulated *MGP* expression, we first used an *in vitro* knockdown approach. MC3T3-E1 cells stably expressing a specific shRNA sequence for fra-1 or its scrambled control were established. As indicated in Fig. 7A and contrarily to scrambled transfected cells, MC3T3-E1 stably expressing a shRNA for Fra-1 exhibited an almost complete depletion in Fra-1 at the mRNA level. Interestingly, whereas the Fra-1 expression level was stimulated in response to Pi in the scrambled transfected cells, Pi failed to induce an increase in Fra-1 expression level in the shRNA fra-1-transfected

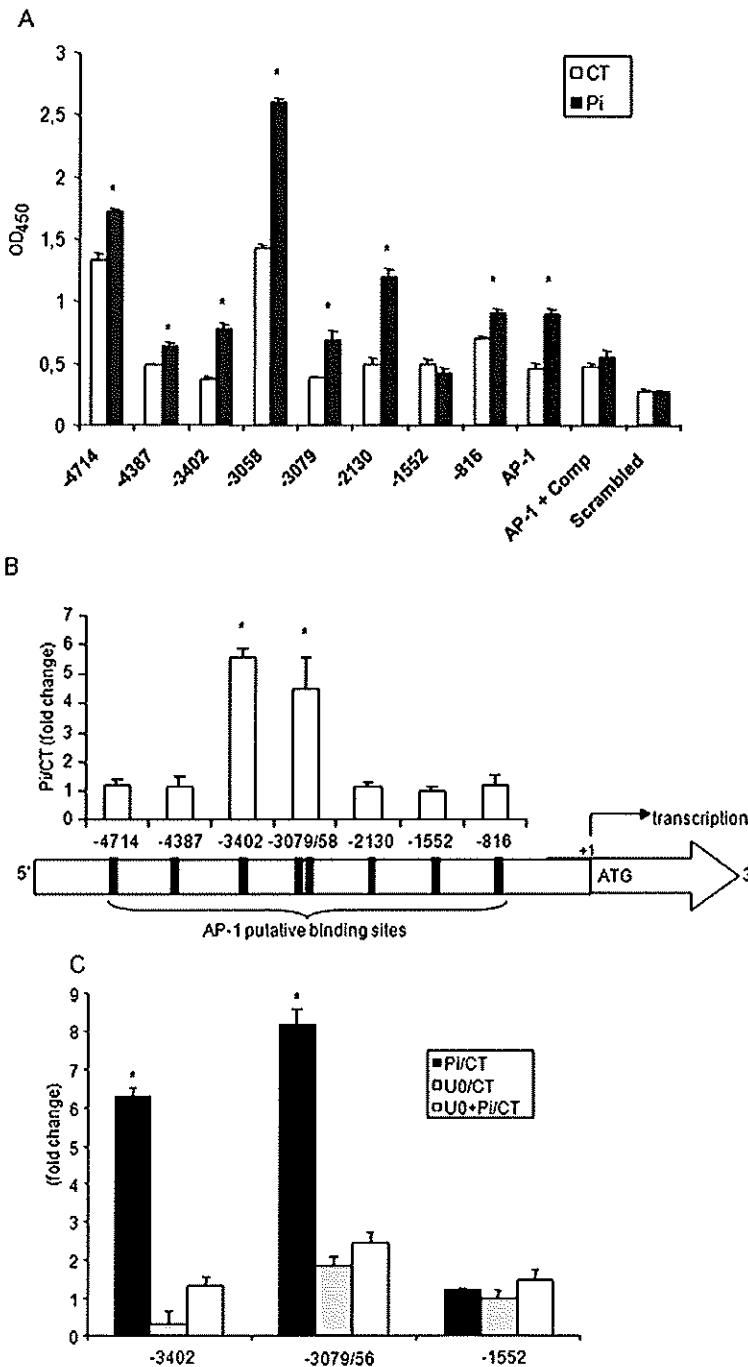


FIG. 6. Effects of Pi on Fra-1 DNA binding activity. MC3T3-E1 cells were cultured. The in vitro specific association of Fra-1 to the murine MGP promoter was evaluated by a NoShift transcription factor assay (A). Nuclear extracts of Pi-treated (Pi) or untreated (CT) cells were incubated with biotin-labeled AP-1 putative binding sites (-4714; -4387; -3402; -3058; -3079; -2130; -1552; -816) found in the MGP promoter or AP-1 consensus (AP-1) and its scrambled sequence. A specific competitor sequence for the AP1 consensus site was used as a control (comp). DNA-protein interactions were determined using anti-Fra-1 and HRP-conjugated antibodies (A). The in vivo specific association of Fra-1 to the murine MGP promoter was evaluated by a quantitative ChIP assay (B and C). MC3T3-E1 cells treated or not with Pi for 24 h were compared with the input DNA as an internal reference. Data are expressed as the ratio of Pi over control (CT) condition. A schematic diagram showing Fra-1 putative binding sites on murine MGP promoter is shown (B). The effect of U0126 on the Pi-enhanced Fra-1 binding to the MGP promoter was tested (C), and data are expressed as the ratio of Pi and/or U0126 over control (CT) conditions. Results are representative of experiments with similar results. * $p < 0.05$ compared with untreated cells.

cells (Fig. 7A). We next examined MGP expression levels in scrambled and shRNA *fra-1*-transfected cells. Our results showed that the MGP expression level was increased in scrambled transfected cells in response to Pi, whereas in shRNA *fra-1*-transfected cells, Pi failed to increase the level of MGP expression (Fig. 7B). These data strongly suggest that Fra-1 is involved in the Pi-dependent stimulation of MGP expression.

To confirm these results, we ultimately used primary osteoblasts isolated from wildtype and Fra-1-deficient mice (*fra-1*^{Δ/Δ}).⁽²⁸⁾ We first analyzed relative Fra-1 expression in both wildtype and *fra-1*^{Δ/Δ} osteoblasts. No Fra-1 expression was detectable in *fra-1*^{Δ/Δ} osteoblasts even after Pi stimulation (Fig. 7C). In contrast, 24-h Pi-treatment significantly increased the level of Fra-1 in wildtype osteoblasts (Fig. 7C). We next examined the levels of MGP

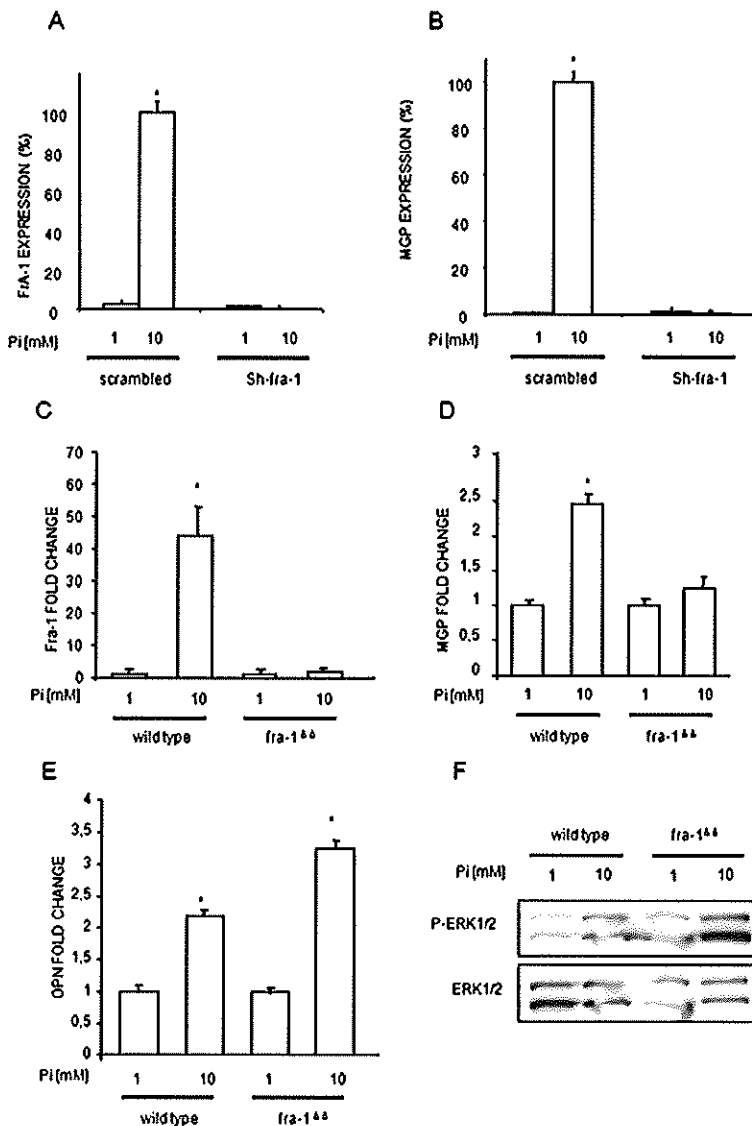


FIG. 7. Effect of Pi on MGP expression in osteoblasts depleted for fra-1 MC3T3-E1 cells were stably transfected with a specific shRNA sequence for fra-1 or its scrambled control. Cells (scrambled and ShFra-1) were treated or not with 10 mM Pi for 24 h (A and B). Primary mouse osteoblasts from calvaria of wildtype and deficient mice (*fra-1*^{Δ/Δ}) were cultured before treatment with 10 mM Pi for 24 h (C-E) or 30 min (F). The effect of 10 mM Pi on *fra-1*, MGP, and OPN expression was assessed by real-time PCR (A-E) and the phosphorylation level of ERK1/2 by Western blot (F). Real-time PCR results are reported as relative gene expression. **p* < 0.05 compared with untreated cells.

in response to Pi in both cell types. Our results indicated that Pi stimulated the level of MGP in wildtype osteoblasts but not in *fra-1*^{Δ/Δ} osteoblasts (Fig. 7D). To address the responsiveness of *fra-1*^{Δ/Δ} osteoblasts to Pi treatment, we analyzed the effect of Pi on OPN expression in wildtype and *fra-1*^{Δ/Δ} primary osteoblasts (Fig. 7E). After 24-h Pi treatment, the level of OPN was significantly increased in comparison with the untreated control in both cell types (Fig. 7E). These results are in accordance with a previous study showing stimulation of OPN expression by Pi in osteoblasts.⁽⁶⁾ We treated wildtype and *fra-1*^{Δ/Δ} primary osteoblasts with Pi for 30 min. Both cell types showed an increase in the phosphorylation level of ERK1/2 (Fig. 7F). Together, these data suggest, on the one hand, that Fra-1 deficiency did not affect Pi-dependent activation of OPN and of upstream signaling cascade and, on the other hand,

that Fra-1 is involved in Pi-stimulated MGP expression in primary osteoblasts.

DISCUSSION

We previously found that Pi stimulates MGP expression in growth plate chondrocytes through ERK1/2. We postulated that MGP, which is upregulated in response to Pi, may provide possible negative feedback mechanism to regulate Pi-induced mineralization in growth plate chondrocytes.⁽¹⁹⁾ Although chondrocytes differ from the osteoblastic lineage, they do share some characteristics, such as alkaline phosphatase expression, presence of matrix vesicles, and mineralization of the extracellular matrix. The importance of Pi as a signaling molecule in osteoblasts and the links between MGP regulation and mineralization led

us to study whether Pi could regulate MGP expression in osteoblasts and to examine the signaling pathways activated by Pi. The effect of Pi on MGP expression was evaluated in the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, as well as in primary osteoblasts. The cell line in question is derived from calvaria of newborn mice and recapitulates osteogenic differentiation in vitro from the expression of early markers to the mineralization of extracellular matrix⁽³⁷⁾ in the presence of Pi.^(11,38,39) However, to rule out the possibility of cell type-dependent effects of Pi, we also used primary osteoblasts.

Our results indicated that Pi stimulates the expression of MGP both at the mRNA and protein levels in MC3T3-E1 cells and in primary osteoblasts. Interestingly, Beck et al.⁽⁴⁰⁾ described that the stimulation of osteopontin expression by Pi is directly linked to the activity of alkaline phosphatase during osteoblast differentiation. Whether this phenomenon is true for MGP is not yet known. The role of Pi generation through alkaline phosphatase activity warrants further study.

One of the major roles described for MGP is to negatively regulate the process of calcification. MGP belongs to the γ -carboxyglutamic acid (gla)-containing protein family. The gla residues are produced post-translationally by the action of γ -carboxylase in a vitamin K-dependent manner.^(41,42) The importance of these residues in the mineralization inhibitory function of MGP has been recently shown.⁽¹⁸⁾ Transgenic mice overexpressing MGP in osteoblasts showed a decrease in bone mineralization, whereas the overexpression of MGP with mutated gla residues had no effect.⁽¹⁸⁾ Interestingly, it has been shown that MGP can be regulated by PTH in MC3T3-E1 cells. In the presence of warfarin, a vitamin K antagonist, the authors noted that PTH-inhibited mineralization was considerably reduced, suggesting a role for MGP in osteoblast mineralization.⁽¹¹⁾ The use of warfarin or MGP-deficient cells⁽¹²⁾ may prove useful in deciphering the role of MGP in Pi-dependent extracellular matrix mineralization.

In this study, we focused on the molecular mechanisms involved in the regulation of MGP. First, we found that Pi stimulated MGP expression through ERK1/2 but not by p38 or JNK1/2, the two other major members of the MAPK family. This regulatory pathway was also described in growth plate chondrocytes⁽¹⁹⁾ and osteoblasts.⁽⁶⁾ This specificity within the phosphate-enhanced signaling pathway suggests a common response mechanism in bone-forming cells. We also found that Pi induced a biphasic stimulation of ERK1/2 phosphorylation. Interestingly, Beck et al.⁽⁴⁰⁾ also described this biphasic pattern for ERK1/2 phosphorylation in response to Pi in MC3T3-E1 cells. These authors reported that both peaks were required to enhance the expression level of OPN. Further experiments are now needed to determine whether the Pi-stimulated MGP expression is also dependent on both peaks of ERK1/2 phosphorylation in osteoblasts.

The ERK1/2 pathway has been reported as being involved in various functions in the differentiation process of osteoblasts⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ and notably regulates the activity of AP-1 transcription factors.^(46,47) We found that Pi stimulated the expression of Fra-1, a member of the AP-1 family, and

that this effect was suppressed when ERK1/2 phosphorylation was blocked. It has been previously shown that Fra-1 can be phosphorylated by ERK1/2.⁽⁴⁸⁾ It has also been reported that the phosphorylation of Fra-1 by ERK1/2 prevents its degradation by the proteasome.⁽⁴⁹⁾ These data suggest that Pi stimulates the expression of Fra-1 and induces its phosphorylation through the ERK pathway. These results are consistent with a recent report in which Pi regulated Fra-1 post-translationally in MC3T3-E1 cells.⁽²⁹⁾ In addition, our data indicate that Pi did not induce a marked increase in Fra-1 mRNA, whereas the level of the corresponding protein was dramatically increased. These observations strongly suggest that Pi-dependent activation of ERK1/2 could be involved in a prevention mechanism of Fra-1 protein degradation by the proteasome. This hypothesis remains, however, to be validated.

Fra-1 has been shown to play a key role in bone metabolism, because Fra-1 transgenic mice develop osteosclerosis,⁽³⁵⁾ and in contrast, osteopenia appears in mice lacking Fra-1.⁽²⁸⁾ Furthermore, Fra-1 has been suggested to be a putative regulator of MGP, because overexpression of Fra-1 increased MGP expression in primary osteoblasts and inversely the level of MGP was reduced in *fra-1 Δ* osteoblasts.⁽²⁸⁾ Here we found that Pi upregulated the in vitro specific binding of nuclear Fra-1 to several AP-1 motifs found in the MGP promoter. The ChIP assays confirmed the capacity of Fra-1 to bind at specific location to the MGP promoter in osteoblasts in vivo. In addition, the binding of Fra-1 was suppressed when ERK1/2 phosphorylation was blocked. These data strongly suggest a direct link between ERK1/2 phosphorylation and Fra-1 binding to the MGP promoter. Among the various putative AP-1 binding sites identified in the MGP promoter, we did not detect in vitro and in vivo binding of Fra-1 to every site, indicating that Fra-1 can act specifically in response to Pi. We can assume that probably not all the identified AP-1 putative sites may efficiently bind Fra-1 in vitro and in vivo. One can also speculate that the chromatin structure of the MGP gene could dictate the AP-1 sites accessibility to the promoter in vivo.⁽⁵⁰⁾ In addition, the failure of certain putative AP-1 sites to bind Fra-1 may result from the absence of appropriate flanking nucleotide sequence, which could be important in stabilizing the DNA/Fra-1 interaction.⁽⁵¹⁾

Consistent with the first evidence that Fra-1 may be involved in Pi-stimulated MGP expression, we also showed that the in vitro shRNA knockdown and the deletion of Fra-1 inhibited the stimulatory effect of Pi on MGP expression. Taken together, these data provide strong support for a role of Fra-1 in Pi-dependent MGP expression in osteoblasts.

As a Fos family member, Fra-1 must have heterodimerized to exhibit DNA binding activity. Further experiments are now underway in an attempt to identify the partner of Fra-1 involved in the regulation of MGP in response to Pi. A common polymorphism in the promoter region of the human MGP gene has been associated with an altered binding of AP-1 complex in vitro. In this study, *c-jun*, JunB, Fra-1, and Fra-2 were the major components of the AP-1 complex.⁽⁵²⁾ These data suggest that Jun family

members are potential DNA binding partners for Fra-1-dependent regulation of MGP. In addition, certain ATF/CREB proteins can form dimers with Fos and Jun factors.^(24,25) This is of interest because we identified presumptive binding sites for ATF/CREB (cyclic AMP response element) in the region of the -3058 and -3079 AP-1 sites. It would be of great value to determine whether the Jun or ATF/CREB proteins are DNA binding partners of Fra-1 in the context of MGP regulation by Pi, to highlight the role of MGP as an inhibitor of mineralization in osteoblasts.

In conclusion, we report here that Pi regulates MGP expression through ERK1/2 in osteoblasts and induces changes in Fra-1 levels. The effects of Pi on Fra-1 are mediated by ERK1/2. In addition, we report a Pi-dependent Fra-1 binding to the MGP promoter. Finally, the absence of stimulation of MGP expression in response to Pi in fra-1 knockdown MC3T3-E1 cells and in *fra-1*^{Δ/Δ} primary osteoblasts lends further credence to the possible involvement of Fra-1 in this regulatory pathway. The results of our study therefore suggest a role for ERK1/2 and Fra-1 in the regulation of MGP by Pi. Whether Pi-dependent MGP regulation in bone-forming cells may be of relevance for the control of skeletal and ectopic calcification should be further studied.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Frédéric Blanchard (INSERM, ERI7, Nantes, France), Joseph Caverzasio, and Sabina Troccaz (Service of Bone Diseases, University Hospital of Geneva, Switzerland) for contributions and Matthew Annis (Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada) for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by grants from INSERM, the French Society of Rheumatology, BIOREGOS, and Région des Pays de la Loire. M.J. received a fellowship from INSERM/Région des Pays de la Loire and La Fondation de la Recherche Médicale. S.K. received a fellowship from the French Ministry of Research.

REFERENCES

- Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE 1992 Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules *in vitro*. *Bone Miner* 17:15-29.
- Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J 2003 Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: Possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 18:1430-1442.
- Bingham PJ, Raisz LG 1974 Bone growth in organ culture: Effects of phosphate and other nutrients on bone and cartilage. *Calcif Tissue Res* 14:31-48.
- Baylink D, Wergedal J, Stauffer M 1971 Formation, mineralization, and resorption of bone in hypophosphatemic rats. *J Clin Invest* 50:2519-2530.
- Ivey JL, Morey ER, Baylink DJ 1978 The effects of phosphate depletion on bone. *Adv Exp Med Biol* 103:373-380.
- Beck GR Jr, Knecht N 2003 Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent. *J Biol Chem* 278:41921-41929.
- Beck GR Jr, Moran E, Knecht N 2003 Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res* 288:288-300.
- Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamura H, Kohno T, Koida M 2001 Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:348-352.
- Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G 1998 Fourier transform infrared micro-spectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 23:187-196.
- Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW 1993 Osteopontin-hydroxyapatite interactions *in vitro*: Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner* 22:147-159.
- Gopalakrishnan R, Ouyang H, Somerman MJ, McCauley LK, Franceschi RT 2001 Matrix gamma-carboxyglutamic acid protein is a key regulator of PTH-mediated inhibition of mineralization in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Endocrinology* 142:4379-4388.
- Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G 1997 Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386:78-81.
- Hale JE, Fraser JD, Price PA 1988 The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J Biol Chem* 263:5820-5824.
- Hashimoto F, Kobayashi Y, Kobayashi ET, Sakai E, Kobayashi K, Shibata M, Kato Y, Sakai H 2001 Expression and localization of MGP in rat tooth cementum. *Arch Oral Biol* 46:585-592.
- Price PA, Urist MR, Otawara Y 1983 Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 117:765-771.
- Zhao J, Nishimoto SK 1996 Matrix Gla protein gene expression is elevated during postnatal development. *Matrix Biol* 15:131-140.
- Gilbert KA, Rannels SR 2004 Matrix GLA protein modulates branching morphogenesis in fetal rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L1179-L1187.
- Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G 2004 Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 165:625-630.
- Julien M, Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz C, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J 2007 Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology* 148:530-537.
- Cancela L, Hsieh CL, Francke U, Price PA 1990 Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J Biol Chem* 265:15040-15048.
- Luo G, D'Souza R, Hogue D, Karsenty G 1995 The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *J Bone Miner Res* 10:325-334.
- Eferl R, Wagner EF 2003 AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859-868.
- Lee W, Mitchell P, Tjian R 1987 Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49:741-752.
- Benbrook DM, Jones NC 1990 Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* 5:295-302.
- Hai T, Curran T 1991 Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:3720-3724.
- Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M 1991 Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354:494-496.

27. Deng T, Karin M 1994 c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* **371**:171–175.
28. Eferl R, Hoebertz A, Schilling AF, Rath M, Karreth F, Kenner L, Amling M, Wagner EF 2004 The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *EMBO J* **23**:2789–2799.
29. Conrads KA, Yi M, Simpson KA, Lucas DA, Camalier CE, Yu LR, Veenstra TD, Stephens RM, Conrads TP, Beck GR Jr 2005 A combined proteome and microarray investigation of inorganic phosphate-induced pre-osteoblast cells. *Mol Cell Proteomics* **4**:1284–1296.
30. Lefebvre V, Garofalo S, Zhou G, Metsaranta M, Vuorio E, De Crombrughe B 1994 Characterization of primary cultures of chondrocytes from type II collagen/beta-galactosidase transgenic mice. *Matrix Biol* **14**:329–335.
31. Blanchard F, Kinzie E, Wang Y, Duplomb L, Godard A, Held WA, Asch BB, Baumann H 2002 FR901228, an inhibitor of histone deacetylases, increases the cellular responsiveness to IL-6 type cytokines by enhancing the expression of receptor proteins. *Oncogene* **21**:6264–6277.
32. Lacreusette A, Nguyen JM, Pandolfino MC, Khammari A, Dreno B, Jacques Y, Godard A, Blanchard F 2007 Loss of oncostatin M receptor beta in metastatic melanoma cells. *Oncogene* **26**:881–892.
33. Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC 1994 Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun. *Mol Cell Biol* **14**:7352–7362.
34. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM 1998 Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* **273**:18623–18632.
35. Jochum W, David JP, Elliott C, Wutz A, Plenk H Jr, Matsuo K, Wagner EF 2000 Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med* **6**:980–984.
36. Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, Tavaré JM 2002 Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation. *Biochem J* **368**:573–580.
37. Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ 1992 Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An *in vitro* model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* **7**:683–692.
38. Marsh ME, Munne AM, Vogel JJ, Cui Y, Franceschi RT 1995 Mineralization of bone-like extracellular matrix in the absence of functional osteoblasts. *J Bone Miner Res* **10**:1635–1643.
39. Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT 1999 Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct *in vitro* and *in vivo* differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res* **14**:893–903.
40. Beck GR Jr, Zerler B, Moran E 2000 Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:8352–8357.
41. Price PA 1989 Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res* **21**:51–57. discussion 57–60.
42. Price PA, Fraser JD, Metz-Virca G 1987 Molecular cloning of matrix Gla protein: Implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:8335–8339.
43. Caverzasio J, Palmer G, Suzuki A, Bonjour JP 2000 Evidence for the involvement of two pathways in activation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and cell proliferation by Gi and Gq protein-coupled receptors in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* **15**:1697–1706.
44. Zhang W, Dziak RM, Aletta JM 1995 EGF-mediated phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in osteoblastic cells. *J Cell Physiol* **162**:348–358.
45. Chaudhary LR, Hruska KA 2001 The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* **81**:304–311.
46. Karin M, Hunter T 1995 Transcriptional control by protein phosphorylation: Signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**:747–757.
47. Young MR, Nair R, Bucheimer N, Tulsian P, Brown N, Chapp C, Hsu TC, Colburn NH 2002 Transactivation of Fra-1 and consequent activation of AP-1 occur extracellular signal-regulated kinase dependently. *Mol Cell Biol* **22**:587–598.
48. Cook SJ, Aziz N, McMahon M 1999 The repertoire of fos and jun proteins expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol* **19**:330–341.
49. Vial E, Marshall CJ 2003 Elevated ERK-MAP kinase activity protects the FOS family member FRA-1 against proteasomal degradation in colon carcinoma cells. *J Cell Sci* **116**:4957–4963.
50. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Nakagawa Y, Takahashi H, Okazaki H, Iizuka Y, Ohashi K, Gotoda T, Ishibashi S, Nagai R, Yamazaki T, Kadowaki T, Yamada N, Osuga J, Shimano H 2007 SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res* **48**:1581–1591.
51. Virolle T, Coraux C, Ferrigno O, Cailleteau L, Ortonne JP, Pognonec P, Aberdam D 2002 Binding of USF to a non-canonical E-box following stress results in a cell-specific depression of the lama3 gene. *Nucleic Acids Res* **30**:1789–1798.
52. Farzaneh-Far A, Davies JD, Braam LA, Spronk HM, Proudfoot D, Chan SW, O'Shaughnessy KM, Weissberg PL, Vermeer C, Shanahan CM 2001 A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J Biol Chem* **276**:32466–32473.

Received in original form April 24, 2008; revised form March 17, 2009; accepted May 1, 2009.

1.2 Article 3 : Modulation des effets stimulateurs du Pi sur l'expression de MGP et OPN par le calcium

RESUME

Le phosphate inorganique (Pi) agit comme une molécule de signalisation dans les cellules ostéogéniques et affecte de nombreuses fonctions cellulaires en régulant l'expression de gènes. En particulier, le Pi stimule l'expression de gènes régulant la minéralisation tels l'ostéopontine (OPN) ou la Protéine Gla Matricielle (MGP) via la voie ERK1/2 (292, 498). Lors du remodelage osseux, les ostéoblastes étant en présence de grandes quantités de phosphate et de calcium, nous souhaitons déterminer si le calcium peut moduler les effets du Pi sur les ostéoblastes. Nous avons confirmé dans un premier temps par western blot et PCR en temps réel que les ions phosphate et calcium (10 mM Pi; 1,8 mM calcium) stimulent l'expression de la MGP et de l'OPN via la phosphorylation de ERK1/2 dans la lignée ostéoblastique murine MC3T3-E1 et les ostéoblastes primaires dérivées de calvaria de souris nouveaux-nés et qu'une concentration minimale de 1,8 mM de calcium est nécessaire pour que se produisent les effets cellulaires dépendant du Pi. Les mécanismes impliqués dans les effets cellulaires du calcium en présence de Pi ont ensuite été examinés. D'une part, l'utilisation d'un agoniste de récepteurs sensibles au calcium (CaSR), le gadolinium, et d'un inhibiteur de protéines G, la toxine pertussique (PTX), nous a permis d'étudier la possibilité de l'implication de CaSR. L'adjonction de gadolinium dans un milieu contenant du Pi mais pas de calcium n'entraîne pas de stimulation de l'expression de MGP et OPN, ni d'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2. De plus, la présence de PTX n'altère pas les effets cellulaires observés en présence de Pi et de calcium. Ces données suggèrent qu'un mécanisme dépendant du CaSR n'est pas impliqué dans les effets cellulaires du Pi et du calcium. Dans un second temps, nous montrons que l'utilisation d'un chélateur de calcium, l'EDTA, bloque les effets cellulaires de la paire d'ions. Cependant, l'EDTA est également un inhibiteur de la formation des précipités de phosphate de calcium (CaPp). En effet, nous avons montré par microscopie électronique à transmission (MET) que l'addition de 10 mM de Pi au milieu de culture contenant 1,8 mM de calcium conduisait à la formation de CaPp. Ces précipités ne sont plus observés en MET en présence d'EDTA, ce qui suggère que les effets cellulaires dépendant du Pi pourraient être médiés par la formation de CaPp. Le traitement d'ostéoblastes avec des CaPp exogènes montre que les CaPp stimulent la

phosphorylation de ERK1/2 et l'expression de MGP et OPN. De plus, l'utilisation de phosphocitrate et de chlorpromazine, des inhibiteurs de la formation et de l'endocytose des cristaux respectivement, bloque les effets cellulaires induits par ces précipités. Ces données indiquent que les CaPp sont impliqués dans la phosphorylation de ERK1/2 dépendante du Pi et dans la régulation de l'expression de MGP et OPN via un mécanisme d'endocytose.

Full title:

Phosphate-dependent Stimulation of MGP and OPN Expression in Osteoblasts *via* the Erk1/2 Pathway is Modulated by Calcium

Abbreviated title:

Pi and calcium in osteoblasts differentiation

Precis:

Calcium is required for Pi-dependent ERK1/2 phosphorylation and regulation of mineralization-associated genes in osteoblasts. Calcium-phosphate precipitates contribute to this osteoblastic activation through an endocytic pathway.

Authors:

Khoshniat S.^{1,2}, Julien M.^{1,2}, Bourguine A.^{1,2}, Petit M.^{2,3}, Rouillon T.^{1,2}, Masson M.^{1,2}, Gatius M.^{1,2}, Weiss P.^{1,2}, Beck L.^{4,5}, Guicheux J.^{1,2}

Affiliations:

¹INSERM, U791, Center for osteoarticular and dental tissue engineering (LIOAD), group "Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology" (STEP), Nantes, F-44042, France.

²Pres UNAM, UFR Odontologie, Nantes, F-44042, France.

³CNRS UMR6513, Laboratoire de Synthèse Organique, Faculté des Sciences et des Techniques, Nantes, F-44322, France.

⁴INSERM, U845, Centre de Recherche Croissance et Signalisation, Paris, F-75015, France

⁵Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, F-75015, France.

Corresponding author:

Jérôme Guicheux, INSERM, U 791, Laboratoire d'ingénierie des tissus ostéo-articulaires et dentaires (LIOAD), 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, 44042, France. Tel: +33 2 40 41 29 19, Fax: +33 2 40 08 37 12, Email: jerome.guicheux@inserm.fr

Disclosure statement :

The authors have nothing to disclose.

Key words :

Inorganic phosphate

Calcium

Osteoblasts

Signaling pathway

Calcium-phosphate precipitates

Grant support:

This work was supported by grants from La Fondation pour la Recherche Médicale (AAP vieillissement ostéoarticulaire), the French Society of Rheumatology, BIOREGOS, Région des Pays de la Loire and INSERM. Solmaz Khoshniat received a fellowship from the French Ministry of Research. Marion Julien received a fellowship from INSERM/Région des Pays de la Loire and La Fondation pour la Recherche Médicale. Annabelle Bourguine received a fellowship from INSERM/Région des Pays de la Loire.

1 **Abstract**

2

3 Inorganic phosphate (Pi) acts as a signaling molecule in bone-forming cells, affecting cell
4 functions and genes expression. Particularly, Pi stimulates the expression of mineralization-
5 associated genes such as osteopontin (OPN) and matrix gla protein (MGP) through the
6 ERK1/2 pathway. With respect to the presence of elevated extracellular calcium and
7 phosphate levels during bone remodelling, we questioned whether calcium may play a role in
8 the phosphate-dependent effects in osteoblasts. We first showed by western blot and real-time
9 PCR that the concomitant presence of 10mM Pi and 1.8mM calcium is required to stimulate
10 ERK1/2 phosphorylation and MGP/OPN expression. The mechanisms involved in the cellular
11 effects of calcium in the presence of phosphate were subsequently examined. Firstly, the use
12 of the calcium-sensing receptor (CaSR) agonist gadolinium and the G-protein inhibitor
13 pertussis toxin enabled us to determine that a CaSR mechanism is not involved in the Pi and
14 calcium-mediated cellular effects. We then questioned whether ion pair-dependent cellular
15 effects may be mediated through the formation of calcium-phosphate precipitates (CaPp). By
16 transmission electron microscopy, we demonstrated that adding 10mM Pi to the culture
17 medium containing 1.8mM calcium led to the formation of CaPp. Treatment of osteoblasts
18 with exogenous CaPp showed that these precipitates stimulated ERK1/2 phosphorylation and
19 genes expression. Interestingly, inhibitors of crystal formation and/or endocytosis
20 (phosphocitrate and chlorpromazine) prevented CaPp-induced cellular effects. Our data thus
21 suggest that calcium is required for Pi-dependent ERK1/2 phosphorylation and regulation of
22 mineralization-associated genes in osteoblasts and that CaPp may be involved in this
23 osteoblastic activation through an endocytic pathway.

1 Introduction

2
3 Bone is of crucial importance to the human body, providing skeletal support and serving as a niche for
4 the formation of hematopoietic cells. In addition to these critical functions, bone is also the main
5 reservoir for calcium and phosphate, with 99% of calcium and 85% of phosphate being stored in the
6 skeleton.

7 Phosphate homeostasis depends not only on its absorption from the gut and its retention or
8 excretion by the kidneys, but is tightly coupled to bone remodelling. This process requires a balance
9 between osteoblast and osteoclast activities leading to bone formation or bone resorption respectively,
10 and is controlled by local and systemic factors including parathyroid hormone, vitamin D3, and
11 cytokines. The resorption of the bone matrix results in enzymatic breakdown proteins and the
12 dissolution of the phosphocalcic bone mineral, which ultimately triggers a local increase in inorganic
13 phosphate (Pi) ions in the vicinity of bone cells. This local increase in Pi also results from the activity
14 of the tissue non-specific alkaline phosphatase (TNSAP), an enzyme differentially expressed during
15 the differentiation of the osteoblastic bone forming cells. TNSAP regulates osteoblastic mineralization
16 by hydrolysing pyrophosphate, a potent inhibitor of calcification, which in turn leads to the production
17 of Pi (1). The increased Pi resulting from the TNSAP activity and bone remodeling is believed to act
18 as a specific signal for skeletal cells affecting various functions such as proliferation (2),
19 differentiation (3,4), mineralization (5) or apoptosis (6).

20 We and others have recently shown that extracellular Pi regulates expression of the
21 mineralization-associated genes osteopontin (OPN) and matrix Gla protein (MGP) (3, 5), and involves
22 activation MAP kinase ERK1/2 pathway (5, 7, 8). OPN is a secreted phosphoglycoprotein that belongs
23 to the SIBLING family, and is present in various mineralized and soft tissues as well as in body fluids.
24 It contains an RGDS motif, exhibits high affinity to calcium, and is produced by osteoblasts and
25 osteoclasts. Despite the absence of a clear phenotype in OPN knockout mice, recent studies have
26 implicated OPN in diverse biological processes, including development, wound healing,
27 immunological responses, tumorigenesis, bone resorption, and calcification (9). MGP is another
28 protein involved in bone mineralization and it belongs to the Gla family, whose carboxylation is
29 vitamin K-dependent. MGP, is known to be as a potent calcification inhibitor, is expressed in
30 mineralizing tissues including bone, cartilage, tooth, cementum and in soft tissues such as vascular
31 smooth muscle, kidney, lung and heart (10, 11). Accordingly, MGP-deficient mice show ectopic
32 calcifications of the arteries whereas mice overexpressing MGP are osteopenic (11). Although Pi is
33 acknowledged as a specific signaling molecule affecting the expression of mineralization-associated
34 genes, the functional relevance of the Pi-dependent effects in skeletal biology still has to be clarified.
35 In particular, the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of MGP and OPN by
36 Pi have not been completely deciphered. These could involve the intracellular import of Pi through

37 dedicated transporters (3, 12, 13), or the detection of extracellular Pi concentration through some as
38 yet unknown Pi-sensing mechanism.

39 Notwithstanding the signaling role of Pi, it must be stressed that in parallel to the local
40 increase in Pi, bone remodeling also greatly enhances the local concentration of calcium. This ion is a
41 well established extracellular signal that acts through a G protein coupled calcium sensing receptor
42 mechanism (14). It plays important regulatory roles in bone cells including proliferation (15), growth,
43 differentiation and apoptosis (16). Considering the concomitant presence of calcium and Pi in the
44 surrounding area of bone cells and their implication in the control of many functions in osteogenic
45 cells, a possible role of calcium in the regulatory role of Pi on ERK1/2-mediated stimulation of MGP
46 and OPN expression is plausible.

47 In this study, we evaluated the role of various doses of Pi, calcium or combinations of both
48 ions on the expression of MGP and OPN, and ERK1/2 phosphorylation in mouse primary osteoblasts
49 and MC3T3-E1 cells. We also measured the formation of calcium phosphate precipitates (CaPp) in the
50 presence of elevated Pi and calcium and examined their role in the phosphorylation of ERK1/2 and the
51 regulated gene expression as well as the possible mechanisms involved.

52

53

54 **Materials and Methods**

55

56 **Materials**

57 Cell culture plastic ware was purchased from Corning-Costar (Corning BV Life Sciences, Schiphol-
58 Rijk, The Netherlands). Fetal calf serum (FCS) was obtained from Dominique Dutscher (Brumath,
59 France). α -MEM and DMEM without calcium or Pi, L-glutamine, penicillin and streptomycin (P/S),
60 trypsin/EDTA, TRIzol reagent, deoxyribonuclease I (DNAse I), deoxyribonucleoside triphosphates
61 (dNTPs), Taq DNA polymerase, NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris gel, PVDF (polyvinylidene difluoride)
62 Invitrolon membrane were obtained from Invitrogen Corporation (Paisley, UK). U0126 was purchased
63 from CalBiochem (Merck Eurolab, Germany). Avian myeloblastosis virus-reverse transcriptase
64 (AMV-RT), random hexaprimers, and recombinant ribonuclease inhibitor (RNAsin) were purchased
65 from Promega (Charbonnières, France). Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix was obtained
66 from Stratagene Europe (Amsterdam Zuidoost, The Netherlands). Phosphocitrate was synthesized in
67 the LSO (Nantes, France) as previously described (17). Collagenase type II, filipin, chlorpromazine,
68 gadolinium chloride, and pertussis toxin (PTX) were obtained from Sigma-Aldrich Corporation (St
69 Quentin Fallavier, France). Protein content was determined using the Pierce Coomassie Plus assay
70 (Pierce, Rockford, IL, USA). Anti-phospho-ERK1/2 (9101), ERK1/2 (9102), and anti-mouse IgG
71 HRP-linked (7076) antibodies were purchased from Cell Signaling Inc. (Beverly, MA). The Western
72 blot detection system was obtained from GE, Healthcare (Buckinghamshire, UK). All other chemicals
73 were from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

74

75 **Cell cultures**

76 MC3T3-E1 cells were seeded at 10,000 cells/cm² and cultured for 10 days in α -MEM (containing 1
77 mM Pi and 1.8 mM calcium) supplemented with 10% FCS, 1% P/S and 1% L-glutamine. Primary
78 mouse osteoblasts were prepared from calvaria of three-day-old mice by sequential enzymatic
79 digestions using collagenase, as previously described (8). Cells were then seeded at 15,000 cells/cm²
80 in α -MEM supplemented with 10% FCS, 1% P/S, and 1% L-glutamine. Cells were cultured at 37°C in
81 a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air and the medium was replaced every two days. Agonists
82 were added 24 hours after incubation in α -MEM containing a low serum concentration (0.5%). When
83 indicated, cells were incubated with various concentrations of calcium and/or Pi in DMEM containing
84 a low serum concentration (0.5%). Pi was added as a mixture of NaH₂PO₄ and Na₂HPO₄ (pH 7.2) and
85 calcium as a solution of CaCl₂. Gadolinium (5 μ M), U0126 (30 μ M), EDTA (5mM), PTX (100ng/mL),
86 phosphocitrate (1 μ M), filipin (3 μ g/mL), or chlorpromazine (1 μ g/mL), were added 30 minutes or one
87 hour as specified before ions or CaPp treatment and an equivalent amount of DMSO was used as a
88 control when required.

89
90 RNA isolation
91 Total RNA was extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. Briefly,
92 lysis of the cells in TRIzol was followed by centrifugation at 10,000g for 15 minutes at 4°C in the
93 presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected, and the RNA was precipitated by
94 addition of isopropanol and centrifugation at 7,500g for five minutes at 4°C. RNA pellets were washed
95 with cold 75% ethanol, dried, reconstituted in sterile water, and quantified by spectrometry.

96
97 Reverse transcription and Real-time PCR
98 After Dnase I digestion, RNA samples (2 µg) were reverse-transcribed using AMV-RT and random
99 hexamer primers in a total volume of 30µl. Real-time quantitative PCR was performed using an Mx
100 3000P System (Stratagene) using Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix according to the
101 manufacturer's recommendations. The following temperature profile was used: 40 cycles of 30
102 seconds at 95°C, one minute at 60°C, and 30 seconds at 72°C. Expression of the target gene was
103 normalized to β-actin levels and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{reference}}$ with $\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} -$
104 $Ct_{\text{reference}}$) method was used to calculate relative expression levels, as previously described (18). The
105 sequences of primers for mouse MGP cDNA were 5'-TCAACAGGAGAAATGCCAACAC-
106 3'(forward) and 5'-CGGTTGTAGGCAGCGTTGT-3' (reverse) generating a 178-bp fragment. The
107 sequences of primers for mouse β-actin cDNA were 5'-AGTTCTACAAATGTGGCTGAGGAC-3'
108 (forward) and 5'-TTTGGGAGGGTGAGGGACTTC-3' (reverse) generating a 131-bp fragment. The
109 sequences of primers for mouse OPN cDNA were 5'-AAGCAGACACTTTCCTCCAATCG-3'
110 (forward) and 5'-TGACCTCAGTCCATAAGCCAAGC-3' (reverse). PCR primers were synthesized
111 by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

112
113 Western blotting
114 As previously described (8), cells were rapidly frozen in liquid nitrogen before lysis at 4°C and stored
115 at -80°C until use. Cells were lysed by addition of a RIPA buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM
116 potassium chloride, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM dithiothreitol, 20mM β-glycerophosphate, 2mM
117 Na₃VO₄, 1mM PMSF, and 1mM NaF). The insoluble material was pelleted at 12,000g for 10 minutes
118 at 4°C. The protein concentration of cell lysates was determined with a Pierce Coomassie-Plus-protein
119 assay. 20µg of total protein were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, and
120 proteins were transferred to a PVDF membrane following the manufacturer's protocol. Membranes
121 were blocked and probed in 5% non-fat dry milk in PBS/Tween 20. The ERK1/2 and phospho-
122 ERK1/2 antibodies were diluted 1/1000, and the actin antibody 1/2000. Primary antibodies were
123 detected using anti-rabbit Horse Radish Peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies diluted
124 1/2000 in 5% non-fat dry milk in PBS/Tween20. The blots were visualized by Enhanced
125 ChemiLuminescence (ECL) development using a Western blotting detection system.

126

127 Preparation of calcium phosphate precipitates (CaPp)

128 Nine mM Pi was added to complete α -MEM medium, containing already one mM Pi and 1.8 mM
129 calcium, in the presence of 0.5% FCS. Pi was added as a mixture of NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 (pH 7.2)
130 and calcium as a solution of CaCl_2 . This solution was maintained for 24 hours at 37°C in a humidified
131 atmosphere of 5% CO_2 in air and then filtered to collect the CaPp.

132

133 Transmission electron microscopy (TEM)

134 For TEM studies, the culture media was filtered and the collected particles were deposited on TEM
135 grids as per the following process. A few drops of sample were filtrated on a polycarbonate filter
136 having pores with a diameter of 0.2 μm and previously covered with a thin layer of evaporated carbon.
137 The filter was then rinsed with a few drops of pre-filtrated ethanol. After drying at room temperature,
138 the filter with particles was covered with a second layer of evaporated carbon. The filter was then
139 deposited on Nickel grids and the polycarbonate was dissolved with chloroform. After drying, TEM
140 observation of grids was performed using a JEOL JEM1010 microscope, operating at accelerated
141 voltage of 100kV. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) measurements were also performed at
142 100kV, using an Oxford Instruments Link ISIS spectrometer, equipped with an ATW2 ultra thin
143 window (energy resolution: 142eV at 5.9keV).

144

145 Statistical analysis

146 Unless stated otherwise, each experiment was performed three times with similar results. Results are
147 expressed as mean \pm SEM of triplicate determinations. Comparative studies of means were performed
148 using one-way ANOVA followed by a post-hoc test (Fisher's projected least significant difference)
149 with a statistical significance at $p < 0.05$.

150 **Results**

151

152

153 **Pi stimulates MGP and OPN expression in osteoblasts *via* the ERK1/2 pathway**

154 Several previous studies have described the effect of extracellular Pi on either MGP or OPN
155 expression in cultured osteoblasts (5, 7, 8). As a first approach, our aim was to confirm these
156 observations in our cell culture system by measuring MGP and OPN mRNA expression and ERK1/2
157 phosphorylation in primary osteoblasts from newborn mice calvaria treated with 10 mM Pi in the
158 presence of 1.8 mM calcium (basal condition). Our data showed that the levels of MGP and OPN
159 mRNA were significantly upregulated by treatment with 10 mM Pi (Figure 1A), and that ERK1/2 is
160 phosphorylated as early as 30 minutes after treatment with 10 mM Pi (Figure 1B). p38 and JNK
161 kinases failed to be phosphorylated under these conditions (data not shown). To link the Pi-dependent
162 stimulation of MGP and OPN expression to ERK1/2 phosphorylation, we used the specific MEK1/2
163 inhibitor U0126. Real-time PCR results indicated that U0126 inhibited the stimulatory effect of Pi on
164 MGP and OPN expression, thus showing that Pi exerts its effects at least through the ERK1/2 pathway
165 in the osteoblasts (Figure 1A).

166

167 **Calcium modulation of the Pi-dependent phosphorylation of ERK1/2**

168 In an attempt to understand the respective roles of Pi and calcium in ERK1/2 activation, primary
169 osteoblasts cultured in Pi- and/or calcium-free DMEM were treated with increasing concentrations of
170 either Pi, calcium, or combinations of both ions for 30 minutes. Although 10 mM Pi was able to
171 induce ERK1/2 phosphorylation when the medium was supplemented with 1.8 mM calcium, this was
172 not the case in the absence of calcium (Figure 2A). This strongly suggests that calcium is required for
173 Pi-dependent ERK1/2 phosphorylation. To determine whether calcium alone may be sufficient to
174 induce ERK1/2 phosphorylation, osteoblasts were cultured in DMEM without Pi. In these conditions,
175 increasing concentration of calcium (from 1.8 to 10 mM) failed to induce ERK1/2 phosphorylation
176 (Figure 2B).

177 We confirmed the effect of Pi, calcium, or both ions in the osteoblastic cell line MC3T3-E1
178 (data not shown). Noticeably, we showed that at least 1.8 mM of calcium was required for Pi to
179 stimulate ERK1/2 phosphorylation (data not shown). This data led us to perform all subsequent
180 experiments using the MC3T3-E1 cell line, as it responds to Pi in a similar manner as primary
181 osteoblasts.

182 To gain a clearer insight into the ion conditions required to phosphorylate ERK1/2, we
183 treated MC3T3-E1 cells with 1.8 mM calcium, together with various concentrations of Pi (0 to 10
184 mM) for 30 minutes. Under these conditions, Pi affected ERK1/2 phosphorylation dose-dependently,
185 with maximal effect at 10 mM (Figure 3A). The reverse experiment showed that when Pi was set at a
186 concentration of 1mM, maximal ERK1/2 phosphorylation (in the range of concentrations tested) was

187 observed when calcium concentration reached 10mM (Figure 3B). Moreover, when the Pi
188 concentration was maintained at 10 mM, and calcium concentration varied from 0 to 10 mM, we
189 showed that ERK1/2 phosphorylation is saturated using as little as 1.8 mM of calcium (Figure 3C).
190 This suggests that ERK1/2 phosphorylation occurring upon Pi treatment of osteoblasts is calcium-
191 dependent, and that the level of phosphorylation is responsive to the concentration of both ions.

192

193 **Calcium modulation of Pi-dependent stimulation of MGP/OPN transcripts**

194 Since Pi stimulates MGP and OPN expression through the phosphorylation of ERK1/2 and calcium is
195 involved in the effects on ERK1/2, we next sought to determine whether the presence of calcium is
196 mandatory for Pi to have an effect on MGP and OPN gene expression. MC3T3-E1 cells were treated
197 for 24 hours with different concentrations of Pi, calcium, or a combination of both (Figure 4). Our data
198 showed that the absence of either of the ions prevents the stimulation of MGP (Figure 4A and C) and
199 OPN (Figure 4B and D) expression independently of the concentration of the other ion. Moreover, the
200 simultaneous presence of 1.8 mM calcium and 1 mM Pi significantly enhances the expression of
201 MGP/OPN genes, and maximum stimulation is observed for treatment with 1.8mM of calcium and 10
202 mM Pi. We conclude that both calcium and Pi are required for upregulation of MGP and OPN
203 expression.

204

205 **Involvement of the G-protein coupled calcium receptor mechanism in the modulation of the Pi- 206 dependent cellular effects by calcium**

207 Calcium is a well-known extracellular signal acting through a G-coupled calcium sensing receptor
208 mechanism. In order to clarify whether a calcium sensing receptor might be involved in the
209 modulation of the Pi-dependent cellular effects of calcium, we treated cells with gadolinium, a
210 calcium-sensing receptor agonist (19). MC3T3-E1 cells, cultured in a calcium-free medium, were
211 treated with gadolinium and Pi for 30 minutes. Our data indicates that, in the absence of calcium,
212 gadolinium did not stimulate Pi-dependent ERK1/2 phosphorylation (Figure 5A). Consistently,
213 gadolinium had no effect on the Pi-induced level of MGP and OPN transcripts in a calcium-free
214 medium (Figure 5B).

215 In order to ascertain whether or not a G-protein coupled calcium-sensing receptor might play a
216 role in the modulation of Pi-dependent effects of calcium, we treated MC3T3-E1 cells with pertussis
217 toxin (PTX), an inhibitor of G proteins. Our results show that PTX had no effect on ERK1/2
218 stimulation (Figure 5C) and MGP/OPN mRNA expression (Figure 5D) by Pi and calcium.

219 This data suggests that a G-protein coupled calcium-sensing receptor mechanism is unlikely to
220 be involved in the modulation of the Pi-dependent cellular effects of calcium.

221

222 **Role of calcium phosphate precipitates in the ERK1/2 phosphorylation and MGP/OPN mRNA**
223 **upregulation**

224 As calcium does not mediate its effects in the Pi-dependent ERK1/2 and MGP/OPN stimulation
225 through a calcium-sensing receptor mediated mechanism, we investigated whether the precipitates
226 formed by these two ions could account for the observed effects. Using transmission electron
227 microscopy (TEM), we first assessed whether calcium and Pi ions could precipitate under our
228 experimental conditions. With 1.8 mM of calcium and 10 mM of phosphate, calcium phosphate
229 precipitation occurs after 30 minutes (Figure 6A). The precipitates formed under these conditions are
230 round-shaped, and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis revealed that their chemical
231 composition is similar to that of apatitic calcium phosphate crystals (Figure 6B).

232 To assess whether these precipitates are involved in the activation of ERK1/2 and gene
233 expression, we used the calcium chelator EDTA (20). TEM analysis showed that the formation of
234 calcium phosphate precipitates (CaPp) was prevented by EDTA (Figure 6C). We next examined the
235 effects of EDTA on the ion pair-mediated ERK1/2 phosphorylation. Western blot analysis showed that
236 in the presence of EDTA, the ion pair-induced ERK1/2 phosphorylation was inhibited (Figure 6D).
237 Consistently, the stimulation of MGP and OPN mRNA expression in response to Pi and calcium was
238 inhibited in the presence of EDTA (Figure 6E). This data indicates that the chelation of calcium,
239 resulting in the absence of CaPp formation, prevents the ion pair-induced cellular responses.

240 To further investigate the role of CaPp in the phosphorylation of ERK1/2 and MGP/OPN
241 expression, we assessed the effect of calcium and Pi in the presence of phosphocitrate, an inhibitor of
242 CaPp formation (21). Using TEM, we first showed that phosphocitrate prevented CaPp formation,
243 hence maintaining a high concentration of Pi and calcium in the vicinity of cells (Figure 7A). Next, we
244 showed that 1mM phosphocitrate inhibited ERK1/2 phosphorylation in response to a 30-minute ion
245 pair treatment (Figure 7B). Consistently, the effect of calcium and Pi on MGP and OPN mRNA
246 expressions were blunted by 1mM phosphocitrate (Figure 7C). This data shows that the inhibition of
247 the CaPp formation prevented Pi-dependent cellular effects despite the presence of high calcium
248 concentrations.

249 Moreover, we could mimic the effect of calcium and Pi in ERK1/2 phosphorylation and
250 MGP/OPN mRNA expression by treating MC3T3-E1 cells with exogenous CaPp (Figures 7D and E).
251 Collectively, our data strongly suggests that CaPp play an essential role in calcium and Pi-dependent
252 cellular effects.

253
254 **Endocytosis of CaPp is necessary for Pi- and Ca-dependent ERK1/2 phosphorylation and**
255 **MGP/OPN mRNA upregulation**

256 Previous studies have shown that crystals mediate their cellular effects in various cell types, such as
257 chondrocytes or fibroblasts, through an endocytosis mechanism (22). In order to determine whether

258 CaPp endocytosis is required, MC3T3-E1 cells were pre-treated (30 minutes) with 3 μ g/ml filipin, an
259 inhibitor of the endocytosis mediated by caveolae and lipidic rafts (23), or 1 μ g/ml of chlorpromazine,
260 an inhibitor of endocytosis mediated by clathrin (23). Our results show that chlorpromazine treatment
261 led to a decrease in CaPp-induced ERK1/2 phosphorylation whereas filipin treatment did not have any
262 effects (Figure 8A). Consistently, real-time PCR analysis revealed that chlorpromazine inhibited the
263 CaPp-induced MGP and OPN expression (Figure 8B).

264 We further investigated the effects of chlorpromazine on cells treated with 10 mM of Pi in the
265 presence of 1.8 mM calcium. The results show that the Pi-induced ERK1/2 phosphorylation and the
266 Pi-induced MGP/OPN mRNA upregulation were blunted in the presence of chlorpromazine (Figures
267 8C and 8D). This data confirmed that the CaPp formed by the addition of 10mM of Pi were prevented
268 from undergoing endocytosis by chlorpromazine. This data suggests that endocytosis mediated
269 through clathrin vesicles is involved in the effects of Pi and CaPp on ERK1/2 phosphorylation and
270 MGP/OPN gene upregulation.

271

272
273

Discussion

274 Whilst calcium is a divalent cation used by cells as a second messenger to control a great variety of
275 cellular processes, it is also well acknowledged as a specific extracellular signal able to regulate
276 proliferation, activity and differentiation of skeletal cells (19). In contrast, the role of Pi as an
277 extracellular signal able to regulate gene expression in skeletal cells has only recently been shown. It
278 is now evident that Pi is able to stimulate the expression of mineralization-regulating proteins such as
279 MGP and OPN in chondrocytes and bone-forming cells through the activation of specific signaling
280 molecules including the MAP kinase ERK1/2 pathway (5, 7, 8). Due to the concomitant presence of
281 phosphate and calcium in the vicinity of bone cells, we questioned whether calcium might modulate
282 the effects of extracellular Pi in osteoblasts.

283 In a first set of experiments we showed that Pi stimulates MGP and OPN transcript expression
284 *via* the ERK1/2 pathway in the murine MC3T3-E1 osteoblastic cell line and in primary osteoblasts
285 derived from murine calvaria. Our data therefore corroborates the numerous reports indicating that
286 extracellular Pi may act as a specific signal to regulate gene expression in bone cells (24, 25). To
287 evaluate whether calcium may modulate the effects of Pi on ERK1/2-mediated gene expression, we
288 investigated the response of osteoblasts to Pi in the absence of calcium. Under these conditions, the
289 effects of Pi were almost completely abolished. When osteoblasts were treated with calcium in the
290 absence of phosphate in the culture medium, we consistently failed to detect any ERK1/2 activation or
291 gene expression. This data led us to speculate that calcium was required for Pi to activate ERK1/2-
292 dependent MGP and OPN expression. Interestingly other groups have made similar observations
293 suggesting that calcium was required for Pi to activate some apoptotic mechanisms (26) and bone-
294 associated gene expression (7) in osteoblasts. In spite of this described role of calcium in the Pi-
295 regulated cellular processes, the underlying molecular mechanisms remain poorly understood. As a
296 first step to decipher these molecular mechanisms, we considered two hypotheses.

297 In the first hypothesis, one can assume that calcium can act as a specific extracellular signal
298 able to activate downstream molecules, which in turn regulate the Pi-dependent intracellular signaling
299 pathways. This raises the possibility that extracellular calcium can be recognized by a specific G-
300 protein coupled calcium receptor present at the osteoblast membranes (14). To address this hypothesis,
301 we used gadolinium, a well-documented calcium agonist able to activate the calcium receptor (14, 27,
302 28). Our results showed that gadolinium has no effect on the Pi-dependent activation of ERK1/2 or
303 gene expression in a calcium-free medium. Whether a calcium receptor mechanism plays a role in the
304 modulation of Pi-dependent cellular effects of calcium has also been investigated by the use of a well
305 known G-protein inhibitor PTX (14). PTX had no effect on Pi-dependent cellular effects. Considered
306 together, this data rules out the possibility that a calcium receptor-dependent mechanism may be
307 involved. Several studies have shown that CaSR-deficient mice exhibit a normal skeletal phenotype
308 when the hyperparathyroidism resulting from the lack of the parathyroid CaSR is prevented (29, 30).

309 These results seem to show that CaSR does not have a physiological role in osteoblasts, and
310 corroborates our data. However, other studies have proposed that changes in extracellular calcium
311 affect osteoblast proliferation and bone mineralization, through the activation of a CaSR-mediated
312 signaling pathway (31). Contrary to our results, it has been shown that as mineralization progresses,
313 CaSR signaling may act to prevent excessive accumulation of bone by stimulating production of
314 inhibitors of mineralization such as OPN (19).

315 As CaSR is not involved in the Pi-mediated cellular effects in osteoblasts, we sought to clarify
316 the second hypothesis that was related to the formation of calcium phosphate precipitates (CaPp) that
317 may occur in the concomitant presence of calcium and Pi *in vitro*. At the Ca and Pi concentrations
318 used in the present study, we have shown that CaPp formation is rapid and occurs as early as 30
319 minutes after incubation, therefore ruling out the possibility that CaPp had no effect in mediating the
320 effects of both ions could not be considered. By chelating calcium with EDTA or by preventing
321 calcium Pi precipitation with phosphocitrate we not only blunted the formation of precipitates but also
322 the Pi-dependent cellular response. This data strongly suggested that a CaPp-dependent mechanism
323 was involved in the cellular responsiveness to Pi and calcium. To strengthen the relevance of our data,
324 we then demonstrated that exogenous CaPp are able to mimic the effects of the ion pair. Interestingly,
325 this finding is consistent with several reports indicating that CaPp may trigger the activation of
326 specific cellular processes (32-34). Basic CaP crystals (BCP) were thus found to stimulate the *in vitro*
327 proliferation of fibroblasts-like synoviocytes and chondrocytes and to induce the production of matrix
328 metalloproteinases (35-37) via the activation of ERK1/2 and PKC.

329 In addition, it has been shown that in various crystal-induced diseases BCP may also affect
330 tissue integrity by the stimulation of cyclooxygenase 1 and 2 and the production of prostaglandin E2
331 (33, 36). Despite the fact that crystals are well known to affect several cellular processes, the
332 molecular mechanisms involved are yet to be fully deciphered. Among the mechanisms that may be
333 considered crystals endocytosis has been largely reported (38-41). Two endocytic processes have been
334 extensively described: the clathrin-mediated (42, 43) and the caveolae-mediated (44) pathways. By
335 using specific inhibitors of these endocytic pathways, we have strongly suggested that under our
336 conditions CaPp could mediate their effects on osteoblasts at least via an endocytic mechanism
337 mediated by clathrin vesicles. Another mechanism that may be considered to explain the effects of
338 CaPp on osteoblasts is the putative presence of a yet unknown crystal receptor on the surface of cells.
339 Cellular recognition of crystals has been described during the course of gouty arthritis to explain the
340 inflammatory potential of monosodium urate monohydrate (MSU) crystal deposits (45, 46). In this
341 pathological context, the cellular recognition of MSU crystals is likely to be due to the presence of
342 specific Toll-like receptors (45, 46). Moreover other proteins such as annexin II have been identified
343 as potential crystal receptors. Annexin II seems to be a calcium oxalate monohydrate crystal-binding
344 protein present on the surface of renal tubular cells and is involved in kidney stone formation (47).

345 Whether a crystal-binding protein-mediated mechanism could also be involved in the response of
346 osteoblasts to CaPp requires further investigation

347 In conclusion, our data demonstrates, for the first time, that calcium plays a pivotal role in
348 regulating the effects of Pi on bone cells. The mechanisms by which calcium modulates the
349 osteoblastic effects of Pi seems not to involve the activity of a calcium-sensing receptor but more
350 likely requires the formation of calcium Pi precipitates that in turn induce cell activation through an
351 endocytotic pathway. Whether the CaPp could also be specifically recognized by a membrane receptor
352 remains unknown and requires additional study. Our study may help us better appreciate the role of Pi
353 and calcium as well as CaPp in the complex physiopathology of calcified tissues and highlights the
354 potential existence of a CaPp-dependent negative feedback loop to control excessive calcification
355 through the regulation of mineralization-inhibiting proteins such as MGP and OPN.

References

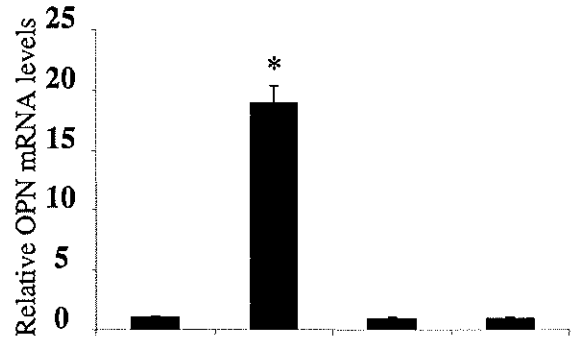
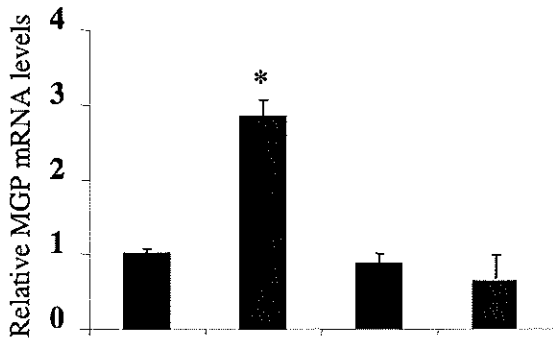
1. **Terkeltaub RA** 2001 Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1-C11
2. **Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Chihara K** 2002 IGF-I mediates the stimulatory effect of high phosphate concentration on osteoblastic cell proliferation. *J Cell Physiol* 190:306-312
3. **Beck GR, Jr., Zerler B, Moran E** 2000 Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8352-8357
4. **Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE** 2007 Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 27:4465-4474
5. **Julien M, Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz C, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J** 2007 Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology* 148:530-537
6. **Magne D, Bluteau G, Fauchoux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J** 2003 Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 18:1430-1442
7. **Beck GR, Jr., Knecht N** 2003 Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent. *J Biol Chem* 278:41921-41929
8. **Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A, Gatius M, Bozec A, Wagner EF, Wittrant Y, Masson M, Weiss P, Beck L, Magne D, Guicheux J** 2009 Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *J Bone Miner Res* 24:1856-1868
9. **Wang KX, Denhardt DT** 2008 Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:333-345
10. **Yao Y, Nowak S, Yochelis A, Garfinkel A, Bostrom KI** 2007 Matrix GLA protein, an inhibitory morphogen in pulmonary vascular development. *J Biol Chem* 282:30131-30142
11. **Gopalakrishnan R, Suttamanatwong S, Carlson AE, Franceschi RT** 2005 Role of matrix Gla protein in parathyroid hormone inhibition of osteoblast mineralization. *Cells Tissues Organs* 181:166-175
12. **Palmer G, Zhao J, Bonjour J, Hofstetter W, Caverzasio J** 1999 In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone* 24:1-7
13. **Guicheux J, Palmer G, Shukunami C, Hiraki Y, Bonjour JP, Caverzasio J** 2000 A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone* 27:69-74
14. **Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, Wang N, Fontilla-Poole M, Mays RW, Brunden KR, Harrington JJ, Quarles LD** 2005 Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 280:40201-40209
15. **Choudhary S, Wadhwa S, Raisz LG, Alander C, Pilbeam CC** 2003 Extracellular calcium is a potent inducer of cyclo-oxygenase-2 in murine osteoblasts through an ERK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 18:1813-1824

16. **Adams CS, Shapiro IM** 2003 Mechanisms by which extracellular matrix components induce osteoblast apoptosis. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:230-239
17. **Demadis KD, Sallis JD, Raptis RG, Baran P** 2001 A crystallographically characterized nine-coordinate calcium-phosphocitrate complex as calcification inhibitor in vivo. *J Am Chem Soc* 123:10129-10130
18. **Livak KJ, Schmittgen TD** 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408
19. **Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D** 2004 Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5140-5145
20. **Mellau LS, Jorgensen RJ** 2003 Does EDTA-infusion affect calcium homeostasis leading to increased resistance to challenge? *Acta Vet Scand Suppl* 97:29-34
21. **Tew WP, Malis CD, Howard JE, Lehninger AL** 1981 Phosphocitrate inhibits mitochondrial and cytosolic accumulation of calcium in kidney cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:5528-5532
22. **Borkowf A, Cheung HS, McCarty DJ** 1987 Endocytosis is required for the mitogenic effect of basic calcium phosphate crystals in fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 40:173-176
23. **Orlandi PA, Fishman PH** 1998 Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141:905-915
24. **Beck GR, Jr., Moran E, Knecht N** 2003 Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res* 288:288-300
25. **Conrads KA, Yi M, Simpson KA, Lucas DA, Camalier CE, Yu LR, Veenstra TD, Stephens RM, Conrads TP, Beck GR, Jr.** 2005 A combined proteome and microarray investigation of inorganic phosphate-induced pre-osteoblast cells. *Mol Cell Proteomics* 4:1284-1296
26. **Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM** 2001 Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276:20316-20322
27. **Pi M, Quarles LD** 2004 A novel cation-sensing mechanism in osteoblasts is a molecular target for strontium. *J Bone Miner Res* 19:862-869
28. **Berra Romani R, Raqeeb A, Laforenza U, Scaffino MF, Moccia F, Avelino-Cruz JE, Oldani A, Coltrini D, Milesi V, Taglietti V, Tanzi F** 2009 Cardiac microvascular endothelial cells express a functional Ca⁺-sensing receptor. *J Vasc Res* 46:73-82
29. **Kos CH, Karaplis AC, Peng JB, Hediger MA, Goltzman D, Mohammad KS, Guise TA, Pollak MR** 2003 The calcium-sensing receptor is required for normal calcium homeostasis independent of parathyroid hormone. *J Clin Invest* 111:1021-1028
30. **Tu Q, Pi M, Karsenty G, Simpson L, Liu S, Quarles LD** 2003 Rescue of the skeletal phenotype in CasR-deficient mice by transfer onto the Gcm2 null background. *J Clin Invest* 111:1029-1037
31. **Marie PJ** The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. *Bone* 46:571-576
32. **Cheung HS** 2005 Biologic effects of calcium-containing crystals. *Curr Opin Rheumatol* 17:336-340
33. **Morgan MP, McCarthy GM** 2002 Signaling mechanisms involved in crystal-induced tissue damage. *Curr Opin Rheumatol* 14:292-297

34. **Morgan MP, Whelan LC, Sallis JD, McCarthy CJ, Fitzgerald DJ, McCarthy GM** 2004 Basic calcium phosphate crystal-induced prostaglandin E2 production in human fibroblasts: role of cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2, and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum* 50:1642-1649
35. **Major ML, Cheung HS, Misra RP** 2007 Basic calcium phosphate crystals activate c-fos expression through a Ras/ERK dependent signaling mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 355:654-660
36. **Molloy ES, Morgan MP, Doherty GA, McDonnell B, Hilliard M, O'Byrne J, Fitzgerald DJ, McCarthy GM** 2008 Mechanism of basic calcium phosphate crystal-stimulated cyclo-oxygenase-1 up-regulation in osteoarthritic synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 47:965-971
37. **Reuben PM, Sun Y, Cheung HS** 2004 Basic calcium phosphate crystals activate p44/42 MAPK signal transduction pathway via protein kinase Cmicro in human fibroblasts. *J Biol Chem* 279:35719-35725
38. **Halverson PB, Greene A, Cheung HS** 1998 Intracellular calcium responses to basic calcium phosphate crystals in fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 6:324-329
39. **Schepers MS, Duim RA, Asselman M, Romijn JC, Schroder FH, Verkoelen CF** 2003 Internalization of calcium oxalate crystals by renal tubular cells: a nephron segment-specific process? *Kidney Int* 64:493-500
40. **Kohjimoto Y, Ebisuno S, Tamura M, Ohkawa T** 1996 Interactions between calcium oxalate monohydrate crystals and Madin-Darby canine kidney cells: endocytosis and cell proliferation. *Urol Res* 24:193-199
41. **Tsujihata M, Yoshimura K, Tsujikawa K, Tei N, Okuyama A** 2006 Fibronectin inhibits endocytosis of calcium oxalate crystals by renal tubular cells. *Int J Urol* 13:743-746
42. **Oh JM, Choi SJ, Lee GE, Kim JE, Choy JH** 2009 Inorganic metal hydroxide nanoparticles for targeted cellular uptake through clathrin-mediated endocytosis. *Chem Asian J* 4:67-73
43. **Bauer IW, Li SP, Han YC, Yuan L, Yin MZ** 2008 Internalization of hydroxyapatite nanoparticles in liver cancer cells. *J Mater Sci Mater Med* 19:1091-1095
44. **Kiss AL, Botos E** 2009 Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med* 13:1228-1237
45. **Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, Terkeltaub R** 2005 TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *J Immunol* 174:5016-5023
46. **Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM, Terkeltaub R** 2005 Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum* 52:2936-2946
47. **Kumar V, Farrell G, Deganello S, Lieske JC** 2003 Annexin II is present on renal epithelial cells and binds calcium oxalate monohydrate crystals. *J Am Soc Nephrol* 14:289-297

Figure 1

A



U0126 (μM)	0	0	30	30
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

U0126 (μM)	0	0	30	30
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

B

U0126 (μM)	0	0	30	30
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

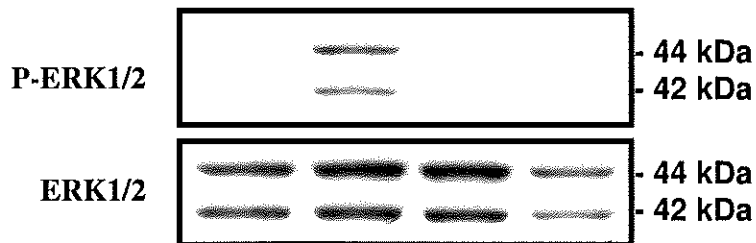
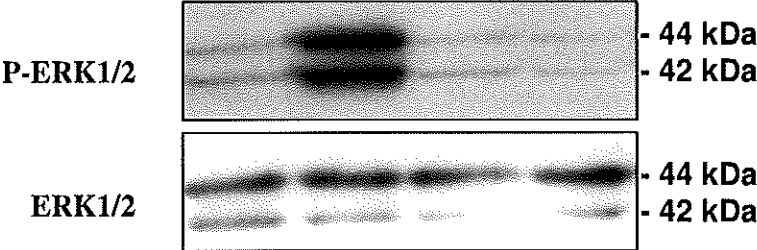


Figure 2

A

PI (mM)	1	10	1	10
Ca (mM)	1.8	1.8	0	0



B

PI (mM)	0	0	0	0
Ca (mM)	1.8	4	7	10

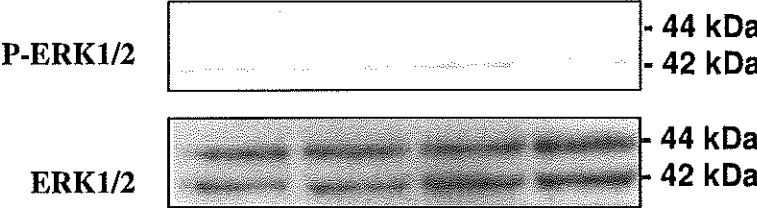
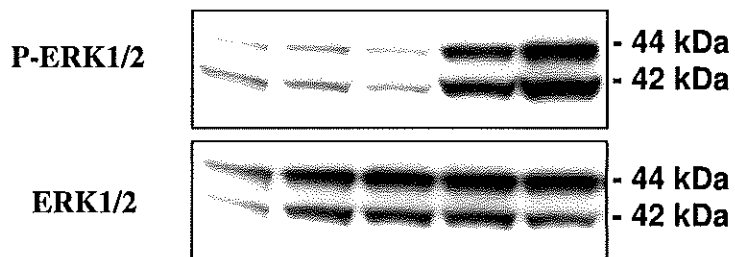


Figure 3

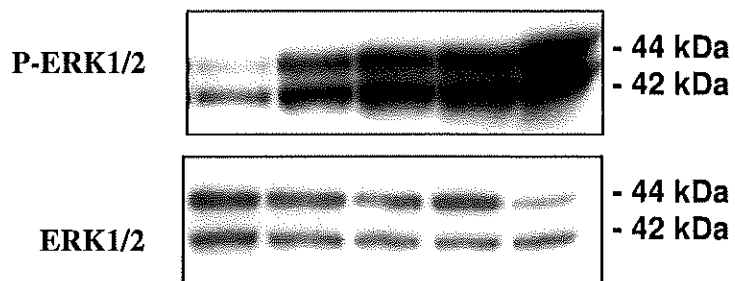
A

Pi (mM)	0	2	4	7	10
Ca (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8



B

Pi (mM)	1	1	1	1	1
Ca (mM)	0	1.8	4	7	10



C

Pi (mM)	0	10	10	10	10
Ca (mM)	0	1.8	4	7	10

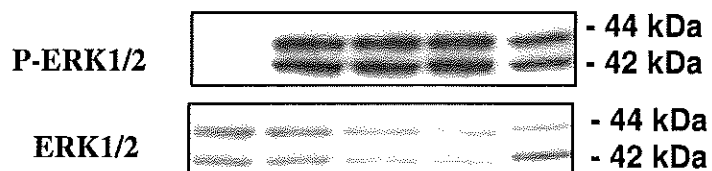
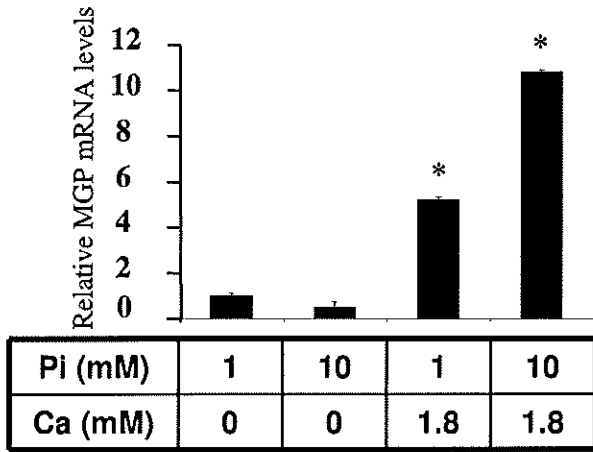
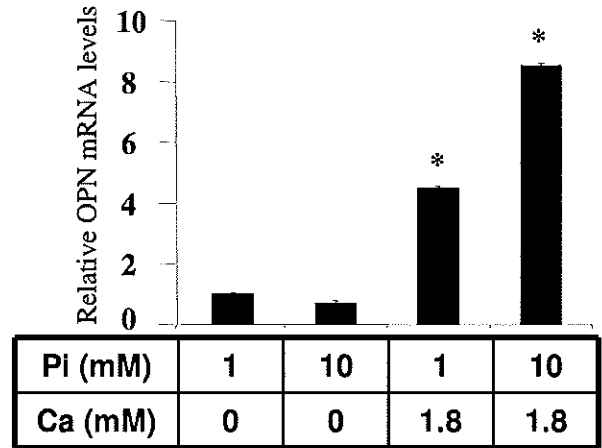


Figure 4

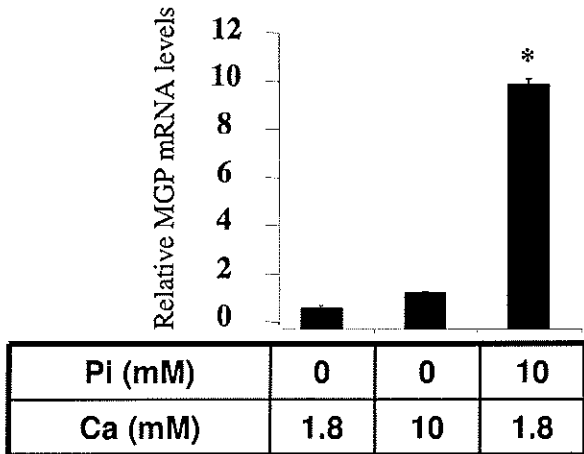
A



B



C



D

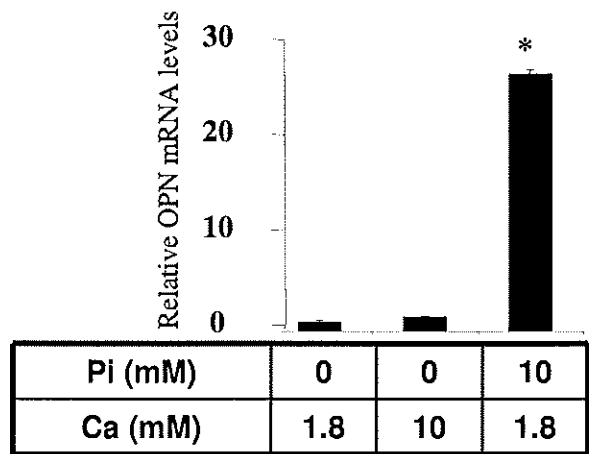
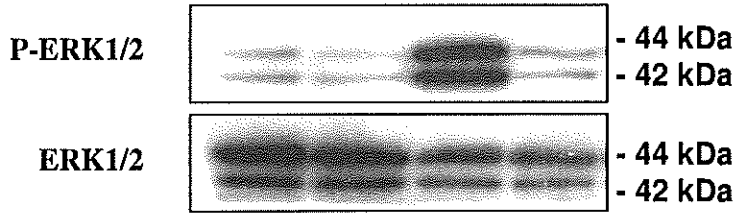


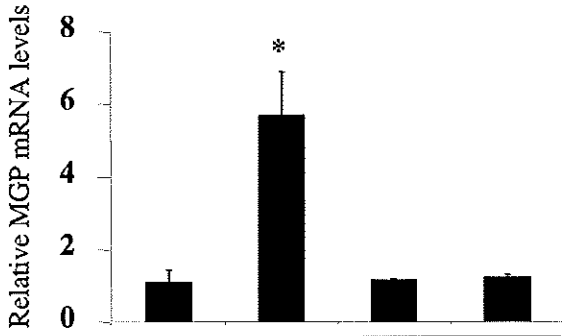
Figure 5

A

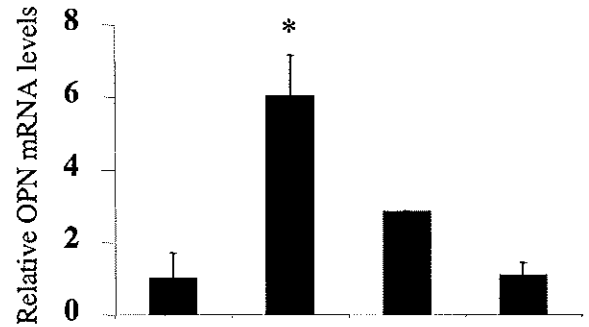
Gd ³⁺ (μM)	0	5	0	5
Ca ²⁺ (mM)	1.8	0	1.8	0
Pi (mM)	1	1	10	10



B



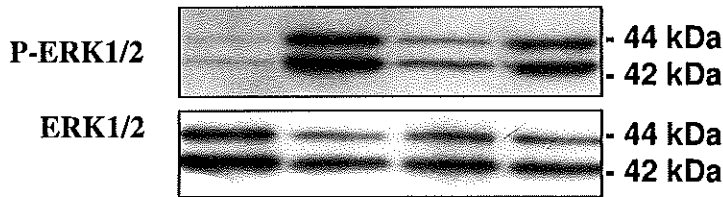
Gd ³⁺ (μM)	0	0	5	5
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	0	0
Pi (mM)	1	10	1	10



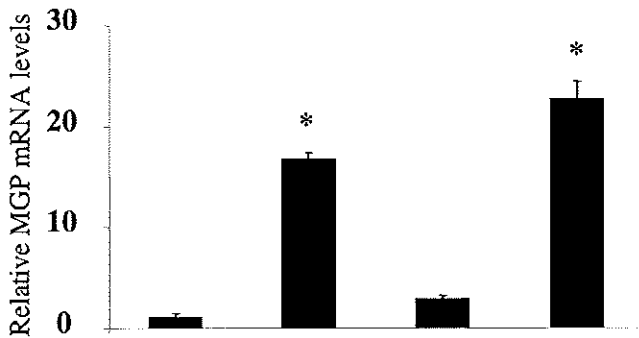
Gd ³⁺ (μM)	0	0	5	5
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	0	0
Pi (mM)	1	10	1	10

C

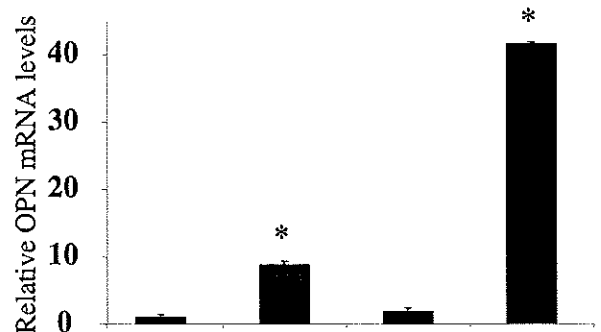
PTX (ng/mL)	0	0	100	100
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10



D



PTX (ng/mL)	0	0	100	100
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

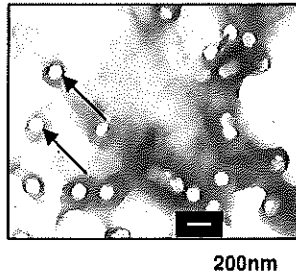


PTX (ng/mL)	0	0	100	100
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

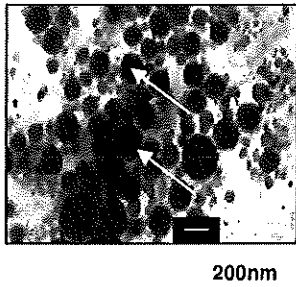
Figure 6

A

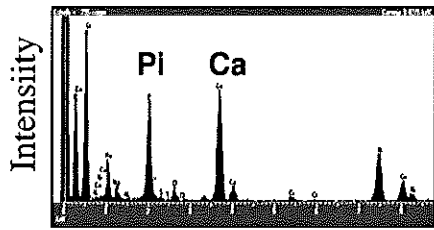
Pi (1mM)
Ca²⁺ (1.8mM)



Pi (10mM)
Ca²⁺ (1.8mM)

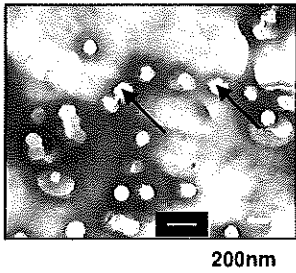


B



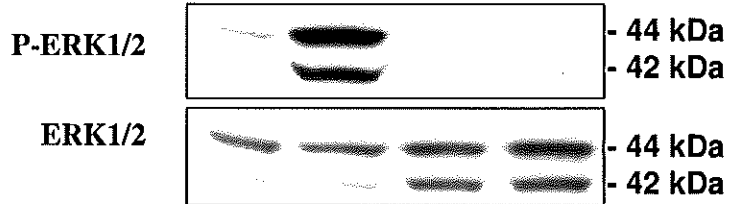
C

Pi (10mM)
Ca²⁺ (1.8mM)
EDTA (1mM)

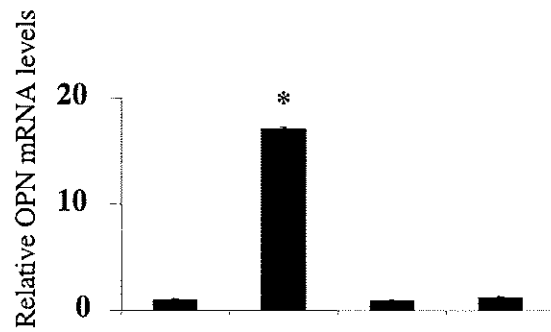
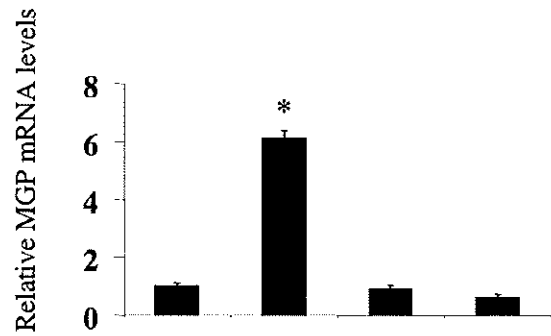


D

EDTA (mM)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10



E

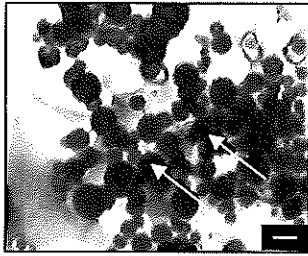


EDTA (mM)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

Figure 7

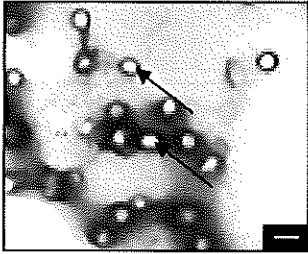
A

Pi (10mM)
Ca²⁺ (1.8mM)



200nm

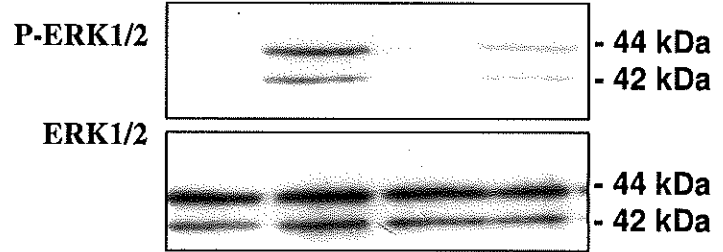
Pi (10mM)
Ca²⁺ (1.8mM)
PC (1mM)



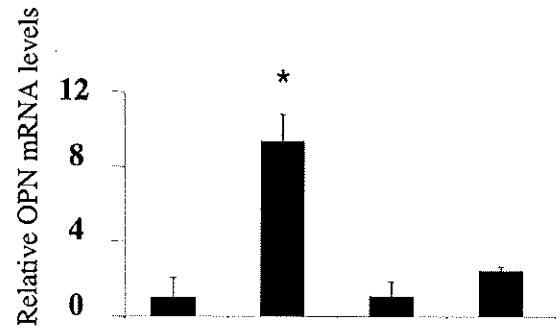
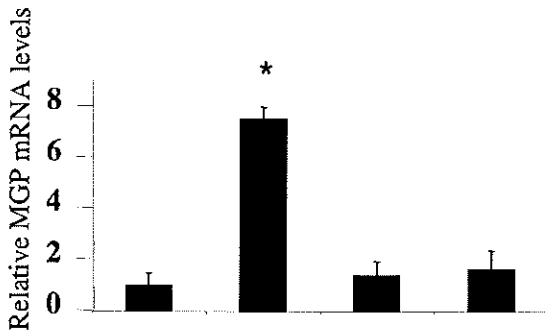
200nm

B

PC (mM)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10



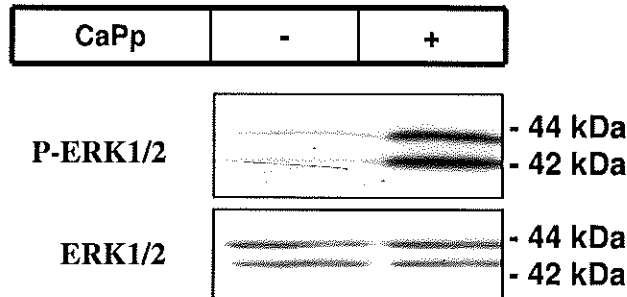
C



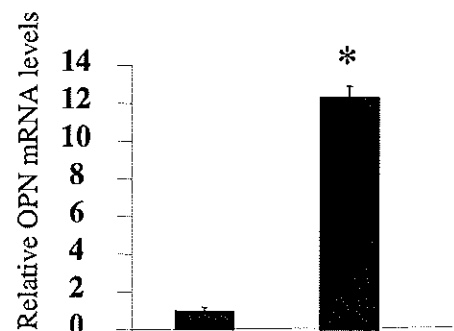
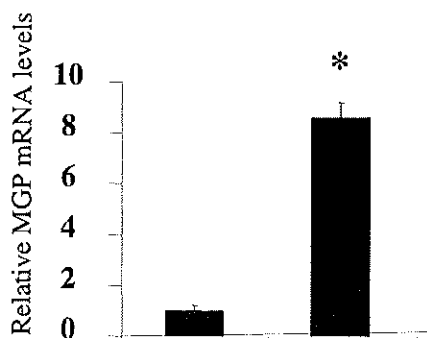
PC (mM)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

PC (mM)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

D



E



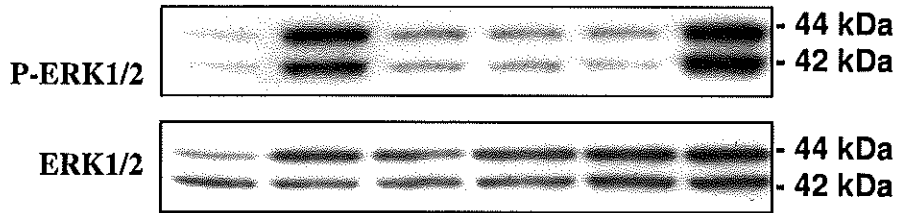
CaPp	-	+
------	---	---

CaPp	-	+
------	---	---

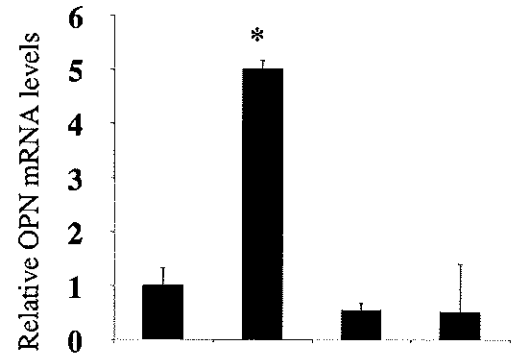
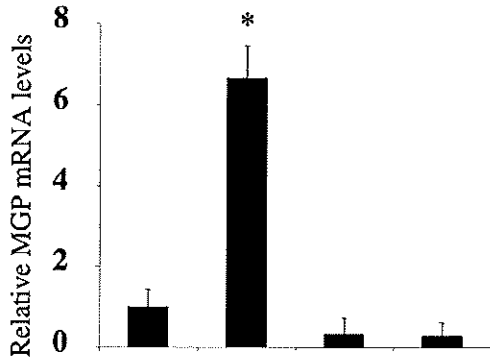
Figure 8

A

Filipin ($\mu\text{g/mL}$)	0	0	0	0	3	3
Chlorpromazine ($\mu\text{g/mL}$)	0	0	1	1	0	0
CaPp	-	+	-	+	-	+

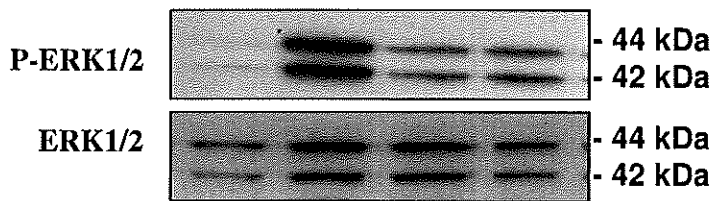


B

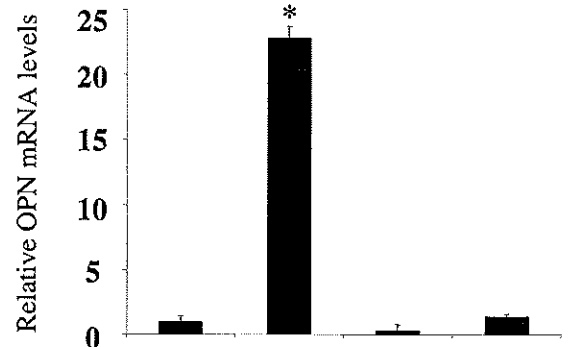
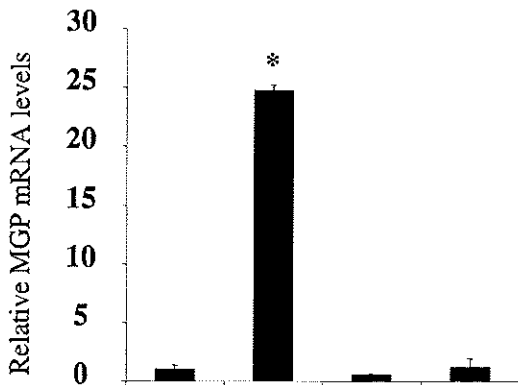


C

Chlorpromazine ($\mu\text{g/mL}$)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10



D



Chlorpromazine ($\mu\text{g/mL}$)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

Chlorpromazine ($\mu\text{g/mL}$)	0	0	1	1
Ca ²⁺ (mM)	1.8	1.8	1.8	1.8
Pi (mM)	1	10	1	10

1 **Figure legends**

2

3 **Figure 1 : Effects of Pi on ERK1/2 phosphorylation and MGP/OPN mRNA expression in**
4 **primary osteoblasts**

5 Primary osteoblasts derived from mouse calvaria were cultured as described in the Materials
6 and Methods section before treatment with Pi for 24 hours (A) or 30 minutes (B) in the
7 presence or absence of U0126 (A, B). The effect of Pi on MGP and OPN expression was
8 assessed by real-time PCR (A) as described in the Materials and Methods section. The effect
9 of 10mM Pi on ERK1/2 phosphorylation was assessed by Western Blot (B) as described in
10 the Materials and Methods section. A representative gel is shown. Data are representative of
11 three experiments with similar results.*p<0.05 as compared to untreated cells.

12

13 **Figure 2: Effects of Pi or calcium on ERK1/2 phosphorylation in primary osteoblasts**

14 Primary osteoblasts derived from mouse calvaria were cultured in Pi- and/or calcium-free
15 DMEM as described in the Materials and Methods section. The effects of treatments with
16 increasing concentrations (as indicated) of Pi alone (A), calcium alone (B), or combinations
17 of both ions (A) for 30 minutes on ERK1/2 phosphorylation were assessed by Western Blot as
18 described in the Materials and Methods section. Representative gels are shown.

19

20 **Figure 3: Inter-relationship between Pi and calcium in ERK1/2 phosphorylation in**
21 **MC3T3-E1 osteoblasts**

22 (A) MC3T3-E1 cells were cultured in the presence of 1.8 mM calcium, together with various
23 concentrations of Pi for 30 minutes (0 to 10 mM). (B, C) MC3T3-E1 cells were treated with
24 increasing calcium concentration (0 to 10 mM), together with either 1 mM Pi (B) or 10 mM
25 Pi (C), for 30 minutes. The effects of these treatments were assessed on ERK1/2
26 phosphorylation by Western Blot as described in the Materials and Methods section.
27 Representative gels are shown.

28

29 **Figure 4: Calcium-dependent Pi induction of MGP and OPN mRNA expression in**
30 **MC3T3-E1 osteoblasts**

31 MC3T3-E1 cells were cultured in Pi- and/or calcium-free DMEM as described in the
32 Materials and Methods section. The effects of treatments with increasing concentrations of Pi
33 alone, calcium alone, or combinations of both ions for 24 hours on MGP (A) and OPN (B)
34 expression were assessed by real-time PCR as described in the Materials and Methods

35 section. Data are representative of three experiments with similar results.*p<0.05 as compared
36 to untreated cells.

37
38 **Figure 5: Effects of gadolinium (Gd³⁺) or pertussis toxin (PTX) on ERK1/2**
39 **phosphorylation and MGP and OPN mRNA expression in MC3T3-E1 osteoblasts**

40 MC3T3-E1 cells were cultured in a calcium-free (DMEM) medium or 1.8 mM calcium (α -
41 MEM) medium, as indicated. Cells were then treated with 10 mM Pi for 30minutes (A, C) or
42 24 hours (B, D) after a 30 minutes pre-treatment with 5 μ M Gd³⁺ (A, B) or with 100ng/mL
43 PTX (C, D). The ERK1/2 phosphorylation was then assessed by Western Blot (A, C), and
44 MGP and OPN mRNA expressions were assessed by real-time PCR (B, D), as described in
45 the Materials and Methods section. Data are representative of three experiments with similar
46 results.*p<0.05 as compared to untreated cells.

47
48 **Figure 6: Effects of EDTA on calcium-phosphate precipitates formation, ERK1/2**
49 **phosphorylation and MGP/OPN mRNA expression in MC3T3-E1 osteoblasts**

50 Nine mM Pi were added to a medium containing 1.8 mM calcium and 1 mM Pi (α -MEM),
51 and the formation of precipitates in absence (A) or presence of 1 mM EDTA (C) was
52 observed by TEM as described in the Materials and Methods section. The nature of the
53 precipitates was determined by EDX analysis (B). The effects of EDTA on Pi-stimulated
54 ERK1/2 phosphorylation (D) or on Pi-stimulated MGP and OPN expression (E) were
55 determined by western blot after 30 minutes (D) or by real-time PCR after 24 hours of Pi
56 treatment (E). Data are representative of experiments with similar results.*p<0.05 as
57 compared to untreated cells.

58
59 **Figure 7: Effects of phosphocitrate (PC) and of synthesized calcium phosphate**
60 **precipitates on ERK1/2 phosphorylation and MGP/OPN mRNA expression in MC3T3-**
61 **E1 osteoblasts**

62 Nine mM of Pi were added to a medium containing 1.8 mM calcium and 1 mM Pi, and the
63 formation of precipitates in the absence or presence of PC was monitored by TEM as
64 described in the Materials and Methods section (A). MC3T3-E1 cells were cultured as
65 described in the Materials and Methods section before treatment with 10mM Pi in the absence
66 or presence of PC (1mM) or with synthesized calcium phosphate precipitates (CaPp). The
67 effects of PC on Pi-stimulated ERK1/2 phosphorylation (B) or on Pi-stimulated MGP and
68 OPN expression (C) were determined by western blot after 30 minutes (B) or real-time PCR

69 after 24 hours of Pi treatment (C). The effects of CaPp on ERK1/2 phosphorylation (D) and
70 on MGP and OPN expression (E) were determined by western blot after 30 minutes (D) or
71 real-time PCR after 24 hours of Pi treatment (E). Data are representative of experiments with
72 similar results. *p<0.05 as compared to untreated cells.

73
74 **Figure 8: Effects of endocytosis inhibitors on calcium phosphate precipitates or Pi-**
75 **induced ERK1/2 phosphorylation and MGP/OPN expression in osteoblasts**

76 MC3T3-E1 cells were pretreated with filipin (3µg/mL) or chlorpromazine (1µg/mL) for 1
77 hour followed by treatment with synthesized CaPp or Pi for 30 minutes (A, C) or 24 hours (B,
78 D) as described in the Materials and Methods section. The effects of filipin or chlorpromazine
79 on CaPp- or Pi-stimulated ERK1/2 phosphorylation were assessed by Western Blot (A, C).
80 The effects of chlorpromazine on CaPp- or Pi-stimulated MGP and OPN expression (B, D)
81 were determined by real-time PCR. Data are representative of experiments with similar
82 results. *p<0.05 as compared to untreated cells.

83
84
85

II. DISCUSSION

L'homéostasie du phosphate doit être maintenue au sein de l'organisme afin de pourvoir au développement squelettique normal et d'éviter les dérèglements liés à l'hyper ou l'hypophosphatémie. Une hypophosphatémie peut en effet conduire à des défauts de croissance et de minéralisation osseuse conduisant au rachitisme ou à l'ostéomalacie. Au contraire, une hyperphosphatémie entraîne des calcifications ectopiques, notamment au niveau des vaisseaux où il a été montré que le Pi induisait une transdifférenciation des cellules musculaires lisses des vaisseaux vers un phénotype ostéochondrocytaire (574). La concentration de Pi et de calcium est élevée dans l'environnement des cellules squelettiques du fait du remodelage osseux permanent qui libère du Pi et du calcium à partir de la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite de l'os. De plus, l'activité de la phosphatase alcaline, qui hydrolyse du pyrophosphate, contribue à la libération de Pi dans l'environnement des cellules osseuses. De nombreuses études ont montré que le Pi et le calcium sont des éléments régulateurs de la différenciation des cellules squelettiques. Ainsi, de nombreux gènes semblent être régulés par des variations de concentration de ces ions dans les ostéoblastes (35, 292, 503). Une étude de puces à ADN menée au sein du laboratoire sur une lignée chondrocytaire, les ATDC5, ainsi que sur une lignée ostéoblastique, les MC3T3-E1, a montré que de nombreux gènes, dont deux codant pour des protéines impliquées dans la régulation de la minéralisation, la protéine gla matricielle (MGP) et l'ostéopontine (OPN), ont leur expression régulée par le Pi (données non publiées ; (503)). Par ailleurs, la présence simultanée de ces deux ions en fortes concentrations conduit à la formation de précipités de phosphate de calcium (575) qui sont également décrits comme capables de réguler l'expression de différents gènes, en particulier dans certaines situations pathologiques dans les chondrocytes articulaires ou les synoviocytes (560, 561, 563).

Dans ce contexte, nous avons souhaité examiner les effets du phosphate (article 2) et l'implication des ions calcium et/ou la formation des précipités de phosphate de calcium (article 3) dans la régulation de l'expression de la MGP et de l'OPN dans les ostéoblastes.

Dans ces cellules, nous avons montré que l'expression de la MGP et de l'OPN était stimulée en réponse à la paire d'ions et aux cristaux (article 2 et 3). Cependant, il est à noter que

certain auteurs considèrent que la MGP serait principalement exprimée par les cellules chondrocytaires et les cellules musculaires lisses des vaisseaux tandis que les cellules ostéoblastiques n'exprimeraient que peu de MGP (223). Afin d'évaluer l'expression de la MGP au sein des ostéoblastes, nous avons utilisé des cellules de la lignée MC3T3-E1, ainsi que des ostéoblastes primaires provenant de calvaria de souris nouveaux-nés, sur lesquels des études de RT-PCR en temps réel et de western blot ont été réalisées. De plus, afin de mettre en évidence la présence de MGP dans les cellules osseuses, des études d'hybridation *in situ* ont été effectuées sur des MC3T3-E1, sur de la calvaria de souris nouveaux-nés ainsi que sur des os longs de souris en collaboration avec Hervé Kempf (INSERM U833, Paris) (Figure 19). Ces résultats s'accordent à démontrer que la MGP est exprimée au sein des ostéoblastes et corroborent ainsi les données de différentes études (576, 577). Néanmoins, malgré le grand nombre d'études sur l'expression de MGP dans les ostéoblastes, son rôle physiologique dans les cellules osseuses reste à être déterminé. En effet, la MGP, initialement isolée de l'os et caractérisée par Price et Williamson (291), est particulièrement connue pour son rôle d'inhibiteur de la minéralisation. Ainsi, des souris déficientes en MGP présentent des calcifications ectopiques, notamment au niveau du cartilage et des vaisseaux. Des études ont montré que l'expression de la MGP était stimulée en réponse au calcium extracellulaire dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux et que la MGP constituerait une réponse physiologique de l'organisme pour prévenir les calcifications ectopiques (578). Les résultats de nos travaux (articles 2 et 3) et de travaux antérieurs (292) indiquent que le Pi et/ou les précipités de phosphate de calcium stimulent l'expression de la MGP dans les cellules squelettiques. Ces données nous suggèrent que l'effet de la paire d'ions ou des précipités de phosphate de calcium sur l'expression de la MGP dans les cellules squelettiques constituerait un mécanisme de rétrocontrôle négatif de la quantité de minéral déposé, comme illustré par la figure 20.

Un des mécanismes d'inhibition de la calcification par la MGP consiste en la liaison des ions calcium et de l'hydroxyapatite par ses résidus gla, qui sont issus d'une réaction de γ -carboxylation dépendante de la vitamine K. Ainsi, l'utilisation de la warfarine, un inhibiteur de la γ -carboxylation de la MGP, entraîne une hausse de la minéralisation *in vitro* et *in vivo* au niveau des vaisseaux et de la plaque de croissance (578, 579). Par ailleurs, des études ont montré que la phosphorylation de la MGP était importante dans la médiation de ses effets (578, 580). La connaissance de ou des enzymes responsables de la phosphorylation de la MGP pourrait nous permettre de déterminer si le Pi, en plus d'augmenter l'expression de la MGP, stimule aussi son activité en favorisant sa phosphorylation. Parallèlement à la MGP, la

fétuin-A semble être exprimée par les ostéoblastes (577). Une activité d'inhibition de la minéralisation lui a également été attribuée au niveau des artères, bien que les souris invalidées pour la fétuin-A présentent un phénotype moins sévère que les souris invalidées pour la MGP (581). Au vu de ces résultats, il serait intéressant de déterminer si le Pi régule l'expression de la fétuin-A dans les ostéoblastes afin d'évaluer la possibilité d'un rétrocontrôle négatif de la minéralisation osseuse en présence de Pi comme il a été suggéré précédemment pour la stimulation de l'expression de la MGP par le Pi.

Parallèlement à ses effets anti-calcification directs, la MGP a récemment été proposée comme une protéine inhibitrice de l'activité de protéines morphogènes de l'os comme la BMP-2. Cependant les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets anti-BMP-2 de la MGP ne sont que partiellement élucidés. Une étude sur des cellules stromales de moelle de souris a mis en évidence que la MGP avait un effet inhibiteur dose-dépendant sur la différenciation ostéoblastique induite par la BMP-2 (580). Par co-immunoprécipitation de la MGP et de la BMP-2, ces auteurs ont démontré que l'effet produit sur la différenciation ostéoblastique impliquait directement une liaison physique de la MGP à la BMP-2 (582). De plus, une protéase, l'HtrA1 (High Temperature Required) semble impliquée dans la régulation de l'activité de la BMP-2 par la MGP. En effet, HtrA1 cliverait la MGP au niveau C terminal et augmenterait son affinité pour la matrice, inhibant ainsi l'action de la BMP-2 dans la minéralisation (583). Afin de mieux comprendre les effets potentiels du Pi et de la MGP sur la modulation des propriétés ostéogéniques de la BMP-2, des études sont menées actuellement au laboratoire pour déterminer si un traitement au Pi pourrait induire une augmentation de l'expression de MGP et une modulation de l'activité phosphatase alcaline induite par la BMP-2 dans les ostéoblastes. Les premiers résultats sont encourageants et montrent que la stimulation de l'activité phosphatase alcaline (PAL) par la BMP-2 est inhibée en présence de Pi. Ceci suggère que le Pi interviendrait dans la régulation de l'activité PAL par la BMP-2. Ces résultats soulèvent l'hypothèse que le Pi, qui est le produit final de la réaction enzymatique catalysée par la PAL, inhiberait par rétrocontrôle négatif l'activité de cette enzyme. Afin de déterminer si la MGP est impliquée dans ces effets, des études consistant à traiter les cellules avec ou sans warfarine sont en cours. Des études ont également été menées pour déterminer l'effet du Pi sur HtrA1 mais les résultats préliminaires n'ont pas mis en évidence de rôle régulateur du Pi sur l'expression de cette protéase. Parallèlement, d'autres études ont montré que la sclérostine, une protéine sécrétée par les ostéocytes, pouvait également se lier à la BMP-2, bien qu'avec une faible affinité (584, 585) et qu'elle jouait un rôle important dans la régulation de la minéralisation. En effet, cette molécule est impliquée

dans l'inhibition de la formation osseuse. C'est pourquoi des études complémentaires visant à étudier l'expression de la MGP dans des lignées ostéocytaires précoces et tardives, les MLO-Y4 et MLO-A5 fournies par le Dr Bonewald (Université du Missouri, Kansas City), ainsi que son éventuelle régulation par le Pi dans ces cellules sont en cours au sein du laboratoire.

Enfin, il a été montré que la MGP était impliquée dans l'inhibition de l'apoptose dans des chondrocytes de la plaque de croissance (310). De plus, le Pi entraîne l'apoptose des cellules chondrocytaires et ostéoblastiques (35, 518). Il peut donc être supposé que la MGP, dont l'expression est stimulée en réponse au Pi, joue un rôle de contrôle de l'apoptose des cellules osseuses (Figure 19). Afin d'appréhender le rôle de la MGP dans l'apoptose des ostéoblastes traités au Pi, il est envisagé d'évaluer la mort par apoptose d'ostéoblastes provenant de calvaria de souris déficientes pour la MGP (collaboration Hervé Kempf, INSERM U833).

Nos analyses des voies de signalisation intracellulaires ont révélé que dans des ostéoblastes de la lignée MC3T3-E1 et des ostéoblastes primaires dérivés de calvaria de souris nouveaux-nés, le Pi stimule l'expression de la MGP et de l'OPN via la voie ERK1/2 des MAPK.

D'autres études ont également mis en évidence le rôle de cette voie en réponse au Pi dans différents types cellulaires tels que les ostéoblastes, les chondrocytes et les cellules pulmonaires (35, 36, 292, Conrads, 2004 #169, 512), cependant certains types cellulaires tels que les cellules de lignées fibroblastique (L929) et myoblastiques (C2C12) ne présentent pas de phosphorylation de ERK1/2 en réponse au Pi. Ceci suggère une double spécificité du Pi au niveau d'une part de la voie qu'il active et d'autre part du type cellulaire concerné par l'activation de cette voie. Cette spécificité ne peut être mise en relation avec l'expression de PiT-1 et PiT-2 car ces transporteurs sont exprimés de manière ubiquitaire. Cependant, la multiplicité des voies de signalisation potentiellement impliquées dans la différenciation des cellules squelettiques, ainsi que l'étude de Beck et al. qui démontre l'activation d'autres voies de signalisation {Beck, 2003 #374, 522, 523}, nous ont conduits à étudier les autres voies de signalisation activées en réponse au Pi. Dans ce but, nous avons utilisé des puces à anticorps dirigés contre des protéines phosphorylées en collaboration avec M. Feron et L. Guevel (UMR CNRS 6204, Nantes) sur des cellules ostéoblastiques traitées ou non au Pi. L'analyse de ces puces à anticorps dirigés contre des protéines a montré une activation de ERK1/2 en réponse au Pi. En revanche, aucune activation n'a été détectée pour les différentes isoformes de p38 (p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ) ni pour les isoformes de JNK (JNK1, JNK2, JNK3). Ces résultats confirment nos données obtenues par western blot (article 2 ; (292)). D'autres voies (akt, GSK-3 α/β) ont également été analysées par ces puces à anticorps et ne semblent pas

stimulées par le Pi (données non illustrées). Ces données confirment la spécificité du Pi à activer la voie ERK1/2.

Il convient de noter que le Pi stimule la phosphorylation de ERK1/2 selon une cinétique biphasique : de manière précoce dès 15 à 30 minutes puis tardive à partir de 8-24 heures. Face à cette cinétique biphasique, nous nous sommes demandés si la phosphorylation tardive dépendait de la survenue de la phosphorylation précoce. Afin de répondre à cette question, nous avons traité les cellules avec différents types d'inhibiteurs après un traitement au Pi de 30 minutes. Les résultats préliminaires montrent qu'après 30 minutes de traitement au Pi, le traitement des ostéoblastes avec du PFA et de l'EDTA empêche la survenue de la phosphorylation de ERK1/2 à 8 heures (données non illustrées). Ces résultats préliminaires suggèrent que la phosphorylation tardive de ERK1/2 ne dépend pas de la phosphorylation précoce mais nécessiterait la présence de précipités de phosphate de calcium ou de la paire d'ion Pi et calcium afin de se produire. Des études sont actuellement en cours au laboratoire afin de définir si la stimulation de l'expression des gènes dépend de la phosphorylation précoce ou tardive de ERK1/2, ou des deux.

Le Pi stimule l'expression de la MGP via une cascade d'évènements impliquant la voie ERK1/2. Cependant nos études et celles d'autres équipes nous ont conduits à déterminer si Fra-1, un membre de la famille de transcription AP-1, était impliqué dans la stimulation de la MGP en réponse au Pi. En effet, la constatation d'une part que des souris délétées pour Fra-1 ($\text{fra-1}^{\Delta/\Delta}$) présentent une réduction de l'expression de la MGP dans les ostéoblastes (93), d'autre part qu'il existe des sites putatifs de liaison aux facteurs AP-1 au niveau du promoteur de la MGP et enfin que Fra-1 doit être phosphorylé par ERK1/2 pour être activé (505) nous a conduits à nous demander si Fra-1 était impliqué dans la régulation de l'expression de la MGP dans les ostéoblastes par le Pi. Au cours de notre étude (article 2), nous avons déterminé que l'expression de Fra-1 est stimulée par le Pi. De plus, des analyses de western blot mené en présence d'un inhibiteur de la voie ERK1/2 ont permis de montrer que l'activation de ERK1/2 est responsable de la phosphorylation de Fra-1 en réponse au Pi. Ces données sont en accord avec une étude menée dans des ostéoblastes et qui montrent que Fra-1 est régulé de manière post-traductionnelle en réponse au Pi (505).

Il convient cependant de noter qu'outre ERK1/2, ERK5, qui reste une voie MAPK peu décrite comparée à ERK1/2, est également capable de réguler l'activité de Fra-1 (586). C'est pourquoi nous avons également recherché l'implication de ERK5 dans la régulation de l'activité de Fra-1 et de l'expression de la MGP en réponse au Pi. Cependant, nos données

n'ont pas mis en évidence d'activation de cette voie ERK5 en réponse au Pi (données non illustrées).

De plus, nous avons montré que le Pi stimule l'expression de l'OPN via la voie ERK1/2 (article 3). Le rôle de Fra-1 dans la régulation de l'OPN par le Pi n'a pas été étudié. Cependant, les ostéoblastes de souris délétées pour Fra-1 ne présentent pas de variation de l'expression de l'OPN en réponse au Pi (article 2). Néanmoins, il est possible que les différents membres de la famille AP-1 exercent des rôles redondants et qu'ainsi dans les ostéoblastes de ces souris, un autre membre de la famille fos remplace Fra-1.

Les mécanismes impliqués en amont de la régulation de l'expression de la MGP et de l'OPN en présence du Pi ont également été étudiés. Nos résultats montrent que la présence du calcium est primordiale pour que le Pi assure ses effets. Plusieurs hypothèses ont été soulevées suite à cette observation. D'une part, l'implication d'un récepteur sensible au calcium (CaSR) dans les effets cellulaires dépendant du Pi a été étudiée. Les récepteurs sensibles au calcium appartiennent à une famille de récepteurs à protéine G constitués de sept domaines transmembranaires et ont été clonés pour la première fois dans des glandes parathyroïdiennes bovines (418). La fonction physiologique majeure de ces récepteurs est de contrôler la sécrétion des hormones parathyroïdiennes en réponse à la concentration de calcium extracellulaire (418). Il a été montré par la suite que ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus, tels que le rein, l'intestin, le cerveau, cependant leur rôle dans ces tissus non impliqués dans l'homéostasie calcique n'est pas clairement défini (587). L'expression de ces récepteurs au sein des ostéoblastes reste controversée et certaines études montrent l'expression du GPRC6A, un récepteur sensible au calcium de structure différente, mais de fonction identique au CaSR, dans les ostéoblastes (428). Cependant notre étude soutient l'hypothèse que les effets du calcium sur la phosphorylation de ERK1/2 et la stimulation de l'expression des gènes Pi-dépendant n'impliqueraient pas un mécanisme de récepteurs sensibles au calcium couplés à une protéine G. Toutefois, ces résultats se basent uniquement sur l'utilisation du gadolinium et de la toxine pertussique, c'est pourquoi des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces données. Des études d'ARN interférence dirigées contre le CaSR (en collaboration avec R. Mentaverri, INSERM ERI-12, Amiens) et le développement d'ARN interférence contre le GPRC6A sont actuellement en cours au sein du laboratoire afin de préciser le rôle de ces senseurs au calcium. De plus, l'utilisation d'autres agonistes tels que la néomycine (588) ou la spermine (589) est envisagée afin d'appuyer nos données.

Par ailleurs, il a été montré que le Pi et le calcium peuvent précipiter sous forme de précipités de phosphate de calcium lors de conditions favorables dans les milieux de culture. De plus, des études menées sur des synoviocytes et des chondrocytes articulaires ont montré que différents types de cristaux (monosodium urate ou pyrophosphate de calcium dihydraté par exemple) pouvaient déclencher l'activation de voies de signalisation et réguler l'expression de gènes (560, 567, 570). C'est pourquoi nous avons exploré dans un second temps la possible implication des précipités de phosphate de calcium dans les effets cellulaires observés en réponse au phosphate et au calcium. Des observations faites par microscopie électronique à transmission montrent la formation de précipités de phosphate de calcium en présence de 10 mM de Pi et de 1,8 mM de calcium et ce dès 30 minutes. Les effets de précipités de phosphate de calcium exogènes sur la phosphorylation de ERK1/2 et l'expression de la MGP et de l'OPN ont été étudiés. Nos données indiquent que ces précipités interviennent dans les effets cellulaires observés (article 3). Il convient de préciser que les précipités de phosphate de calcium obtenus en milieu de culture sont amorphes. Des cristaux amorphes sont également décrits avec les cristaux d'apatite dans le milieu extracellulaire des cellules osseuses. En effet, lors de la minéralisation, les vésicules matricielles subissent différentes étapes de maturation : dans un premier temps, elles sont vides, puis elles se chargent en ions phosphate et calcium et forment des précipités amorphes qui vont évoluer vers des cristaux d'hydroxyapatite matures qui vont être libérés dans le milieu extracellulaire (590). De plus, il est intéressant de noter que les précipités formés dans le milieu de culture à 30 minutes et 8 heures/ 24 heures évoluent d'une forme globulaire vers une forme en aiguilles (données non illustrées). Une étude récente menée sur des macrophages a montré que la morphologie des cristaux entraient en compte dans la réponse cellulaire, les formes en aiguille induisant une plus grande production de médiateurs inflammatoires et étant plus toxiques (568). C'est pourquoi il serait intéressant d'étudier l'influence de la morphologie des précipités de phosphate de calcium sur la réponse cellulaire. Cela peut laisser supposer qu'en fonction du temps, deux mécanismes différents pourraient intervenir dans la réponse au Pi et au calcium. Par ailleurs, il a été montré que les cristaux pouvaient mener leurs actions via leur endocytose par la cellule (559). Différents mécanismes d'endocytose ont été décrits selon la taille des particules à internaliser et les protéines impliquées, tels que l'internalisation par les puits recouverts de clathrine ou l'endocytose médiée par les cavéoles (591). Ces différents types d'endocytose peuvent être différenciés grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Dans notre étude, le blocage de l'endocytose médiée par les vésicules à clathrine semble inhiber l'action des précipités de phosphate de calcium tandis que l'inhibition de l'endocytose médiée par les cavéoles et les

radeaux lipidiques n'affecte pas la réponse cellulaire aux précipités de phosphate de calcium. Ces données indiquent que des mécanismes spécifiques d'endocytose pourraient être à l'origine des effets des précipités dans les ostéoblastes. Cette étude montre pour la première fois l'implication de précipités de phosphate de calcium dans la régulation de l'expression des gènes dans un cadre physiologique. D'autres études ont montré l'implication de cristaux de phosphate de calcium basiques dans des pathologies microcristallines telles que l'arthrose. Ainsi, ces cristaux de phosphate de calcium basiques stimulent la production de prostaglandines dans les cellules synoviales. Ils provoquent également la production de protéases neutres et stimulent la division cellulaire au cours des arthropathies (556). Des études consistant à déterminer d'une part s'il existe des récepteurs aux cristaux, tels que les Toll-like receptor ou l'annexine II (260, 570) comme il a été décrit dans la littérature et d'autre part si une dissolution intracellulaire des cristaux est nécessaire pour que ces derniers médient leurs effets (559) sont en cours au sein du laboratoire.

Outre l'implication des précipités de phosphate de calcium, la dernière voie qui peut être envisagée pour expliquer les effets cellulaires du calcium et du phosphate sur l'activation de ERK1/2 et l'expression des gènes est celle impliquant des transporteurs de phosphate. Des études ont montré que des transporteurs de type III, PiT-1 et PiT-2, sont exprimés par les ostéoblastes (365). L'implication de ces transporteurs dans les effets du Pi dans les cellules ostéoblastiques est actuellement en cours d'étude au sein du laboratoire. L'utilisation de la technique d'ARN interférence va nous permettre de réduire l'expression de PiT-1 et/ou PiT-2 dans des lignées ostéoblastiques et de déterminer le rôle précis de ces transporteurs dans les effets du Pi *in vitro*. Les résultats préliminaires montrent que l'extinction de PiT-2 empêche les effets du Pi sur l'activation de ERK1/2 et l'expression de la MGP. Cette absence de signalisation intervient en présence d'un transport de Pi normal, probablement dû à une surexpression de PiT-1 dans les cellules inactivées pour PiT-2. Ces résultats laissent supposer un possible rôle de PiT-2 en tant que récepteur sensible à la variation de la concentration extracellulaire en Pi. De plus, des analyses de puces à ADN sur des cellules transfectées de manière stable avec des ARN interférents shPiT-1 et/ou shPiT-2 et traitées ou non au Pi sont actuellement en cours au sein du laboratoire afin de déterminer plus largement l'impact de ces transporteurs dans la régulation de l'expression des gènes par le Pi. Parallèlement, nous avons étudié le rôle du transporteur PiT-1 dans le développement et la croissance osseuse chez la souris *in vivo* (A. Bourguin, Master 2, 2008-2009). La délétion totale de PiT-1 provoquant une mortalité intra-utérine en milieu de gestation, l'étude du phénotype osseux de ces embryons est très limitée. Par conséquent, notre étude a été réalisée sur des souris

porteuses d'un allèle hypomorphe pour PiT-1, produisant une faible quantité de protéines normales (collaboration Laurent Beck, INSERM U845, Paris). Ainsi, grâce à différents groupes de souris présentant des phénotypes de sévérité variable, nous avons pu effectuer l'analyse du phénotype osseux, par microscanner, et appréhender le rôle de PiT-1 *in vivo* dans le développement et la croissance osseuse. Les résultats suggèrent que la diminution de l'expression de PiT-1 chez des souris aurait des conséquences lors des premières étapes de croissance osseuse *in vivo* mais qu'un phénomène de compensation serait mis en place dans le temps de telle sorte que cette inhibition n'implique pas de conséquence dans la croissance osseuse à long terme. De manière complémentaire, des analyses menées sur des cellules ostéoblastiques primaires et des VSMC isolées de rats transgéniques surexprimant PiT-1 de manière constitutive (592) (collaboration Atsushi Suzuki, Division of Endocrinology, Fujita Health University School of Medicine, Tokyo, Japon) sont également en cours et nous aideront à mieux comprendre l'implication de ces transporteurs dans les effets du Pi.

Chapitre III : Effets du phosphate inorganique sur la différenciation des cellules odontoblastiques et analyse des mécanismes moléculaires impliqués

Article 4:

Inorganic phosphate regulates Glvr-1 and -2 expression: Role of calcium and ERK1/2

Wittrant Y., Bourguine A., Khoshniat S., Alliot-Licht B., Masson M., Gatus M., Rouillon T., Weiss P., Beck L., Guicheux J.

Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 3; 381(2): 259-63. Epub 2009 Feb 14.

Article 5:

Inorganic Phosphate Stimulates Apoptosis in Odontoblast-like Cells.

Bourguine A., Khoshniat S., Wauquier F., Oliver L., Hue E., Alliot-Licht B., Rouillon T., Weiss P., Beck L., Guicheux J., Wittrant Y.

Journal of Dental Research, en révision

I. PROBLEMATIQUE

La dent est le seul tissu minéralisé à l'interface entre l'individu et son environnement. Elle est constituée de trois tissus calcifiés (l'émail, la dentine et le cément) et d'un tissu conjonctif non minéralisé (la pulpe dentaire). Sa structure et sa composition sont essentielles pour éviter toute contamination par les agents pathogènes de la cavité buccale (593).

La dentine est constituée d'une matrice extracellulaire composée d'une phase minérale (cristaux d'apatite, 70%), d'une phase organique (collagène de type I, 20%) et d'eau (10%). Elle est sécrétée par des cellules spécialisées, les odontoblastes (594 , 595). La déminéralisation de l'émail et de la dentine lors de processus pathologiques, tels que le développement de caries, entraîne une libération d'ions calcium et de phosphate inorganique (Pi) par dissolution des cristaux d'apatite de l'émail et de la dentine, susceptibles de modifier l'activité odontoblastique (596). Des travaux menés au sein du laboratoire ont montré qu'un milieu de culture enrichi en Pi participe à la différenciation odontoblastique et à la minéralisation de la matrice extracellulaire (597). Cependant, il est à noter que Larmas *et al.* ont observé une absence d'augmentation de Pi dans l'environnement des cellules odontoblastiques au cours du processus carieux (598), ce qui suggèrerait un rôle des cellules odontoblastiques dans la régulation du Pi extracellulaire. Cette régulation de Pi extracellulaire pourrait dépendre de l'activité de transporteurs de phosphate. En effet, il a été montré que les odontoblastes expriment les transporteurs de type II, Npt2a et Npt2b, et de type III PiT-1 et PiT-2 (540 , 599). Dans ces cellules, une augmentation de l'expression et de l'activité des transporteurs de type III est concomitante avec la différenciation des odontoblastes (600). Bien que le rôle physiologique de ces transporteurs dans la biologie du squelette ne soit pas encore clairement défini, il a été montré dans le tissu osseux qu'une augmentation du niveau d'ARNm de PiT-1 est corrélée à la différenciation et à la minéralisation des ostéoblastes et des chondrocytes de la plaque de croissance (186, 365 , 398). La régulation de l'expression de ces transporteurs dépend de nombreux facteurs tels que l'IGF, le TGF- β , la PTH, ainsi que du phosphate lui-même (135 , 399 , 400 , 401 , 402 , 403 , 404). Ainsi, une déficience ou un excès de Pi peut augmenter ou réduire respectivement l'expression de ces transporteurs. Malgré le rôle possible des cellules odontoblastiques dans la régulation du transport de Pi et la possibilité de l'autorégulation de ces transporteurs par le Pi, la régulation des cotransporteurs PiT-1 et PiT-2 par le Pi n'a pas encore été étudiée dans les cellules odontoblastiques. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer d'une part la régulation de l'expression des

transcrits codant pour les PiT par le Pi ainsi que les mécanismes qui peuvent être impliqués dans la lignée cellulaire odontoblastique murine MO6-G3 (48), qui nous a été fournie par le Professeur MacDougall (University of Texas, Texas). De plus, nous avons cherché à déterminer l'implication du calcium dans la régulation de l'expression des transporteurs par le Pi. Les données obtenues lors de cette étude ont fait l'objet d'un article publié dans le *Biochemical and Biophysical Research Communication* (**article 4**). D'autre part, nous nous sommes demandés quelle était l'influence du Pi libéré sur l'activité des cellules dentaires. En effet, la survie cellulaire dépend de la capacité des cellules à s'adapter aux changements qui peuvent intervenir dans leur environnement. Ainsi, nous avons étudié l'effet du Pi sur la viabilité, la prolifération et l'apoptose des cellules MO6-G3. Nous avons par ailleurs soulevé l'hypothèse de l'implication du calcium et/ou des précipités de phosphate de calcium dans les effets du Pi. Les résultats obtenus dans cette étude ont conduit à un article en révision dans le *Journal of Dental Research* (**article 5**).

Les données de ces travaux devraient permettre de mieux comprendre le rôle du Pi libéré dans des conditions physiopathologiques comme par exemple au cours du processus carieux, sur l'activité et la viabilité des cellules odontoblastiques. Une meilleure connaissance de ces processus nous aiderait à élaborer de nouvelles stratégies pour la prévention et la réparation de la dentine en cas d'agressions pulpaire.

2.1 Article 4 : Le phosphate inorganique régule l'expression des transporteurs de phosphate sodium dépendants PiT-1 et PiT-2 : rôle du calcium et de ERK1/2

RESUME

Les cotransporteurs de phosphate sodium dépendants sont des régulateurs clefs de l'homéostasie du phosphate et ils jouent un rôle majeur dans le remodelage des tissus minéralisés. Ces transporteurs ont leur expression régulée par de nombreux facteurs. Dans notre étude, la régulation de l'expression des cotransporteurs de phosphate sodium dépendants de type III, PiT-1 et PiT-2, par le phosphate inorganique (Pi) a été déterminée dans la lignée murine odontoblastique MO6-G3. Par RT-PCR en temps réel, nous avons montré que l'expression de PiT-1 et PiT-2 est stimulée en réponse au Pi. Parallèlement à ce résultat, nous avons également observé une phosphorylation de ERK1/2 par western Blot et la formation de précipités de phosphate de calcium dans les puits de culture par microscopie électronique à transmission. L'utilisation d'un milieu dépourvu de calcium, ainsi que d'un inhibiteur de la voie ERK1/2, l'U0126, nous laisse suggérer que les effets du Pi sur la stimulation de l'expression des cotransporteurs de phosphate PiT-1 et PiT-2 implique la voie de signalisation ERK1/2 et requiert la présence de calcium. Des études futures permettant de déterminer précisément le mode d'action du calcium ou des précipités de phosphate de calcium seront à conduire. Cette étude contribue à améliorer la compréhension des effets du phosphate libéré au cours de processus carieux sur le transport de phosphate.



Inorganic phosphate regulates Glvr-1 and -2 expression: Role of calcium and ERK1/2

Y. Wittrant^{a,*}, A. Bourguine^a, S. Khoshniat^a, B. Alliot-Licht^a, M. Masson^a, M. Gatius^a, T. Rouillon^a, P. Weiss^a, L. Beck^b, J. Guicheux^a

^aINSERM Unité 791, Université de Nantes, Faculté de Chirurgie Dentaire, Nantes, France

^bINSERM Unité 845, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2009

Available online 14 February 2009

Keywords:

Type III sodium-dependent phosphate cotransporters Glvr-1

Glvr-2

Inorganic phosphate

Tooth decay

Odontoblasts

Calcium

ERK1/2

ABSTRACT

Sodium-dependent phosphate cotransporters are key regulators of phosphate homeostasis and play a major role in mineralized tissues remodelling. However, factors influencing their expression remain under consideration. In our study, modulation of type III sodium-dependent phosphate cotransporters expression by inorganic phosphate (Pi) was investigated in the murine odontoblast-like cell line MO6-G3. Experiments were designed to determine the effects of phosphate release on dental cells during tooth decay. By real-time RT-PCR we demonstrated that Glvr-1 and -2 expressions are up-regulated by Pi. The increase in Glvr-1 and -2 expressions was correlated with ERK1/2 phosphorylation and calcium/phosphate crystals formation in cultured wells. Using calcium-free culture conditions or the specific inhibitor of ERK phosphorylation (UO126), we demonstrated that Pi effects on Glvr-1 and -2 up-regulation require the presence of calcium and involve ERK signalling pathways. This study contributes to give new insights in the control of Pi transport during carious diseases.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Phosphate concentration plays a major role in many organ functions, for instance, in cardio-vascular system, kidneys, and mineralized tissues. In dental pathologies such as carious development, tooth is degraded [1] and demineralization of enamel and dentin leads to local release of inorganic phosphate (Pi) within dental tubuli. However, Larmas observed the absence of marked increase in Pi concentration suggesting a role of adjacent odontoblasts in regulating Pi transport in dental tissues [2]. Whether Pi, itself may play a role in Pi transport in odontoblast remains to be determined.

Three types of sodium-dependent phosphate cotransporters (NPCs) have been identified in different species based on their structure, tissue expression, and regulation. Type I and type II sodium-dependent phosphate cotransporters were found to be expressed in intestine and kidney to control phosphate reabsorption [3,4]. In odontoblasts, increased expression and activity of type II NPCs were found to be concomitant with mineralization and cell differentiation [5,6].

Recently, the cell surface receptor for gibbon ape leukemia virus (Glvr-1) was demonstrated to serve normal cellular functions as a sodium-dependent phosphate (NaPi) transporter. This protein

belongs to a newly identified phosphate transporter/retrovirus receptor gene family distinct from renal type I and II NaPi transporters.

In contrast to the type II sodium-dependent phosphate cotransporters, the type III Glvr-1 (Pit-1, SLC20A1) and Glvr-2 (Pit-2, Ram-1, SLC20A2) are ubiquitously expressed [7]. They were localized in kidney, heart, lung, brain, liver, bone and tooth [5,8]. Physiological functions of type III sodium-dependent phosphate cotransporters have not yet been identified. Nevertheless, in bone, increased Glvr-1 mRNA levels correlate with osteoblast differentiation and mineralization [9] and more generally type III NPCs may allow phosphate movement into cells.

Despite constitutive expression of type III sodium-dependent phosphate cotransporters in many tissues, it appears to be regulated by phosphate deficiency [7], insulin-like growth factor, transforming growth factor- β , platelet-derived growth factor [10–12] and PTH [13] in bone, intestine, kidneys, vessels and parathyroid glands. Whether type III cotransporters expressed in odontoblast are regulated by increased Pi concentration has not yet been described. This study contributes to give new insights in the control of Pi transport during carious diseases.

Materials and methods

Cell culture and inorganic phosphate treatments. Odontoblast cell line MO6-G3 was kindly obtained from Dr. Mary MacDougall

* Corresponding author.

E-mail address: yohann.wittrant@univ-nantes.fr (Y. Wittrant).

(Department of University of Texas Health Science Center at San Antonio). Cells were seeded at the density of 10,000 cells/cm² and grown in alpha-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Hyclone). At 80% confluence, odontoblasts were serum starved for a total of 48 h including incubation with inorganic phosphate (Pi). Cultures were treated with Pi at the concentration of 1 mM (normal control conditions) or 10 mM for increasing periods of time. To test the involvement of MAP-Kinases and calcium in mediating Pi effects, cells were incubated either with 5 μM of the ERK1/2 inhibitor UO126 (CalBiochem) or cultured in calcium-free medium (Invitrogen), respectively, in the presence of 1 mM or 10 mM Pi. Then, cells were harvested for microscopy analysis, gene expression and Western blot analysis.

Optic microscopy. Cells were visualized at 40× magnification using inverted optic microscope and pictures were taken at 0, 3, 6 and 24 h after treatments.

Transmission electron microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy. For transmission electron microscopy (TEM) studies, samples were filtrated and particles collected were deposited on TEM grids according to the following process. A few drops of sample were filtrated on a polycarbonate filter having pores diameter of 0.2 μm and previously covered with a thin layer of evaporated carbon. The filter was then rinsed with a few drops of pre-filtrated ethanol. After drying, the filter with particles was covered with a second layer of evaporated carbon. The filter was then deposited on Nickel grids and polycarbonate was dissolved with chloroform. After drying, TEM observation of grids was performed using a JEOL JEM1010 microscope, operating at accelerated voltage of 100 kV. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) measurements were also performed at 100 kV, using an Oxford Instruments Link ISIS spectrometer, equipped with an ATW2 ultrathin window (energy resolution: 142 eV at 5.9 keV).

RNA isolation. Total RNA was isolated from MO6-G3 cells using TRIzol reagent (GIBCO BRL) according to the manufacturer's instructions. Briefly, lysis of the cells in TRIzol was followed by centrifugation at 10,000g for 15 min, at 4 °C in the presence of chloroform. The upper aqueous phase was collected, and the RNA was precipitated by addition of isopropanol and centrifugation at 7500g for 5 min, at 4 °C. RNA pellets were washed with cold 75% ethanol, dried, reconstituted in sterile water, and quantified by spectrometry.

Real-time RT-PCR. RNA samples (1 μg) were treated with DNase I (1 U/μg) to remove any contaminating genomic DNA then reverse

transcribed using AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) according to manufacturer's protocol in a 20 μl total volume. RT products were diluted 10 times in sterile water. Template cDNAs (5 μl) were subjected to real-time PCR using the specific mouse primers β-actin [NM_007393; forward: AGTCTACAATGTGGCTGAGGAC (900 nM)/reverse: TTTGGGAGGGTGGGGACTTC (300 nM); amplicon 131 bp] and Glvr-1 [NM_015747.; forward: CGGAATCAACCTCTTTTCCA (200 nM)/reverse: CCCCACAGAGGAAGTTTGTC (200 nM); amplicon 72 bp]. The absence of DNA contamination in RNA preparations was tested by including RNA samples that had not been reverse transcribed. The actin housekeeping gene was used as internal control.

Real-time PCR was performed in the MX3000pro (Stratagene) using Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) according to the manufacturer's recommendations. The following temperature profile was used: 40 cycles of 30 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 30 s at 72 °C. Association curves were analyzed thanks to the MxProV3 software (Stratagene). The delta C_t (ΔC_t) (cycle threshold) method was used to calculate relative expression levels. Gene expression was arbitrary set as 1 in control condition cultures (untreated cultures).

Protein quantification. After treatment, cells were rapidly washed in cold PBS, frozen in liquid nitrogen and conserved at –80 °C until used. Cells were lysed at 4 °C by addition of a buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM potassium chloride, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 20 mM β-glycero-phosphate, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, and 1 mM NaF. The insoluble material was pelleted at 12,000g for 10 min at 4 °C. The protein concentration of cell lysates was determined at 562 nm using Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Reagent (Pierce) and compared to a standard curve.

Western blot analysis. Twenty micrograms of total protein were resolved by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane according to the manufacturer's protocol. Membranes for ERK1/2 and phospho-ERK1/2 were blocked and probed in 5% non-fat dry milk in PBS/Tween20 (1/1000). Primary antibodies were detected using anti-rabbit HorseRadish Peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody diluted in 5% non-fat dry milk in PBS/Tween20 (1/2000). The blots were visualized by Enhanced ChemiLuminescence (ECL) development using a Western blotting Detection System.

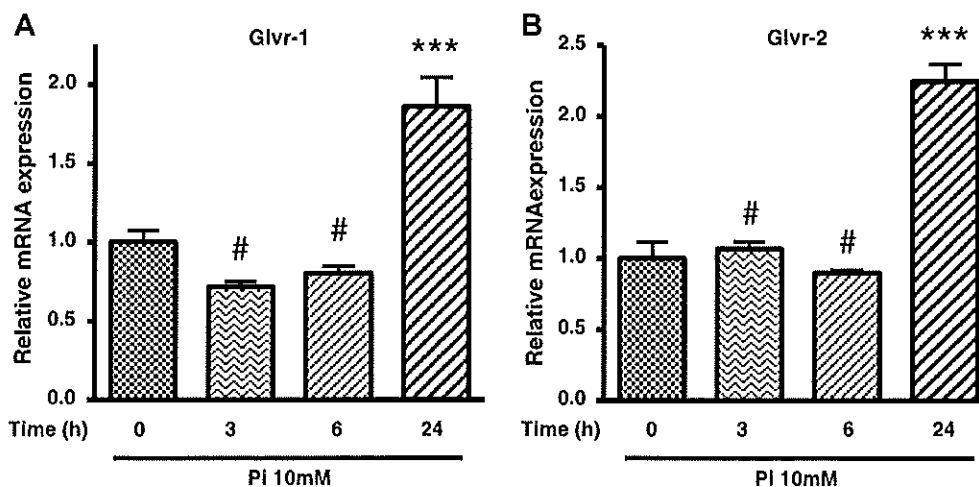


Fig. 1. Real-time RT-PCR analysis of Glvr-1 and -2 mRNA expressions, panels A and B respectively. MO6-G3 odontoblast cells were cultured in serum free medium for a total of 48 h including Pi treatments. Cells were subjected to RNA extraction prior to real-time RT-PCR. Glvr-1 and -2 mRNA levels were compared to the actin expression. Control conditions (Pi 1 mM) were arbitrary set as 1. Data represent the mean ± SE analyzed by one-way ANOVA Newman-Keuls' test. ****p* < 0.001 and #*p* > 0.05 versus control (0 h of treatment).

Statistical analysis. Results were analyzed either by one-way ANOVA Newman–Keuls' test or *t*-test using Prism4 software (Graphpad). Data represent the mean \pm SE of three separate experiments. Significance was determined as probability (*p*) < 0.05.

Results

Inorganic phosphate increases *Glv*r-1 and -2 expressions

MO6-G3 cell cultures were tested for modulation of transcriptional activity of sodium-dependent phosphate transporters (NPC) in the presence or absence of 10 mM of inorganic phosphate. Cells were harvested after 0, 3, 6 and 24 h of incubation with Pi and NPC mRNA expressions were analyzed by real-time RT-PCR. In this context, both, *Glv*r-1 and -2 appeared to be up-regulated by 10 mM Pi after 24 h treatment only, whereas no significant change was observed at 3 and 6 h time points (Fig. 1A and B). *Glv*r-1 and -2 increases reached approximately 185% and 225% of the control, respectively.

Inorganic phosphate induces crystal formation in odontoblast cultures

In order to determine how Pi could affect odontoblast, pictures of MO6-G3 cell cultures were taken at the same time points to correlate with transcriptional activity analysis. Images from Fig. 2 show a change in the aspect of the well resembling to crystal formation (Fig. 2H). This modification was observed after 24 h treatment with 10 mM Pi but not at early time points or in the presence of 1 mM Pi (Fig. 2A–G). These data correlate with the increase in the type III NPC expression suggesting the involvement of crystal formation in modulating *Glv*r-1 and -2 expressions.

Crystal formation in the presence of 10 mM Pi was confirmed by transmission electron microscopy analysis (Fig. 3A). Beside, energy-dispersive X-ray spectroscopy revealed that crystals are mainly composed from phosphate and calcium.

Calcium is necessary for mediating Pi effects

To investigate the role of newly formed crystals in regulating *Glv*r-1 and -2 expression, cells were cultured in calcium-free medium in the presence of 1 mM or 10 mM of Pi. Crystals did not form in the absence of calcium (data not shown) and results from real-time RT-PCR revealed that up-regulation by 10 mM Pi of both, *Glv*r-1 and -2 expressions were abrogated (Fig. 3C and D).

Involvement of ERK1/2 signalling pathways in Pi-induced *Glv*r-1 and -2 expressions

Odontoblast cultures were harvested for determining signalling pathways involved in Pi effects. Data from Fig. 4 demonstrate a stimulation of ERK1/2 phosphorylation at 24 h treatment with 10 mM Pi (Fig. 4A). These results correlate with crystal formation and up-regulation of *Glv*r-1 and -2 expressions and suggest a possible implication of ERK1/2 pathways in mediating Pi effects on type III NPC transcriptional activity. To confirm whether ERK1/2 was involved in Pi effects, MO6-G3 cells were cultured in the presence of 5 μ M of UO126, a specific inhibitor of ERK1/2 phosphorylation and *Glv*r-1 and -2 expression were analyzed in the presence of 1 mM and 10 mM Pi. Data obtained demonstrate that stimulation of type III NPC expression by 10 mM Pi was partially to entirely inhibited for *Glv*r-2 and *Glv*r-1 respectively, in the presence of the ERK1/2 inhibitor (Fig. 4B and C).

Discussion

During tooth decay establishment, increased amounts of inorganic phosphate and calcium are locally released and modify dental cells environment. To determine the influence of Pi on odontoblast activities, we investigated the expression of type III sodium-dependent phosphate cotransporters in the murine odontoblast-like cell line MO6-G3. Experiments were conducted in the presence or absence of increased Pi concentration to mimic tooth decay micro-environment. By real-time RT-PCR we demonstrated,

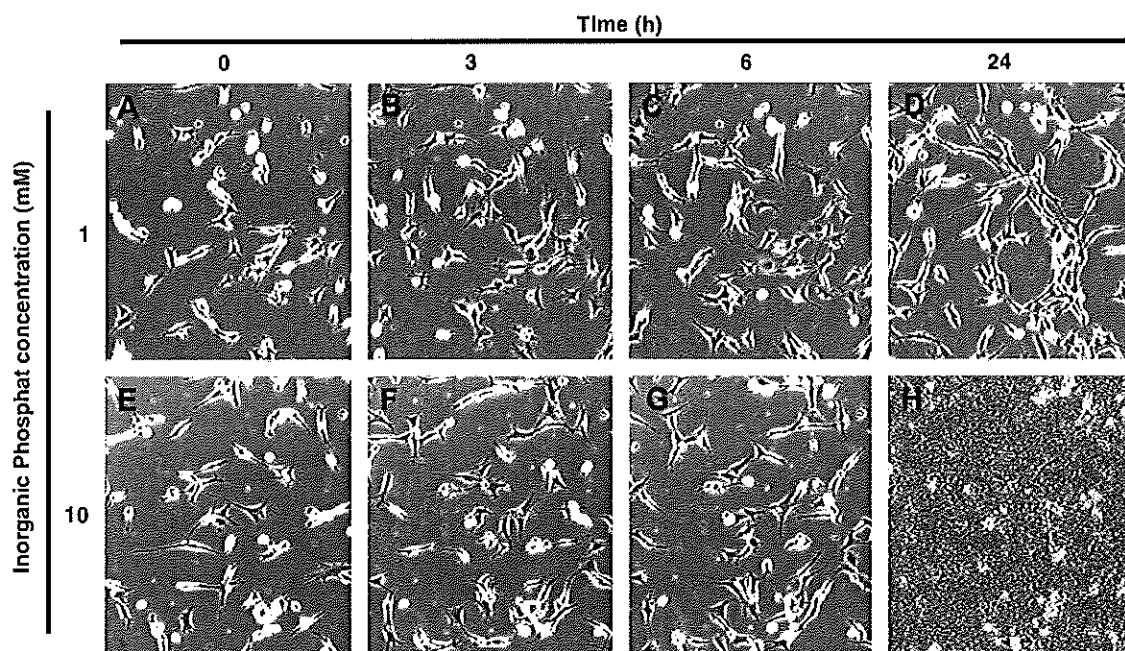


Fig. 2. Microscopy analysis of cultured wells. Pictures (A–H) were taken after a total of 48 h serum starvation including 3, 6 and 24 h of incubation with 10 mM Pi. Cells were visualized at 40 \times magnification using inverted optic microscope.

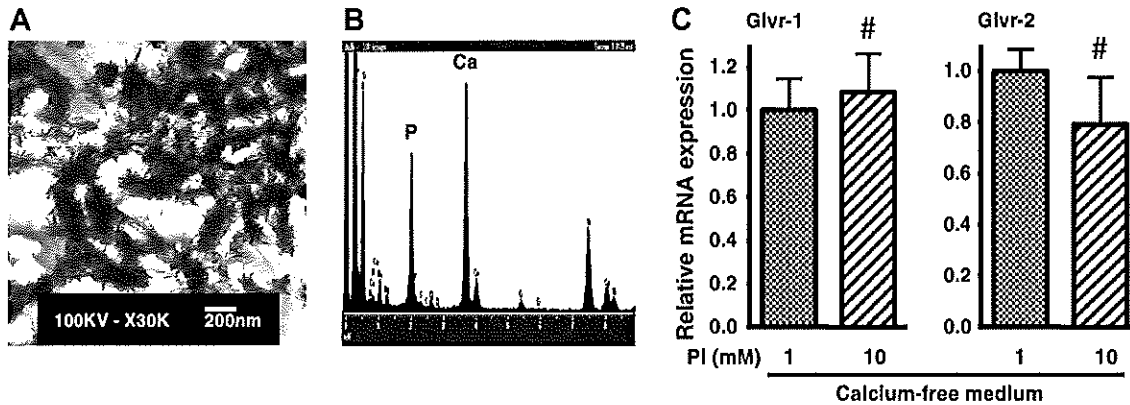


Fig. 3. Analysis of calcium involvement in mediating Pi effects. Transmission electron microscopy picture (A) and energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis (B) of crystal structures formed in cultured wells after 24 h incubation with Pi 10 mM. Real-time RT-PCR analysis of Pi effects on Glvr-1 and -2 mRNA expressions by MO6-G3 in calcium-free medium (panels C and D). Data represent the mean \pm SE analyzed by *t*-test. * $p > 0.05$ versus control (1 mM Pi).

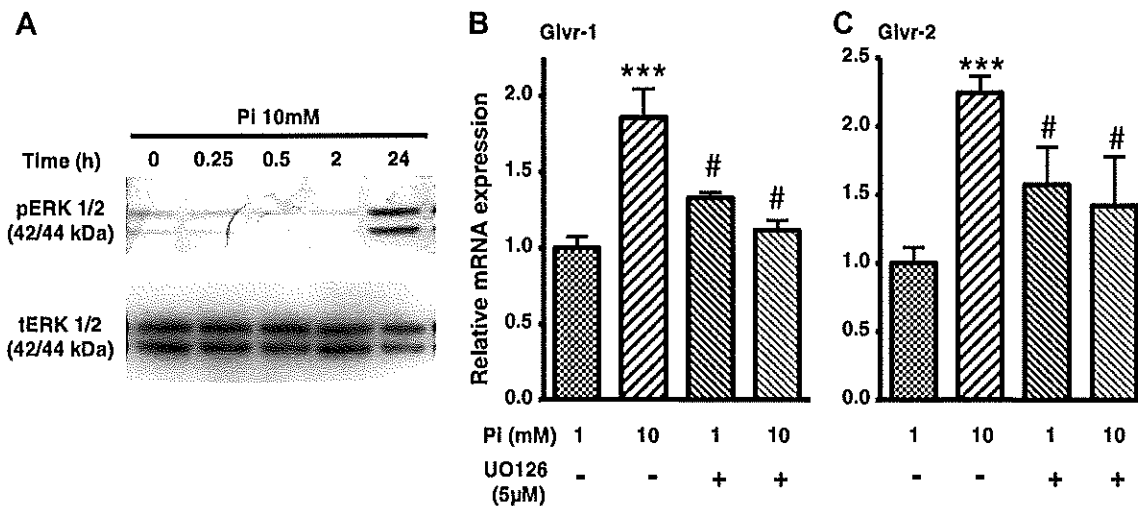


Fig. 4. Involvement of ERK signalling pathways in mediating Pi effects. Western blot analysis of ERK1/2 phosphorylation (pERK1/2, phosphorylated ERK1/2; tERK1/2, total ERK1/2) in presence or absence of 10 mM Pi (A). Real-time RT-PCR analysis of 24 h treatment with 10 mM Pi on Glvr-1 and -2 mRNA expressions in the presence of 5 μ M of UO126 (B and C). Data represent the mean \pm SE analyzed by one-way ANOVA Newman-Keuls' test. *** $p < 0.001$ and # $p > 0.05$ versus control (1 mM Pi).

for the first time, that Glvr-1 and -2, expressed in odontoblast-like cells are up-regulated by an excess of Pi after 24 h of treatment. The increase was dependent on phosphate-calcium crystals formation and ERK1/2 phosphorylation.

In contrast to the type II sodium-dependent phosphate cotransporters, Glvr-1 and Glvr-2 expressions are broadly expressed and their functions remain to be clarified [7]. They are expressed in many tissues including kidney, heart, lung, brain, liver, parathyroid glands, bone and tooth [5,8,13]. In general, type III NPCs serve as Pi transporters within the cells but data from the literature indicate that they may have different functions in cellular activities. Recently, Glvr-1 was described to play a key role in vascular mineralization [12,14–16]. Mineralization process in VSMCs cultures paralleled with type III NPCs expressions whereas type II NPCs were weakly expressed [16]. In bone cells, Nielsen et al. demonstrated that beside the association between the increase of Glvr-1 mRNA levels and mineralization, up-regulation of Glvr-1 expression was correlated with osteoblast differentiation [9]. In addition, in osteoarthritic articular cartilage, altered chondrocyte differentiation and disease progression was linked to Pit-1 expression [17]. In 2006, Zhao et al. investigated the expression of type III sodium-dependent phosphate cotransporters during murine

odontogenesis and observed an increase in Glvr-2 mRNA levels as tooth matures suggesting a possible correlation with dental cells differentiation [18]. In addition, Glvr-2 also functions as a gamma-retrovirus receptor in dental cells and may be of pathological significance [18]. In our hands, Glvr-1 and -2 up-regulation paralleled with crystal formation but in contrast to VSMCs studies, increase in Glvr expression is likely to be a consequence of mineralization and further studies would be necessary to determine any association between the expression of type III NPCs and odontoblast differentiation.

Although type III NPCs are constitutively expressed in many tissues, different factors were described to regulate their gene expression, protein synthesis and activity. These factors include hormones, growth factors and cytokines. In the parathyroid of vitamin D-deficient rats, Glvr-1 mRNA levels were markedly increased after administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 [13]. The same observation was reported in human and rat osteoblasts after a stimulation by insulin-like growth factor [10,19]. In the vascular system, platelet-derived growth factor promote Glvr-1 activity in human and rat aortic smooth muscle cells [12,20]. Beside, TGF-beta stimulated inorganic phosphate transport and selectively increased expression of Glvr-1, but not Glvr-2 in chondrogenic

ATDC5 cells [11] as well as IL-8 and BMP-2 in Human knee osteoarthritic articular cartilage [17] and murine OB-like cells MC3T3 [21], respectively. Recently, inorganic phosphate was suspected to be itself a potential regulator of its transport. Correlation between Pi concentration and type III NPCs expression or activity depends on the cell type studied. For instance, the abundance of Glvr-1 mRNA in the parathyroid is much greater in rats fed a low-Pi diet than in those fed a high-Pi diet [13]. In rat osteoblasts Glvr-1 mRNA was up-regulated following Pi deprivation [19].

In contrast, high concentration of phosphate dose-dependently increased phosphate uptake through an increase activity of Glvr-1 in human aortic smooth muscle cell [16]. Additionally, in the presence of increased Pi concentration, up-regulation of stanniocalcin leads to Glvr-1 accumulation in osteoblasts both in vitro and in vivo [22]. In chondrogenic cell line, expression of Glvr-1 and type II collagen mRNA in differentiated CFK2 cells was higher in presence of 5 mM Pi compared to cells grown in phosphate deprived medium [23]. In MO6-G3 cultures, Glvr-1 and -2 expressions paralleled with crystal formation and calcium deprivation in cultures medium prevented from crystal formation (data not shown) and up-regulation of Glvr-1 and -2. Our data correlate with these from Jono, Yoshiko and Wang, however, taken together, our results suggest that modulation of mRNA level of Glvr-1 and -2 relies on crystal formation more than on high-Pi concentration.

In our study, ERK phosphorylation occurred at 24 h in presence of high phosphate concentration. This observation was correlated with crystal formation. After 30 min of incubation of odontoblasts with Pi, TEM analysis shows globular structure of phosphate and calcium association (data not shown) while no phosphorylation of ERK1/2 was observed. These results suggest that crystal formation more than phosphate itself is required for stimulating ERK phosphorylation and up-regulation of Glvr-1 and -2. Phosphorylation of ERK1/2 in presence of high-Pi concentration is supported by a recent published work from Julien et al. They demonstrated that Pi markedly stimulates MGP expression in ATDC5 cells and primary growth plate chondrocytes through activation of ERK1/2 signalling pathway [24]. In another hand, treatment of MC3T3-E1 osteoblast-like cells with epinephrine at 10 $\mu\text{mol/L}$ time-dependently stimulated Pit-1 mRNA expression. This effect was mediated by activation of protein kinase C and the MAPK(erk) pathways [25] whereas BMP-2 stimulation in the same model increased Glvr-1 expression via JNKinase pathway [21]. In contrast, in the Palmer study, the effect of TGF- β 1 on Pi uptake in ATDC5 cells did not involve protein kinase C or mitogen-activated protein kinases [11].

This study contributes to define the role of Pi on odontoblast activities during carious development. Further investigations would be necessary to assess whether Pi modulates other dental cells functions and whether altered Glvr-1 and -2 expressions lead to tooth defects. As better teeth make better health, growing knowledge of carious development mechanisms should allow deciphering new therapeutic targets in dental pathologies to improve quality life of patients.

Acknowledgments

Authors acknowledge Dr. Mary MacDougall who kindly provided the MO6-G3. This study was supported by the Institut Français de Recherche en Odontologie (IFRO).

References

- [1] A.J. Smith, P.E. Murray, A.J. Sloan, J.B. Matthews, S. Zhao, Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis, *Adv. Dent. Res.* 15 (2001) 51–54.
- [2] M. Larmas, Odontoblast function seen as the response of dentinal tissue to dental caries, *Adv. Dent. Res.* 15 (2001) 68–71.
- [3] H. Murer, I. Forster, J. Biber, The sodium phosphate cotransporter family SLC34, *Pflügers Arch.* 447 (2004) 763–767.
- [4] R.J. Reimer, R.H. Edwards, Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family, *Pflügers Arch.* 447 (2004) 629–635.
- [5] P. Lundquist, Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis, *Swed. Dent. J. Suppl.* (2002) 1–52.
- [6] P. Lundquist, H.H. Ritchie, K. Moore, T. Lundgren, A. Linde, Phosphate and calcium uptake by rat odontoblast-like MRPC-1 cells concomitant with mineralization, *J. Bone Miner. Res.* 17 (2002) 1801–1813.
- [7] J.F. Collins, L. Bai, F.K. Ghishan, The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors, *Pflügers Arch.* 447 (2004) 647–652.
- [8] M.P. Kavanaugh, D. Kabat, Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family, *Kidney Int.* 49 (1996) 959–963.
- [9] L.B. Nielsen, F.S. Pedersen, L. Pedersen, Expression of type III sodium-dependent phosphate transporters/retroviral receptors mRNAs during osteoblast differentiation, *Bone* 28 (2001) 160–166.
- [10] G. Palmer, J.P. Bonjour, J. Caverzasio, Expression of a newly identified phosphate transporter/retrovirus receptor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and its regulation by insulin-like growth factor I, *Endocrinology* 138 (1997) 5202–5209.
- [11] G. Palmer, J. Guicheux, J.P. Bonjour, J. Caverzasio, Transforming growth factor- β stimulates inorganic phosphate transport and expression of the type III phosphate transporter Glvr-1 in chondrogenic ATDC5 cells, *Endocrinology* 141 (2000) 2236–2243.
- [12] C.M. Giachelli, S. Jono, A. Shioi, Y. Nishizawa, K. Mori, H. Morii, Vascular calcification and inorganic phosphate, *Am. J. Kidney Dis.* 38 (2001) S34–S37.
- [13] S. Tatsumi, H. Segawa, K. Morita, H. Haga, T. Rouda, H. Yamamoto, Y. Inoue, T. Nii, K. Katai, Y. Taketani, K.I. Miyamoto, E. Takeda, Molecular cloning and hormonal regulation of Pit-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands, *Endocrinology* 139 (1998) 1692–1699.
- [14] C.M. Giachelli, Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003) S300–S304.
- [15] C.M. Giachelli, M.Y. Speer, X. Li, R.M. Rajachar, H. Yang, Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin, *Circ. Res.* 96 (2005) 717–722.
- [16] S. Jono, M.D. McKee, C.E. Murray, A. Shioi, Y. Nishizawa, K. Mori, H. Morii, C.M. Giachelli, Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification, *Circ. Res.* 87 (2000) E10–E17.
- [17] D.L. Cecil, D.M. Rose, R. Terkeltaub, R. Liu-Bryan, Role of interleukin-8 in Pit-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes, *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 144–154.
- [18] D. Zhao, F. Vaziri Sani, J. Nilsson, M. Rodenburg, C. Stocking, A. Linde, A. Gritli-Linde, Expression of Pit2 sodium-phosphate cotransporter during murine odontogenesis is developmentally regulated, *Eur. J. Oral Sci.* 114 (2006) 517–523.
- [19] E. Zoidis, C. Ghirlanda-Keller, M. Gosteli-Peter, J. Zapf, C. Schmid, Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts, *J. Endocrinol.* 181 (2004) 531–540.
- [20] A. Kakita, A. Suzuki, K. Nishiwaki, Y. Ono, M. Kotake, Y. Ariyoshi, Y. Miura, M. Ltoh, Y. Oiso, Stimulation of Na-dependent phosphate transport by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle cells, *Atherosclerosis* 174 (2004) 17–24.
- [21] A. Suzuki, C. Ghayor, J. Guicheux, D. Magne, S. Quillard, A. Kakita, Y. Ono, Y. Miura, Y. Oiso, M. Itoh, J. Caverzasio, Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells, *J. Bone Miner. Res.* 21 (2006) 674–683.
- [22] Y. Yoshiko, G.A. Candelieri, N. Maeda, J.E. Aubin, Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 4465–4474.
- [23] D. Wang, L. Canaff, D. Davidson, A. Corluja, H. Liu, G.N. Hendy, J.E. Henderson, Alterations in the sensing and transport of phosphate and calcium by differentiating chondrocytes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33995–34005.
- [24] M. Julien, D. Magne, M. Masson, M. Rolli-Derkinderen, O. Chassande, C. Cario-Toumaniantz, Y. Cherel, P. Weiss, J. Guicheux, Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway, *Endocrinology* 148 (2007) 530–537.
- [25] A. Suzuki, G. Palmer, J.P. Bonjour, J. Caverzasio, Stimulation of sodium-dependent inorganic phosphate transport by activation of G β /o-protein-coupled receptors by epinephrine in MC3T3-E1 osteoblast-like cells, *Bone* 28 (2001) 589–594.

2.2 Article 5 : Le phosphate inorganique stimule l'apoptose dans les cellules odontoblastiques

RESUME

Au cours de processus pathologiques tels que la carie, la dent est dégradée et déminéralisée, ce qui conduit à une libération locale de phosphate inorganique (Pi) dans l'environnement des odontoblastes. Dans ce contexte, le but de cette étude est de déterminer quels sont les effets du Pi sur la viabilité, la prolifération et l'apoptose des cellules odontoblastiques et quels mécanismes pourraient être impliqués dans ces effets. Afin de tester la viabilité et la prolifération des cellules, des tests MTS et des comptages cellulaires ont été réalisés sur des cellules de la lignée odontoblastique murine MO6-G3. Par ailleurs, une coloration de Hoechst, ainsi que des analyses par FACS sur les cellules MO6-G3 marquées à l'annexine V et à l'Apo2.7 ont été effectuées afin de déterminer si l'apoptose est impliquée dans la mort cellulaire en réponse au Pi. Enfin, afin de déterminer si la présence de calcium est nécessaire pour que le Pi médie ses effets, les cellules odontoblastiques ont été cultivées dans un milieu dépourvu en calcium et des analyses par FACS sur ces cellules ont été réalisées. Les résultats indiquent dans un premier temps que dans un milieu dépourvu de sérum de veau fœtal, de fortes concentrations de Pi altèrent la viabilité des cellules MO6-G3 et promeuvent la mort cellulaire via un mécanisme apoptotique. Nos résultats montrent que la présence de calcium est nécessaire pour que le Pi médie ses effets. Par ailleurs, la formation de précipités de phosphate de calcium observés en microscopie électronique à transmission suggère que ces précipités seraient à l'origine de l'apoptose des cellules odontoblastiques.

Inorganic Phosphate Stimulates Apoptosis in Odontoblast-like Cells

Journal:	<i>Journal of Dental Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Reports
Date Submitted by the	

Complete List of Authors:	<p>bourgine, annabelle; INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France; PRES UNAM, UFR Odontologie, place Alexis ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France</p> <p>khoshniat, solmaz; INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France; PRES UNAM, UFR Odontologie, place Alexis ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France</p> <p>wauquier, fabien; INRA, UMR1019, Human Nutrition Unit, group "Bone, nutrition and metabolism" - F63122 - Clermont-Ferrand/Theix, France; Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, F-63000</p> <p>oliver, lisa; INSERM UMR892 Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, CRCNA; Université de Nantes, Nantes Cedex 1, France</p> <p>hue, erika; INSERM UMR892 Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, CRCNA; Université de Nantes, Nantes Cedex 1, France</p> <p>Alliot-Licht, Brigitte; University Nantes, biology</p> <p>rouillon, thierry; INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France; PRES UNAM, UFR Odontologie, place Alexis ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France</p> <p>weiss, pierre; INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France; PRES UNAM, UFR Odontologie, place Alexis ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France</p> <p>beck, laurent; INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France; Université Paris - Descartes : site Necker - 156 rue de Vaugirard - 75730 PARIS cedex 15</p> <p>guicheux, jerome; INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France</p> <p>wittrant, yohann; INRA, UMR1019, Human Nutrition Unit, group "Bone, nutrition and metabolism" - F63122 - Clermont-Ferrand/Theix, France; Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, F-63000</p>
Keywords:	Odontoblast(s), Caries, Cell biology, Cell differentiation, Cell signalling
Abstract:	<p>Dental pathologies such as caries are the most prevalent diseases worldwide with infectious and social complications. Caries are the second cause for respiratory infections in North America and can lead to local and systemic complications. During carious development, tooth is degraded and demineralization of enamel and dentin leads to local release of inorganic phosphate (Pi) within dental tubuli. In our study we investigate whether local release of Pi during carious development may influence dental cells activities. As odontoblasts represent the first cellular barrier during carious establishment, efforts were focused on determining the effect of Pi on odontoblast behaviour. Using the MO6-G3 odontoblast-like cells, we demonstrated that Pi alters odontoblast viability and promote apoptosis through a mechanism dependent on calcium/phosphate crystal formation.</p>

Inorganic Phosphate Stimulates Apoptosis in Odontoblast-like Cells.

Short title: Pi induces odontoblast apoptosis.

Bourgine A^{1,2}, Khoshniat S^{1,2}, Wauquier F^{3,4}, Oliver L^{5,6}, Hue E^{5,6}, Alliot-Licht B^{1,2},
Rouillon T^{1,2}, Weiss P^{1,2}, Beck L^{1,7}, Guicheux J^{1,2*}, Wittrant Y^{3,4}

1. INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France
2. pres UNAM, UFR Odontologie, place Alexis ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France
3. INRA, UMR1019, Human Nutrition Unit, group "Bone, nutrition and metabolism" - Clermont-Ferrand/Theix, France
4. Clermont Université, UFR Médecine, UMR 1019 Nutrition Humaine, F-63000, Clermont-Ferrand, France
5. Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes, CRCNA INSERM UMR892
6. Université de Nantes, Nantes Cedex 1, France.
7. Université Paris - Descartes : site Necker - 156 rue de Vaugirard - 75730 PARIS cedex 15

* Corresponding author: Dr. Jerome Guicheux Ph.D

INSERM U791, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France /
jerome.guicheux@inserm.fr / Phone (office): +33-(0)2-40412919; Phone (secretary): +33-(0)2-40412916; Fax: +33-(0)2-40083712

Keywords: tooth, carious disease, odontoblast, inorganic phosphate, apoptosis

Total number of words: 2517

Number of words in abstract: 121

Number of figures: 4

Number of references: 35

ABSTRACT

Dental pathologies such as caries are the most prevalent diseases worldwide with infectious and social complications. Caries are the second cause for respiratory infections in North America and can lead to local and systemic complications. During carious development, tooth is degraded and demineralization of enamel and dentin leads to local release of inorganic phosphate (Pi) within dental tubuli. In our study we investigate whether local release of Pi during carious development may influence dental cells activities. As odontoblasts represent the first cellular barrier during carious establishment, efforts were focused on determining the effect of Pi on odontoblast behaviour. Using the MO6-G3 odontoblast-like cells, we demonstrated that Pi alters odontoblast viability and promote apoptosis through a mechanism dependent on calcium/phosphate crystal formation.

INTRODUCTION

In humans, dental tissues are the only mineralized tissues at the frontier between an organism and its environment. They represent a solid wall to defend a host against pathogen invasion from the oral cavity. Therefore, maintaining tooth integrity by determining the interactions between microenvironment and dental cells behaviour is of major interest.

Tooth structure is altered by dental pathologies such as caries that are the first cause of tooth extraction and the second for respiratory infections that costed over 60 billions dollars in 2006 in the United States (Azarpazhooch and Leake, 2006; Chauncey et al., 1989; Garcia-Godoy and Murray, 2006). When uncured, carious diseases lead to local and systemic complications such as pulpitis, cellulitis and septic (Douglass and Douglass, 2003; Hahn and Liewehr, 2007; Loesche, 1997; Lygidakis et al., 1998). Along with biologic complications, they contribute to social issues. They affect growth, eating, sleeping, life quality, intellectual development and social interaction during childhood (Acs et al., 1999; Anderson et al., 2004; Ayhan et al., 1996; Low et al., 1999; Miller et al., 1982; Ratnayake and Ekanayake, 2005; White et al., 2003). Beside, literature enlightens the limits of current treatments for dental pathologies and the need to better elucidate dental pathologies mechanisms in order to design alternatives cares.

Dentin represents the major part of the tooth. It is composed by 70% of a mineral fraction (hydroxyapatite crystals), 20% of an organic phase (type I collagen) and water for 10%. Dentin is produced all life long and its structure exhibits a high porosity due to alternance of dentin walls and tubuli. These tubuli contain transdentinal fluid and

1
2
3 odontoblast cytoplasmic tail. Indeed, dentin is secreted by specialized cells from
4 ectomesenchymal origin that are located at the pulp-dentin junction: the odontoblasts.
5
6 They are post-mitotic cells, therefore, when they are injured or undergo apoptosis,
7
8 dentin production requires differentiation of pulp precursors towards odontoblast-like
9
10 cells under the influence of microenvironment factors that remain to be determined.
11
12
13 During carious development, tooth is degraded (Smith et al., 2001) and demineralization
14
15 of enamel and dentin leads to local release of inorganic phosphate (Pi) within dental
16
17 tubuli (Larmas, 2001). Then, we wondered if release of inorganic phosphate could
18
19 influence dental cell activities. As odontoblasts represent the first cellular barrier during
20
21 carious establishment, efforts were focused on determining the effect of Pi on
22
23 odontoblast behaviour. Using the MO6-G3 odontoblast-like cells, we investigated the
24
25 effects of Pi on odontoblast viability, proliferation and apoptosis.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and inorganic phosphate treatments

Odontoblast cell line MO6-G3 was kindly obtained from Dr. Mary MacDougall (Department of Oral/Maxillofacial Surgery, University of Alabama at Birmingham). Cells were seeded at the density of 10000 cells/cm² and grown in alpha-MEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Hyclone) at 33°C in a 5% CO₂ atmosphere. At 80% confluence, odontoblasts were serum starved or not, and harvested after a total period of 48 hours including incubation with inorganic phosphate (Pi). Cultures were treated with Pi at the concentration of 1mM (normal control conditions) to 10 mM for increasing periods of time. Separately, to test the involvement of calcium in mediating Pi effects, cells were cultured in calcium free medium (Invitrogen) in the presence of 1mM or 10mM Pi. Influence of Pi on cells was analysed by microscopy, cell viability, proliferation and pro-apoptosis mechanisms assays.

Cell viability and MTS activity

The CellTiter 96® AQUEOUS Assay (Promega) was used to determine Pi influence on cell proliferation and viability. Briefly, it works as a colorimetric assay for measuring the number of viable cells in proliferation. The dye solution, containing the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt (MTS) and the electron coupling reagent, phenazine methosulfate (PMS), is added to the cells and reduced into formazan product by cellular metabolism. The absorbance of the formazan is read at 492nm every 5 minutes at 33°C after incubation in a microplate

1
2
3 reader (VictorII, Perkin Elmer). OD represents dehydrogenase enzyme activity found in
4
5 metabolically active cells.
6
7
8
9

10 **Cell counting**

11
12 To confirm results from MTS assay, cells were cultured in the conditions as described
13 above then harvested for counting. Briefly, after Pi incubation MO6-G3 cells were
14 incubated 2 minutes with pre-warmed (0.5% trypsin / 0.02% EDTA) solution to allow cell
15 detachment and centrifuged. Then, pellets were washed and alive cells counted on a
16 Malassez cell using the Trypan blue exclusion method (Sigma-Aldrich).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 **Hoechst staining**

28
29 To further determine Pi effects on odontoblast viability, treated-cells were incubated with
30 bisbenzimidazole H 33258 / Hoechst 33258 (Sigma) at a final concentration of 1µM for 30
31 minutes in culture media. Then, cells were washed three times in pre-warmed PBS
32 (33 °C), observed using a fluorescent inverted microscope (Excitation maximum = 356
33 nm, Emission maximum = 465 nm) and pictures of nuclei were taken (magnification
34 100X).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 **Flow cytometry**

46
47 The APO2.7 antigen is a protein localized on the membrane of mitochondria whose
48 expression appears as an early event in the apoptosis process. Its expression is
49 restricted to cells undergoing apoptosis and was detected using dedicated kit according
50 to manufacturer's guidelines for in vitro protocol (Beckman Coulter, IM2088U). In
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 parallel, the loss of membrane symmetry in the early phases of apoptosis characterized
4 by the translocation of the membrane phospholipid phosphatidylserine (PS) was
5 analysed using the Annexin V-PE apoptosis detection kit I (BD Biosciences, réf.
6 559763). Staining and flow cytometry were proceeded as recommended by supplier's
7 protocols.
8
9

10 11 12 13 14 15 16 17 **Optic Microscopy**

18
19 Cells were visualized at 40X magnification using inverted optic microscope and pictures
20 were taken at 0, 6, 12, 18 and 24 hours after treatments.
21
22
23
24
25
26

27 **Transmission Electron Microscopy and Energy-dispersive X-ray spectroscopy**

28
29 For Transmission electron microscopy (TEM) studies, samples were filtrated and
30 particles collected were deposited on TEM grids according to the following process. A
31 few drops of sample were filtrated on a polycarbonate filter having pores diameter of 0.2
32 μm and previously covered with a thin layer of evaporated carbon. The filter was then
33 rinsed with a few drops of pre-filtrated ethanol. After drying, the filter with particles was
34 covered with a second layer of evaporated carbon. The filter was then deposited on
35 Nickel grids and polycarbonate was dissolved with chloroform. After drying, TEM
36 observation of grids was performed using a JEOL JEM1010 microscope, operating at
37 accelerated voltage of 100 kV. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)
38 measurements were also performed at 100 kV, using an Oxford Instruments Link ISIS
39 spectrometer, equipped with an ATW2 ultrathin window (energy resolution: 142 eV at
40 5.9 keV).
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Statistical analysis

Results were analyzed either by one-way ANOVA Newman-Keuls' test or t-test using Prism4 software (Graphpad). Data represent the mean +/- S.E. of three separate experiments. Significance was determined as probability (p)<0.05.

RESULTS

Pi alters cell proliferation and viability.

To address whether high Pi concentration may alter cell fate, MTS assays and cell counts were performed. Cells were incubated for 24 hours with increasing Pi concentration in the presence or absence of 10% FCS. Results from MTS analysis, show that when cells were cultured in the presence of serum, viability was not altered by increasing Pi concentration (Figure 1A). In contrast, when cells were incubated with 7.5mM Pi and above in absence of serum (Figure 1B), cell viability was reduced of approximately 50%.

To strengthen MTS experiments, viable cells were counted after Pi treatments using trypan blue staining. Data obtained confirmed MTS analysis. In the presence of 10% FCS and 10mM Pi, viable cell number was slightly decreased (Figure 1C) whereas the addition of 10mM Pi in the absence of serum drastically decreased the number of viable cells (-85%; Figure 1D).

High concentration of inorganic phosphate stimulates pro-apoptosis mechanisms.

To determine whether Pi may alter cell viability by apoptosis or necrosis, treated-cultures were harvested for Annexin V, APO2.7 staining and DNA fragmentation. Cells treated either with 1 or 10mM Pi in the absence of serum were incubated with the fluorescent dye Hoechst 33258 and stained nuclei were observed under UV light using an inverted fluorescent microscope. Pictures reveals that when treated 24 hours with

1
2
3 10mM Pi nuclei of the odontoblast-like cells shows irregular structures with several
4 condensations characterizing apoptosis mechanisms, while nuclei from control cultures
5 (1mM Pi) show homogeneous structure with intact contour (Figure 2A).
6
7

8
9
10 To confirm the stimulation of early apoptosis mechanisms in Pi mediating altered cell
11 viability, Annexin V and APO2.7 staining was assessed by flow cytometry in
12 odontoblasts at 0, 24 and 48 hours after Pi treatment. Results demonstrate that 10mM
13 Pi, in a time dependent manner, dramatically stimulates the percentage of positive cells
14 for these early apoptosis markers, thus suggesting that Pi-induced odontoblast cell
15 death involves pro-apoptosis mechanisms (Figure 2B and 2D). In contrast, the presence
16 of serum in the culture media abolished the Pi effects on AnnexinV and APO2.7 staining
17 (Figure 2C and 2E).
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 31 **High concentration of inorganic phosphate induces chemical and cellular** 32 **changes in cultured wells.** 33

34
35
36 Cells were incubated either with 1 or 10 mM of inorganic phosphate in the presence or
37 absence of 10% foetal calf serum and observed for 24 hours using an inverted
38 microscope. Pictures were taken every 6 hours to visualize any potential effects of Pi on
39 cultured wells (Figure 3). In the presence of serum no particular changes was observed.
40
41 In these conditions Pi did not happen to alter cell fate and both cells incubated with
42 1mM or incubated with 10mM Pi grew normally. In contrast, in the absence of serum,
43 dramatic changes occurred when cells were incubated with 10mM Pi compared to
44 control (1mM). As soon as 12 hours after incubation with 10mM Pi, chemical structures
45 resembling to crystals formed in wells and cultured cells started to shrink. In
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 comparison, neither crystal formation nor cell modification occurred in any other culture
4
5 conditions suggesting that crystal formation in the presence of high Pi concentration
6
7 may alter cell viability in the absence of serum.
8
9

10 11 12 **Calcium is involved in Pi mediating apoptosis.**

13
14 Since start point of crystal formation correlates with Pi-induction of apoptosis
15
16 mechanisms, we questioned the nature of the crystals and the relationship between
17
18 these two events. Crystal structure was analyzed by Transmission Electron Microscopy
19
20 and Energy-dispersive X-ray spectroscopy. Data demonstrated that crystals are made
21
22 of phosphate and calcium (Figure 4A and 4B) suggesting that crystal formation may be
23
24 important in mediating Pi effects. Then, to confirm the involvement of crystal formation
25
26 in odontoblast apoptosis, cells were cultured in calcium free medium. Results
27
28 demonstrate that in absence of calcium Pi failed to enhance APO2.7 staining
29
30 suggesting that calcium/phosphate association is required to mediate Pi effects on cell
31
32 viability (Figure 4C).
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

DISCUSSION

During carious establishment, Pi is locally released in dental cells environment. In this study, we investigated the potent biological influence of Pi on the first cellular barrier exposed to increased Pi concentration: the odontoblasts. Using the odontoblast-like MO6-G3 cell line, we contributed to decipher the effect of Pi on odontoblast behaviour. Our results demonstrate that incubation with high concentration of Pi decreases odontoblast viability and promote apoptosis as indicated by heterogeneous nuclear condensation and increased positive staining for early apoptosis markers. Combined data from microscopy and spectroscopy revealed that decrease odontoblast viability may rely on calcium/phosphate crystal formation. In addition, abolition of Pi-induced APO2.7 staining in absence of calcium confirmed that calcium might be necessary for mediating Pi effects on odontoblast apoptosis.

The last decade has witnessed an increasing interest in deciphering the biological roles of Pi in mineralized tissues. Recently, Pi has been reported to regulate osteoblast differentiation and activities during mineralization process (Beck, 2003). For instance, Pi stimulates mineralization in osteoblast-like cell cultures via an increase in phosphate transporter expression (Suzuki et al., 2006) such as type II sodium/phosphate cotransporter (Lundquist et al., 2007). In parallel, Pi modulates expression of key transcription factors for osteoblast differentiation such as Nrf2 that may be important for late stages of osteoblast differentiation (Beck et al., 2003). More recently, a combined proteome and microarray investigation from Conrads et al. showed that Fra-1 was also

1
2
3 regulated at the mRNA and protein level (Conrads et al., 2005). Based on the
4 relationships between odontoblast and osteoblast activities, these data from the
5 literature strongly support our results in term of Pi biological influence.
6
7

8
9
10 Beside, Pi was found to activate signaling pathways both in osteoblasts (Julien et al.,
11 2009) and chondrocytes as demonstrated by regulation of either osteopontin expression
12 in osteoblast (Beck and Knecht, 2003) or MGP expression in growth plate chondrocytes
13 via ERK1/2 and PKC, and ERK1/2 phosphorylation (Julien et al., 2007), respectively.
14
15
16
17
18
19
20

21
22 Biological roles of Pi are under extensive investigations in bone and cartilage, however,
23 the influence of Pi in tooth remains unclear. According to Meleti's work, Pi induces
24 apoptosis in osteoblast-like cultures in a time and dose dependent manner (Meleti et al.,
25 2000). Our data suggest that Pi induced odontoblast apoptosis relies on
26 calcium/phosphate crystals formation as demonstrated by results obtained when cells
27 were cultured in calcium free medium or in the presence of 10% serum (crystal
28 formation inhibitor). In 2001, Adams' group showed that calcium is involved in Pi-
29 induced caspase-3 activity in osteoblasts (Adams et al., 2001). In addition, Magne et al.
30 from our lab, previously demonstrated that in the presence of calcium, Pi induces
31 chondrocytes maturation and apoptosis-associated mineralization as confirmed by DNA
32 fragmentation and characteristic morphological changes (Magne et al., 2003).
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 We recently demonstrated that Pi induces ERK1/2 phosphorylation in MO6-G3
49 odontoblast-like (Wittrant et al., 2009). As ERK1/2 signalling pathway is involved in
50 apoptosis mechanisms (Dong et al., 2004; Ramachandiran et al., 2002; Tikoo et al.,
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 2001), one may speculate that Pi-induced ERK1/2 phosphorylation may account for the
4
5 stimulation of pro-apoptotic mechanisms in dental cells.
6
7

8 Apoptosis is a key phenomenon in the regulation of the life span of odontoblasts, which
9
10 are responsible for dentin matrix production of the teeth. Recently, Mitsiadis et al
11
12 demonstrated that apoptosis is a part of the mechanism that regulate human dental pulp
13
14 chamber remodelling during tooth development and pathology (Mitsiadis et al., 2007).
15

16
17 When tooth is challenged by a moderate lesion, odontoblasts produce tertiary dentin in
18
19 response to aggression or biological stress by promoting the differentiation of pulp
20
21 precursor cells (Tecles et al., 2005). Also, cavity preparation and capping agents may
22
23 actively induce apoptosis of pulp cells during pulp wound healing (Kitamura et al., 2001;
24
25 Kitamura et al., 2003). Whether these waves of apoptosis may help healing is not
26
27 known.
28
29
30

31
32
33 In this study we demonstrated that Pi induces odontoblasts apoptosis possibly via
34
35 calcium/phosphate crystal formation giving new insight in the role of Pi on dental cell
36
37 behaviour during pathological events. Whether Pi-induced odontoblast apoptosis may
38
39 lead to dental pulp stem cells differentiation towards newly-formed odontoblast would
40
41 need further consideration.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Cells were incubated with 1 to 10 mM of inorganic phosphate in the presence or absence of 10% foetal calf serum for 24 hours. Cell viability (A, B). MTS activity was determined by measuring optical density at 492nm every 5 minutes at 33°C in a microplate reader (VictorII, Perkin Elmer). Results were analyzed by one-way ANOVA Newman-Keuls' test. (*) : $p < 0.05$ versus control (Pi 1mM). Cell counting (C, D). After treatment, cultures were digested using 0.5% trypsin / 0.02% EDTA solution and live cell number was determined per cm² by Trypan blue exclusion. Results were analyzed by t-test. (*) : $p < 0.05$ and (***) : $p < 0.001$ versus control (Pi 1mM).

Figure 2

Hoechst staining (A). Odontoblast nuclei were stained after Pi treatments (24 hours) in serum-free conditions with Hoechst dye at a final concentration of 1µg/ml. Cells were observed using inverted fluorescent microscope. Flow cytometry (B-E). Annexin V and APO2.7 staining in odontoblast cultures was investigated after incubation either with 1 or 10 mM of inorganic phosphate in the presence or absence of 10% foetal calf serum at 0, 24 and 48 hours. Results were analyzed by one-way ANOVA Newman-Keuls' test. (*) : $p < 0.05$; (**) : $p < 0.01$ and (***) : $p < 0.001$ versus control (Pi 1mM).

Figure 3

Optic Microscopy. Cells were treated either with 1 or 10 mM of inorganic phosphate in the presence or absence of 10% foetal calf serum and observed every 6 hours for 24 hours using an inverted microscope (magnification 40X). Data presented are the most representative from three separate experiments

Figure 4

Determination of crystal structure and composition by Transmission Electron Microscopy (A) and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (B), respectively. Flow cytometry (C). APO2.7 staining in odontoblast cultures was investigated after incubation either with 1 or 10 mM of inorganic phosphate in the absence of serum and calcium at 0, 24 and 48 hours.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors acknowledge Dr Mary MacDougall who kindly provided the MO6-G3 cell line.

This study was supported by IFRO.

REFERENCES

1
2
3
4
5
6
7
8 Acs G, Shulman R, Ng MW, Chussid S (1999). The effect of dental rehabilitation on the
9 body weight of children with early childhood caries. *Pediatr Dent* 21(2):109-13.

10
11 Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM (2001). Matrix regulation of skeletal cell
12 apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276(23):20316-22.

13
14
15 Anderson HK, Drummond BK, Thomson WM (2004). Changes in aspects of children's
16 oral-health-related quality of life following dental treatment under general anaesthesia.
17 *Int J Paediatr Dent* 14(5):317-25.

18
19
20 Ayhan H, Suskan E, Yildirim S (1996). The effect of nursing or rampant caries on
21 height, body weight and head circumference. *J Clin Pediatr Dent* 20(3):209-12.

22
23
24 Azarpazhooh A, Leake JL (2006). Systematic review of the association between
25 respiratory diseases and oral health. *J Periodontol* 77(9):1465-82.

26
27 Beck GR, Jr. (2003). Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast
28 differentiation. *J Cell Biochem* 90(2):234-43.

29
30
31 Beck GR, Jr., Knecht N (2003). Osteopontin regulation by inorganic phosphate is
32 ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent. *J Biol Chem* 278(43):41921-9.

33
34
35 Beck GR, Jr., Moran E, Knecht N (2003). Inorganic phosphate regulates multiple genes
36 during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res* 288(2):288-300.

37
38
39 Chauncey HH, Glass RL, Alman JE (1989). Dental caries. Principal cause of tooth
40 extraction in a sample of US male adults. *Caries Res* 23(3):200-5.

41
42
43
44
45 Conrads KA, Yi M, Simpson KA, Lucas DA, Camalier CE, Yu LR, et al. (2005). A
46 combined proteome and microarray investigation of inorganic phosphate-induced pre-
47 osteoblast cells. *Mol Cell Proteomics* 4(9):1284-96.

48
49
50
51 Dong J, Ramachandiran S, Tikoo K, Jia Z, Lau SS, Monks TJ (2004). EGFR-
52 independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are
53 required for ROS-induced renal cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(5):F1049-
54 58.

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

1
2
3 Garcia-Godoy F, Murray PE (2006). Status and potential commercial impact of stem
4 cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. *Stem Cells Dev*
5 15(6):881-7.
6

7
8 Hahn CL, Liewehr FR (2007). Relationships between caries bacteria, host responses,
9 and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod* 33(3):213-9.
10

11
12 Julien M, Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz
13 C, et al. (2007). Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes
14 through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology*
15 148(2):530-7.
16

17
18 Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A, Gadius M, Bozec A, Wagner EF, et al. (2009).
19 Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *J*
20 *Bone Miner Res* 24(11):1856-68.
21

22
23 Kitamura C, Kimura K, Nakayama T, Toyoshima K, Terashita M (2001). Primary and
24 secondary induction of apoptosis in odontoblasts after cavity preparation of rat molars. *J*
25 *Dent Res* 80(6):1530-4.
26

27
28 Kitamura C, Ogawa Y, Morotomi T, Terashita M (2003). Differential induction of
29 apoptosis by capping agents during pulp wound healing. *J Endod* 29(1):41-3.
30

31
32 Larmas M (2001). Odontoblast function seen as the response of dentinal tissue to
33 dental caries. *Adv Dent Res* 15(68-71).
34

35
36 Loesche WJ (1997). Association of the oral flora with important medical diseases. *Curr*
37 *Opin Periodontol* 4(21-8).
38

39
40 Low W, Tan S, Schwartz S (1999). The effect of severe caries on the quality of life in
41 young children. *Pediatr Dent* 21(6):325-6.
42

43
44 Lundquist P, Murer H, Biber J (2007). Type II Na⁺-Pi cotransporters in osteoblast
45 mineral formation: regulation by inorganic phosphate. *Cell Physiol Biochem* 19(1-4):43-
46 56.
47

48
49 Lygidakis NA, Marinou D, Katsaris N (1998). Analysis of dental emergencies presenting
50 to a community paediatric dentistry centre. *Int J Paediatr Dent* 8(3):181-90.
51

52
53 Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, et al.
54 (2003). Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and
55 apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation
56 of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 18(8):1430-42.
57

58
59 Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS (2000). Inorganic phosphate induces apoptosis of
60 osteoblast-like cells in culture. *Bone* 27(3):359-66.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Miller J, Vaughan-Williams E, Furlong R, Harrison L (1982). Dental caries and children's weights. *J Epidemiol Community Health* 36(1):49-52.

Mitsiadis TA, De Bari C, About I (2007). Apoptosis in developmental and repair-related human tooth remodeling: A view from the inside. *Exp Cell Res*.

Ramachandiran S, Huang Q, Dong J, Lau SS, Monks TJ (2002). Mitogen-activated protein kinases contribute to reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubule epithelial cells. *Chem Res Toxicol* 15(12):1635-42.

Ratnayake N, Ekanayake L (2005). Prevalence and impact of oral pain in 8-year-old children in Sri Lanka. *Int J Paediatr Dent* 15(2):105-12.

Smith AJ, Murray PE, Sloan AJ, Matthews JB, Zhao S (2001). Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis. *Adv Dent Res* 15(5):1-4.

Suzuki A, Ghayor C, Guicheux J, Magne D, Quillard S, Kakita A, et al. (2006). Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 21(5):674-83.

Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. (2005). Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 50(2):103-108.

Tikoo K, Lau SS, Monks TJ (2001). Histone H3 phosphorylation is coupled to poly-(ADP-ribosylation) during reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *Mol Pharmacol* 60(2):394-402.

White H, Lee JY, Vann WF, Jr. (2003). Parental evaluation of quality of life measures following pediatric dental treatment using general anesthesia. *Anesth Prog* 50(3):105-10.

Wittrant Y, Bourguine A, Khoshniat S, Alliot-Licht B, Masson M, Gatius M, et al. (2009). Inorganic phosphate regulates Givr-1 and -2 expression: role of calcium and ERK1/2. *Biochem Biophys Res Commun* 381(2):259-63.

Figure 1

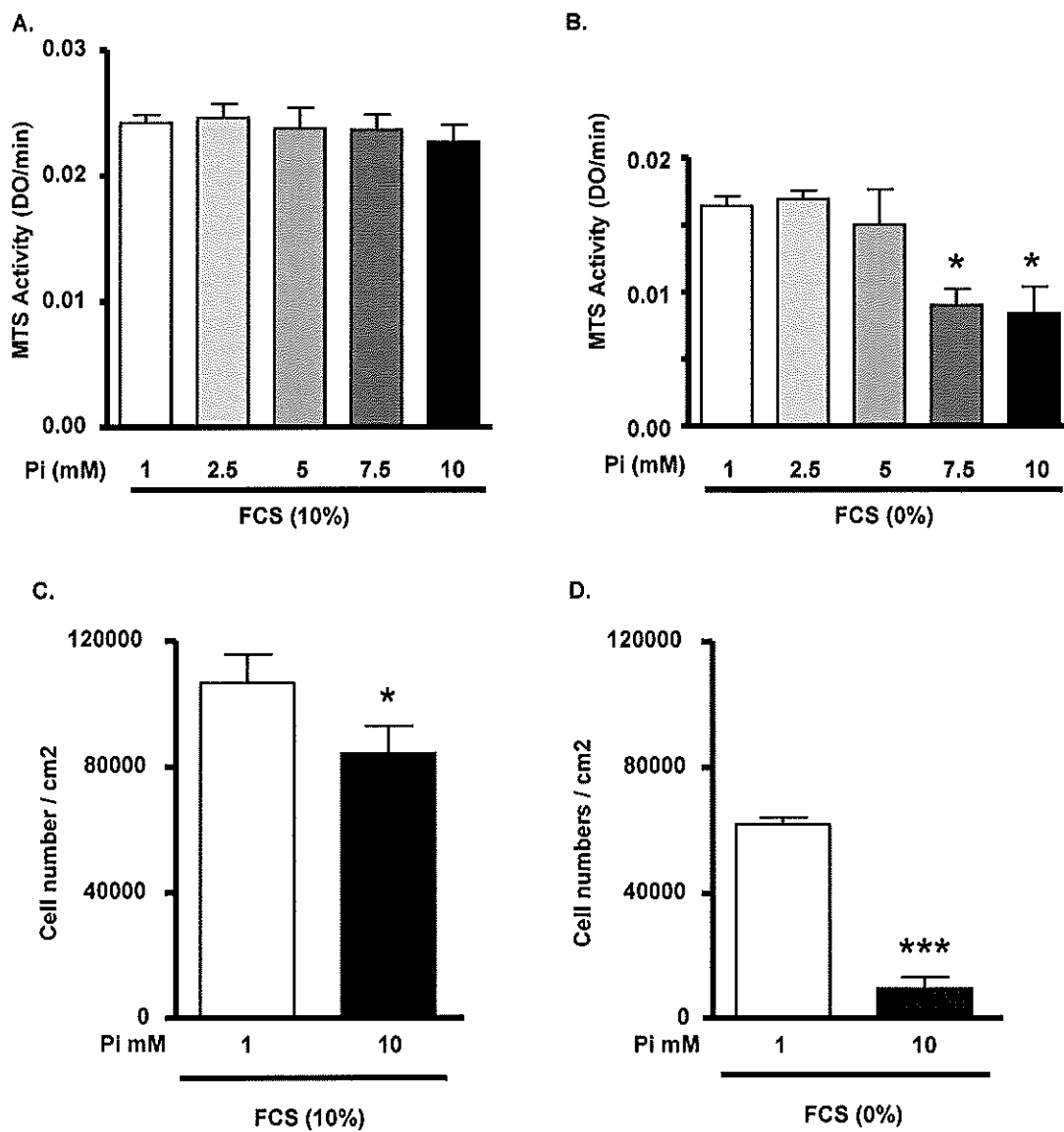
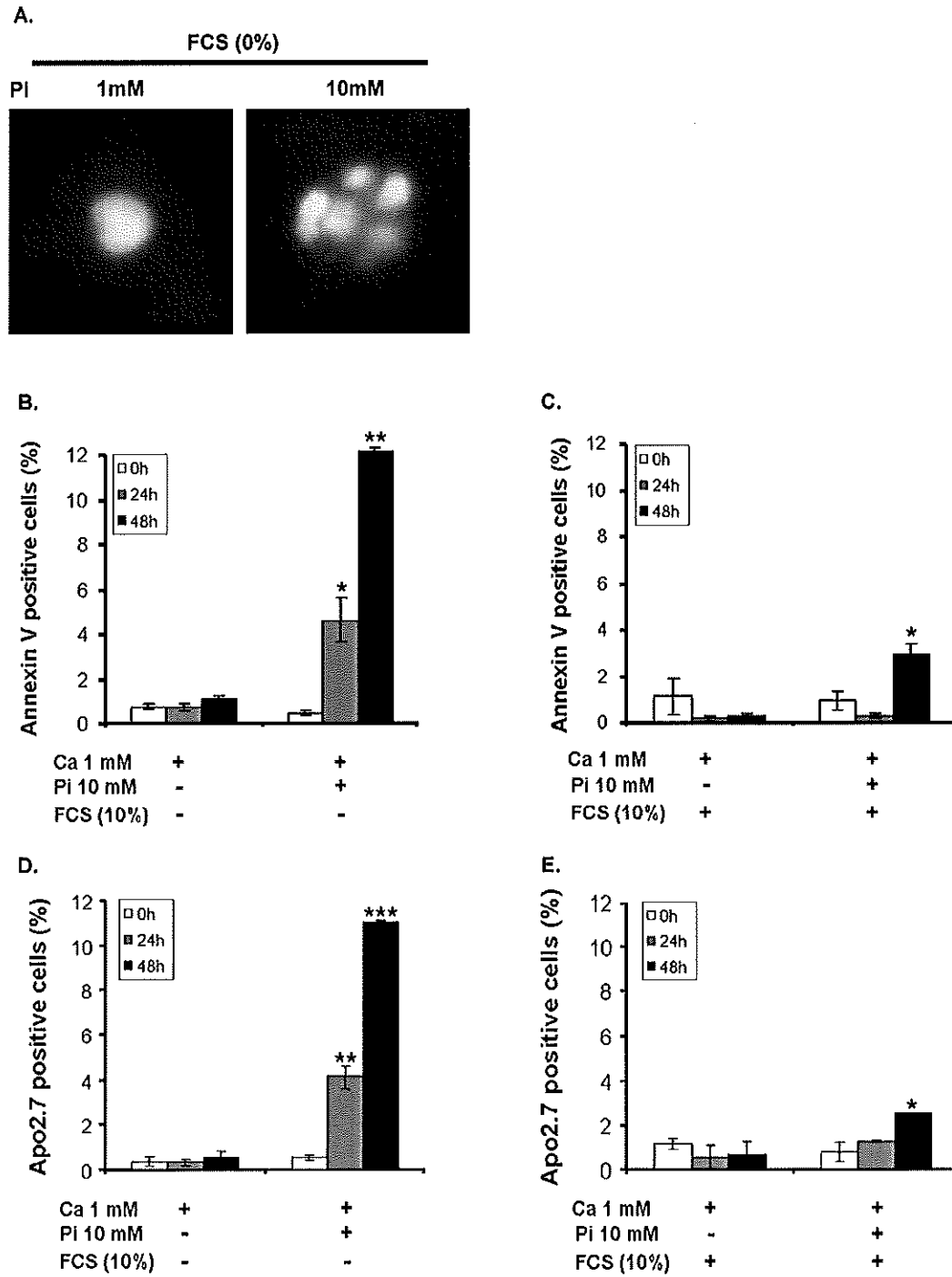


Figure 2



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3

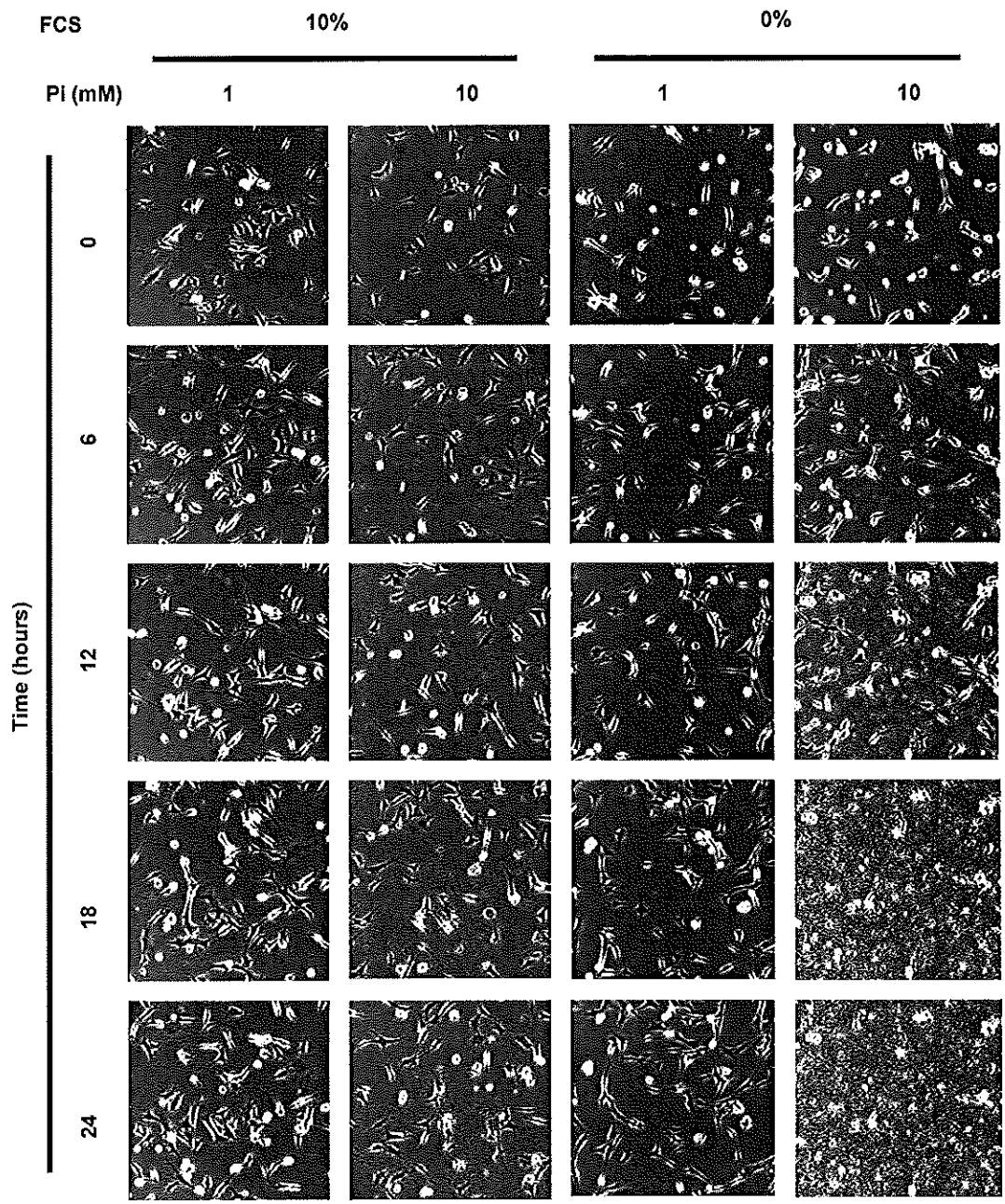
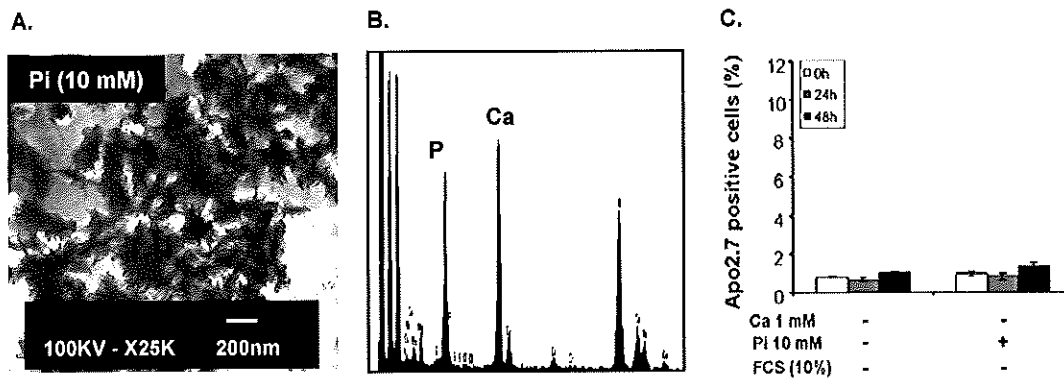


Figure 4



II. DISCUSSION

Les affections dentaires telles que les caries font partie des pathologies à forte prévalence, pouvant entraîner des complications locales au niveau bucco-dentaire ou des complications systémiques incluant des infections respiratoires ou des endocardites (601 , 602). Au cours du processus carieux, une dissolution des cristaux d'apatite est observée, conduisant à la libération de fortes concentrations de Pi et de calcium dans le milieu environnant.

Bien que le Pi soit décrit comme une molécule de signalisation importante impliquée dans la différenciation, la minéralisation et l'apoptose des cellules squelettiques (article 1) (35, 136, 220 , 518), peu d'études se sont penchées sur les effets du Pi dans les cellules de la dent. Il a été montré dans les cémentoblastes que le Pi est primordial pour la formation de minéral *in vitro* et que le Pi extracellulaire régule l'expression de nombreux gènes (539). Par ailleurs, Lundquist *et al.*, ont également montré la nécessité de l'entrée du Pi via des transporteurs de phosphate sodium dépendants pour la minéralisation de cellules d'une lignée odontoblastique de rat, les MRPC-1 (540). Différents types de cotransporteurs de phosphate sodium dépendants ont été décrits à la surface des cellules odontoblastiques, les cotransporteurs de type III, PiT-1 et PiT-2, ainsi que les cotransporteurs de type II, Npt2a et Npt2b (540 , 599). Malgré l'ensemble de ces données indiquant clairement un rôle important du phosphate dans le contrôle de la différenciation des cellules de la dent, et en particulier des cellules odontoblastiques, les mécanismes moléculaires à l'origine des effets du phosphate ne sont pas clairement définis.

Dans ce contexte, nous avons cherché à définir si le phosphate pouvait réguler l'expression de ses transporteurs PiT-1 et PiT-2 dans une lignée odontoblastique murine, les MO6-G3, les odontoblastes représentant *in vivo* la première barrière cellulaire au cours de l'établissement d'une carie. Nous avons également déterminé les possibles mécanismes mis en jeu au cours de cette régulation (article 4). Nous avons par ailleurs cherché à déterminer le rôle de fortes concentrations de Pi, pouvant être libérées au cours de conditions physiopathologiques, sur la viabilité, la prolifération et l'apoptose des cellules odontoblastiques (article 5).

Malgré le grand nombre de lignées odontoblastiques disponibles, aucune n'est parvenue à aboutir au phénotype terminal de l'odontoblaste, qui *in vivo* est une cellule polarisée présentant un prolongement cytoplasmique. Nous avons réalisé notre étude sur la lignée odontoblastique murine MO6-G3, qui a été développée et nous a été gracieusement fournie par Mary MacDougall (48). Cette lignée représente un bon modèle d'odontoblastes car les

cellules expriment les marqueurs spécifiques tels que la dentine sialophosphoprotéine (DSPP) ou la dentin matrix protein (DMP-1) et l'expression spatio-temporelle de leurs gènes est consistante avec la différenciation odontoblastique observée *in vivo*. Par ailleurs, cette lignée est également capable de synthétiser la matrice extracellulaire de la dentine et de la minéraliser (48). Nous n'avons pas utilisé d'odontoblastes primaires au cours de ces études en raison du nombre limité d'odontoblastes dans la dent et du statut post-mitotique de cette cellule, ainsi que de la complexité à isoler ces cellules du fait de leurs prolongements cytoplasmiques enchâssés dans la dentine (48). Cependant, afin de contourner ces problèmes, certains auteurs ont différencié des cellules pulpaire de rat en cellules odontoblastiques, bien que ces dernières ne soient pas des odontoblastes primaires *stricto sensu* (603).

Les résultats que nous avons obtenus montrent que le Pi stimule l'expression de PiT-1 et de PiT-2 dans les cellules odontoblastiques. Récemment, le rôle du Pi en tant que modulateur de son propre transport a été mis en évidence dans différents types cellulaires. Selon les cellules, il peut être un régulateur positif ou négatif de l'expression ou de l'activité de ses transporteurs. Ainsi, il a été montré dans une lignée ostéoblastique qu'une privation en Pi conduisait à une stimulation de l'expression et de l'activité de PiT-1 (404). Des données contradictoires existent quant à l'effet du Pi sur la régulation de PiT-1. Ainsi, d'autres études ont montré que le traitement des ostéoblastes par du Pi (2,5 à 6 mM) conduisait à une stimulation de l'expression de la stanniocalcine et une accumulation de PiT-1 *in vitro* et *in vivo* (280). De plus, dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux, l'activité des transporteurs de phosphate de type III est augmentée de manière dose-dépendante en présence de phosphate (604). D'autres études menées sur des cellules ostéoblastiques et chondrocytaires montrent que l'expression de PiT-1 est augmentée face à une augmentation de la concentration de phosphate (547). Au niveau des cémentoblastes, il a également été montré que l'expression de PiT-1 était augmentée en réponse à une forte concentration de Pi (539). La majorité des résultats indique une régulation positive de l'expression des transporteurs de Pi en réponse à une augmentation de phosphate extracellulaire. Cette réponse cellulaire peut être mise en oeuvre afin de réduire la quantité de phosphate extracellulaire et ainsi protéger la cellule de grandes concentrations de Pi qui peuvent entraîner l'apoptose, comme cela a été montré dans différents types cellulaires et comme il sera discuté plus loin (404, 518).

De plus, la plupart des études se sont intéressées à PiT-1 ou n'ont pas mis en évidence de régulation au niveau de l'expression de PiT-2 (404). Des études menées *in vitro* sur des bourgeons de dents ont montré que l'expression de PiT-2 n'est pas régulée par un traitement à

la vitamine D ou à la PTH ou par une déplétion en Pi (599). Cela pourrait provenir d'une différence quant à l'importance du rôle de PiT-1 et PiT-2 en fonction des cellules. L'utilisation de la technique d'ARN interférence pourrait nous permettre de discriminer l'implication de PiT-1 et de PiT-2 dans les effets cellulaires.

Notre étude a montré que l'expression de PiT-1 et PiT-2 est stimulée par le Pi via la phosphorylation de ERK1/2. Nos données confirment que le Pi agit en tant que molécule de signalisation dans les cellules odontoblastiques, comme ceci a été montré dans différents types cellulaires tels que les ostéoblastes (220), les chondrocytes de la plaque de croissance (292) ou les cémentoblastes (539). Cependant, il a également été montré que selon le type cellulaire et l'agoniste utilisé, la régulation de l'expression de PiT-1 pouvait impliquer d'autres voies de signalisation. Ainsi, dans des ostéoblastes MC3T3-E1, la stimulation des cellules par l'épinéphrine conduit à une augmentation de l'expression de PiT-1 via les voies PKC et ERK1/2 (403) tandis qu'une stimulation à la BMP-2 implique la voie JNK et p38 (403). En revanche, dans les ATDC5, un traitement au TGF- β 1 conduit à la stimulation de l'activité de PiT-1 mais ni les PKC, ni les MAPK ne sont impliquées (402). Dans notre étude sur les odontoblastes, seule la voie ERK1/2 a été examinée. Il serait donc intéressant de déterminer l'implication des autres voies de signalisation dans la réponse au Pi dans les cellules odontoblastiques.

Nos résultats ont également montré que le Pi entraîne la mort par apoptose des cellules odontoblastiques (article 5). L'apoptose des cellules odontoblastiques est un phénomène physiologique observé au cours du développement de la dent. Cependant, au cours de processus carieux, il a été mis en évidence qu'au niveau des zones déminéralisées de la dentine, les odontoblastes subissaient une apoptose (605). Cette apoptose pourrait être causée par l'augmentation de la concentration de Pi dans l'environnement des odontoblastes, d'autant que d'autres études ont déjà mis en évidence l'effet apoptotique du Pi dans différents types cellulaires telles que des cellules chondrocytaires (35) ou des ostéoblastes (518). Le rôle des transporteurs de phosphate PiT-1 et PiT-2, dont l'expression est augmentée en réponse au Pi, dans ces effets apoptotiques reste à être déterminé. Une hypothèse serait que le Pi, par l'augmentation de l'expression de PiT-1 et PiT-2, augmenterait son entrée au sein des odontoblastes et stimulerait l'apoptose des cellules. Cependant, pour argumenter cette hypothèse, il faudrait d'une part mesurer l'activité des transporteurs de Pi et d'autre part inhiber l'activité ou l'expression des transporteurs par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques tels que le PFA, dont la spécificité peut être discutée (520), ou par des approches d'ARN interférence.

L'hypothèse selon laquelle face à une forte concentration de Pi, l'entrée de Pi dans les odontoblastes est augmentée afin de réduire la formation de précipités de phosphate de calcium et ainsi éviter la mort cellulaire peut également être émise. Cependant, l'impact de la mort apoptotique des odontoblastes au cours de processus pathologiques tels que les caries et conduisant à la libération de grandes concentrations de Pi sur la capacité de guérison n'est pas connue et nécessite d'être examinée.

Enfin, des études menées sur la croissance dentaire des souris hypomorphes pour PiT-1 ou PiT-2 décrites au chapitre précédent, qui présentent une quantité d'ARNm de PiT-1 ou PiT-2 réduite (collaboration Laurent Beck, INSERM U845, Paris), pourraient ouvrir de nouvelles perspectives quant à l'importance et aux rôles de ces transporteurs dans le développement dentaire *in vivo*.

Conclusions et perspectives

Une connaissance approfondie des mécanismes impliqués dans l'homéostasie phosphocalcique est indispensable afin d'appréhender au mieux les pathologies osseuses, dentaires et extraosseuses résultant d'une dérégulation de cette homéostasie et conduisant à des défauts ou à des excès de minéralisation. La minéralisation de la matrice extracellulaire est un processus physiologique dans les os, les dents et au niveau du cartilage de la plaque de croissance lors de la croissance squelettique. Une minéralisation de la matrice extracellulaire de tout autre tissu de l'organisme est en revanche pathologique. Il semblerait cependant que les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de minéralisation physiologique et pathologique soient semblables, bien qu'à ce jour, ces mécanismes ne soient pas complètement élucidés. Toutefois, le rôle des protéines de la matrice extracellulaire, telle que la protéine gla matricielle (MGP), dans les processus de calcification a fait l'objet de nombreuses études. De plus, l'implication des ions Pi, en plus des ions calcium, dans la minéralisation des tissus squelettiques ou des tissus normalement non calcifiés est aujourd'hui bien établie. Parallèlement, de nombreuses équipes ont également mis en évidence le rôle des ions Pi dans la différenciation des cellules squelettiques. Ces données suggèrent l'intervention de nombreux facteurs dans la régulation des processus cellulaires et moléculaires de la minéralisation.

Dans cette thèse, nous avons dans un premier chapitre souligné l'importance du maintien de l'homéostasie du phosphate, ainsi que le rôle de cet élément en tant que signal extracellulaire dans la différenciation des cellules squelettiques, en plus de son rôle dans la minéralisation physiologique ou pathologique et de son implication dans la formation du minéral osseux. Nous avons également discuté l'implication des ions calcium, ainsi que des cristaux de phosphate de calcium, dans les effets cellulaires et moléculaires du Pi.

Dans un second chapitre, nous avons étudié les effets du Pi, du calcium et des précipités de phosphate de calcium dans la différenciation des cellules ostéoblastiques, qui sont présents dans un environnement riche en Pi et en calcium. Plus particulièrement, nous avons montré que le Pi stimule l'expression de la MGP et de l'OPN via la phosphorylation de ERK1/2. Nous avons également mis en évidence l'implication d'un facteur de transcription de la famille AP-1, Fra-1, dans la régulation de l'expression de la MGP par le Pi. Les objectifs futurs sont multiples. Il s'agira d'une part de déterminer le rôle physiologique de la MGP dans la différenciation et la minéralisation des ostéoblastes. D'autre part, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la MGP et de l'OPN par le Pi ou les précipités de

phosphate de calcium restent à être déchiffrés, avec plus particulièrement l'étude de l'implication de récepteurs de cristaux tels l'Annexin V ou les récepteurs Toll-like, ainsi que l'implication de transporteurs de phosphate dépendant du sodium de type III, PiT-1 et PiT-2. Des études *in vitro* et *in vivo* sont actuellement en cours avec l'utilisation d'une approche ARN interférence et de souris hypomorphes pour PiT-1. De plus, des souris invalidées de manière tissu-spécifique pour PiT-1 et/ou PiT-2 sont également envisagées afin d'étudier spécifiquement le rôle de ces transporteurs dans le tissu osseux et cartilagineux.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous nous sommes intéressés aux effets du Pi dans des cellules odontoblastiques, ces dernières étant susceptibles de se retrouver dans un environnement riche en phosphate au cours de processus pathologiques tels que lors du développement de caries. Nous avons montré que le Pi stimule l'expression des transporteurs PiT-1 et PiT-2 via la voie ERK1/2 dans les odontoblastes et qu'il est impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire de ces cellules. L'implication des ions calcium, ainsi que des précipités de phosphate de calcium a été suggérée dans ces processus. La suite de ces travaux consistera à déterminer l'implication des transporteurs de phosphate dépendant du sodium dans les effets du Pi sur l'apoptose des odontoblastes. L'utilisation d'inhibiteur de ces transporteurs ou des approches d'ARN interférence nous permettront d'évaluer l'implication de PiT-1 et PiT-2. Les souris hypomorphes pour PiT-1 et/ou PiT-2 nous aideront également à mieux cerner le rôle de ces transporteurs dans la croissance dentaire *in vivo*.

L'ensemble des résultats de cette thèse a permis de souligner le rôle majeur du Pi dans la différenciation des cellules squelettiques et d'ouvrir de nouvelles perspectives quant à l'implication de précipités de phosphate de calcium dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la minéralisation. Un approfondissement de ces connaissances contribuera à proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques aussi bien pour les malformations osseuses et dentaires que lors des calcifications au niveau vasculaire, ainsi que pour les pathologies microcristallines touchant les articulations et impliquant des cristaux de phosphate de calcium.

Bibliographie

1. **Frost HM** 1969 Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3:211-237
2. **Bodine PV, Komm BS** 2002 Tissue culture models for studies of hormone and vitamin action in bone cells. *Vitam Horm* 64:101-151
3. **Hinoi E, Gao N, Jung DY, Yadav V, Yoshizawa T, Kajimura D, Myers MG, Jr., Chua SC, Jr., Wang Q, Kim JK, Kaestner KH, Karsenty G** 2009 An Osteoblast-dependent mechanism contributes to the leptin regulation of insulin secretion. *Ann N Y Acad Sci* 1173 Suppl 1:E20-30
4. **Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G** 2007 Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130:456-469
5. **Weiner S, Traub W, Wagner HD** 1999 Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol* 126:241-255
6. **Seeman E, Delmas PD** 2006 Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354:2250-2261
7. **Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG** 2001 Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192
8. **Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G** 1997 *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754
9. **Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T** 1997 Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764
10. **Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B** 2002 The novel zinc finger-containing transcription factor *osterix* is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108:17-29
11. **Matsuo K** 2009 Cross-talk among bone cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18:292-297
12. **Boskey AL, Roy R** 2008 Cell culture systems for studies of bone and tooth mineralization. *Chem Rev* 108:4716-4733
13. **Rodan GA** 1992 Introduction to bone biology. *Bone* 13 Suppl 1:S3-6
14. **Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW** 2004 The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1-8
15. **Manolagas SC** 2000 Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21:115-137
16. **Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D** 2001 Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res* 16:975-984
17. **Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW** 1998 Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 13:1760-1767
18. **Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS** 2008 The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 61:577-587
19. **van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Lowik CW** 2004 Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 199:805-814

20. **Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J** 2005 Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *Faseb J* 19:1842-1844
21. **Bonewald LF, Johnson ML** 2008 Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42:606-615
22. **Mulari M, Vaaraniemi J, Vaananen HK** 2003 Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc Res Tech* 61:496-503
23. **Bruzzaniti A, Baron R** 2006 Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord* 7:123-139
24. **Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L** 2006 Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11:E47-51
25. **Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Hohling HJ** 2005 Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol* 242:121-156
26. **Glimcher MJ** 1987 The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instr Course Lect* 36:49-69
27. **Baker BM, Gee AO, Sheth NP, Huffman GR, Sennett BJ, Schaer TP, Mauck RL** 2009 Meniscus tissue engineering on the nanoscale: from basic principles to clinical application. *J Knee Surg* 22:45-59
28. **Almarza AJ, Athanasiou KA** 2004 Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Ann Biomed Eng* 32:2-17
29. **Sterodimas A, de Faria J, Correa WE, Pitanguy I** 2009 Tissue engineering and auricular reconstruction: a review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 62:447-452
30. **Clouet J, Grimandi G, Pot-Vaucel M, Masson M, Fellah HB, Guigand L, Cherel Y, Bord E, Rannou F, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C** 2009 Identification of phenotypic discriminating markers for intervertebral disc cells and articular chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 48:1447-1450
31. **Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noel D** 2009 Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotechnol* 27:307-314
32. **Magne D, Vinatier C, Julien M, Weiss P, Guicheux J** 2005 Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med* 11:519-526
33. **Kronenberg HM** 2003 Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423:332-336
34. **Naski MC, Ornitz DM** 1998 FGF signaling in skeletal development. *Front Biosci* 3:d781-794
35. **Magne D, Bluteau G, Faucheux C, Palmer G, Vignes-Colombeix C, Pilet P, Rouillon T, Caverzasio J, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J** 2003 Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J Bone Miner Res* 18:1430-1442
36. **Mansfield K, Rajpurohit R, Shapiro IM** 1999 Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes. *J Cell Physiol* 179:276-286
37. **Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, Dave A, Szumilo M, Solecki M, Klepacz R, Dudka J** 2009 Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* 47:5-16
38. **Kronenberg HM** 2006 PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci* 1068:1-13

39. **Rajpurohit R, Mansfield K, Ohyama K, Ewert D, Shapiro IM** 1999 Chondrocyte death is linked to development of a mitochondrial membrane permeability transition in the growth plate. *J Cell Physiol* 179:287-296
40. **Schipani E, Ryan HE, Didrickson S, Kobayashi T, Knight M, Johnson RS** 2001 Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 15:2865-2876
41. **Hatori M, Klatte KJ, Teixeira CC, Shapiro IM** 1995 End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res* 10:1960-1968
42. **Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P** 1995 Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 159:265-358
43. **Roach HI** 1997 New aspects of endochondral ossification in the chick: chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. *J Bone Miner Res* 12:795-805
44. **Roach HI, Erenpreisa J** 1996 The phenotypic switch from chondrocytes to bone-forming cells involves asymmetric cell division and apoptosis. *Connect Tissue Res* 35:85-91
45. **Bleicher F, Couble ML, Buchaille R, Farges JC, Magloire H** 2001 New genes involved in odontoblast differentiation. *Adv Dent Res* 15:30-33
46. **Gillam DG** 1995 Mechanisms of stimulus transmission across dentin--a review. *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 43:53-65
47. **Smith AJ, Lesot H** 2001 Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 12:425-437
48. **MacDougall M, Unterbrink A, Carnes D, Rani S, Luan X, Chen S** 2001 Utilization of MO6-G3 immortalized odontoblast cells in studies regarding dentinogenesis. *Adv Dent Res* 15:25-29
49. **Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT** 2002 The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81:392-394
50. **Nakajima Y, Shimokawa H, Terai K, Onoue H, Seino Y, Tanaka H, Sobue S, Kitamura Y, Nomura S** 1996 Identification of the cell type origin of odontoma-like cell masses in microphthalmic (mi/mi) mice by in situ hybridization. *Pathol Int* 46:743-750
51. **Arana-Chavez VE, Massa LF** 2004 Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1367-1373
52. **Baldassarri M, Margolis HC, Beniash E** 2008 Compositional determinants of mechanical properties of enamel. *J Dent Res* 87:645-649
53. **Margolis HC, Beniash E, Fowler CE** 2006 Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res* 85:775-793
54. **Bartlett JD, Gauss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, Wen X, White SN, Zhou YL** 2006 3. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol* 74:57-115
55. **Bei M** 2009 Molecular genetics of ameloblast cell lineage. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B:437-444
56. **Foster BL, Popowics TE, Fong HK, Somerman MJ** 2007 Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr Top Dev Biol* 78:47-126

57. **Bosshardt D, Schroeder HE** 1990 Evidence for rapid multipolar and slow unipolar production of human cellular and acellular cementum matrix with intrinsic fibers. *J Clin Periodontol* 17:663-668
58. **Bosshardt DD, Schroeder HE** 1992 Initial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing human teeth. A light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res* 267:321-335
59. **Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D** 2008 Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci* 50:367-376
60. **Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, Nakamura K** 2004 Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *J Orthop Sci* 9:410-414
61. **Sandell LJ, Adler P** 1999 Developmental patterns of cartilage. *Front Biosci* 4:D731-742
62. **Komori T** 2002 Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem* 87:1-8
63. **Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ** 1997 Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771
64. **Yoshida CA, Komori T** 2005 Role of Runx proteins in chondrogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 15:243-254
65. **Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K, Komori T** 2002 Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* 32:633-638
66. **Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC** 2000 Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20:8783-8792
67. **Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T** 2001 Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol* 155:157-166
68. **Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T** 2001 Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* 153:87-100
69. **Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T, Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T** 1999 Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev Dyn* 214:279-290
70. **de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K** 2001 Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol* 13:721-727
71. **Nakahara T, Sato H, Shimizu T, Tanaka T, Matsui H, Kawai-Kowase K, Sato M, Iso T, Arai M, Kurabayashi M** Fibroblast growth factor-2 induces osteogenic differentiation through a Runx2 activation in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394:243-248
72. **Nakano-Kurimoto R, Ikeda K, Uraoka M, Nakagawa Y, Yutaka K, Koide M, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, Matsubara H** 2009 Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1673-1684

73. Miyazaki T, Kanatani N, Rokutanda S, Yoshida C, Toyosawa S, Nakamura R, Takada S, Komori T 2008 Inhibition of the terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice. *Arch Histol Cytol* 71:131-146
74. Chen S, Gluhak-Heinrich J, Wang YH, Wu YM, Chuang HH, Chen L, Yuan GH, Dong J, Gay I, MacDougall M 2009 Runx2, osx, and dspp in tooth development. *J Dent Res* 88:904-909
75. Baron R, Rawadi G 2007 Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* 148:2635-2643
76. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA 2005 Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3324-3329
77. Bodine PV 2008 Wnt signaling control of bone cell apoptosis. *Cell Res* 18:248-253
78. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML 2001 LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107:513-523
79. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP 2002 High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 346:1513-1521
80. ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Lowik CW, van Bezooijen RL 2008 Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1:31-35
81. Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S 2007 A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9:1273-1285
82. Almeida M, Han L, Bellido T, Manolagas SC, Kousteni S 2005 Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT. *J Biol Chem* 280:41342-41351
83. Tamura M, Nemoto E, Sato MM, Nakashima A, Shimauchi H Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. *Front Biosci (Elite Ed)* 2:1405-1413
84. Angel P, Karin M 1991 The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-157
85. Eferl R, Wagner EF 2003 AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859-868
86. Eriksson M, Taskinen M, Leppa S 2007 Mitogen activated protein kinase-dependent activation of c-Jun and c-Fos is required for neuronal differentiation but not for growth and stress response in PC12 cells. *J Cell Physiol* 210:538-548

87. **Wagner EF, Nebreda AR** 2009 Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9:537-549
88. **Basbous J, Jariel-Encontre I, Gomard T, Bossis G, Piechaczyk M** 2008 Ubiquitin-independent- versus ubiquitin-dependent proteasomal degradation of the c-Fos and Fra-1 transcription factors: is there a unique answer? *Biochimie* 90:296-305
89. **McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, Lian JB, Stein GS** 1996 Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology* 137:4398-4408
90. **Karsenty G, Wagner EF** 2002 Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2:389-406
91. **Jochum W, David JP, Elliott C, Wutz A, Plenk H, Jr., Matsuo K, Wagner EF** 2000 Increased bone formation and osteosclerosis in mice overexpressing the transcription factor Fra-1. *Nat Med* 6:980-984
92. **Sabatagos G, Sims NA, Chen J, Aoki K, Kelz MB, Amling M, Bouali Y, Mukhopadhyay K, Ford K, Nestler EJ, Baron R** 2000 Overexpression of DeltaFosB transcription factor(s) increases bone formation and inhibits adipogenesis. *Nat Med* 6:985-990
93. **Eferl R, Hoebertz A, Schilling AF, Rath M, Karreth F, Kenner L, Amling M, Wagner EF** 2004 The Fos-related antigen Fra-1 is an activator of bone matrix formation. *Embo J* 23:2789-2799
94. **Kenner L, Hoebertz A, Beil T, Keon N, Karreth F, Eferl R, Scheuch H, Szremska A, Amling M, Schorpp-Kistner M, Angel P, Wagner EF** 2004 Mice lacking JunB are osteopenic due to cell-autonomous osteoblast and osteoclast defects. *J Cell Biol* 164:613-623
95. **Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V** 1992 Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 71:577-586
96. **Matsuo K, Owens JM, Tonko M, Elliott C, Chambers TJ, Wagner EF** 2000 Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat Genet* 24:184-187
97. **David JP, Sabapathy K, Hoffmann O, Idarraga MH, Wagner EF** 2002 JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Cell Sci* 115:4317-4325
98. **Ruther U, Garber C, Komitowski D, Muller R, Wagner EF** 1987 Deregulated c-fos expression interferes with normal bone development in transgenic mice. *Nature* 325:412-416
99. **Wang ZQ, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Wagner EF** 1991 A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *Embo J* 10:2437-2450
100. **Thomas DP, Sunters A, Gentry A, Grigoriadis AE** 2000 Inhibition of chondrocyte differentiation in vitro by constitutive and inducible overexpression of the c-fos proto-oncogene. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):439-450
101. **Behrens A, Haigh J, Mehta-Grigoriou F, Nagy A, Yaniv M, Wagner EF** 2003 Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun. *Development* 130:103-109
102. **Depew MJ, Liu JK, Long JE, Presley R, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JL** 1999 Dlx5 regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Development* 126:3831-3846
103. **Holleville N, Quilhac A, Bontoux M, Monsoro-Burq AH** 2003 BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development. *Dev Biol* 257:177-189

104. **Lee MH, Kim YJ, Yoon WJ, Kim JI, Kim BG, Hwang YS, Wozney JM, Chi XZ, Bae SC, Choi KY, Cho JY, Choi JY, Ryoo HM** 2005 Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J Biol Chem* 280:35579-35587
105. **Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, Cho JY, Ryoo HM** 2004 Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *J Biol Chem* 279:50773-50780
106. **Bei M, Maas R** 1998 FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 125:4325-4333
107. **Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R** 2000 Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 24:391-395
108. **Han J, Ishii M, Bringas P, Jr., Maas RL, Maxson RE, Jr., Chai Y** 2007 Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mech Dev* 124:729-745
109. **Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, Zhu D, Sangiorgi F, Snead ML, Maxson RE** 1999 Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 205:260-274
110. **Ishii M, Merrill AE, Chan YS, Gitelman I, Rice DP, Sucov HM, Maxson RE, Jr.** 2003 Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development* 130:6131-6142
111. **Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, Yatani H, Cao X, Komori T, Yamaguchi A, Yoneda T** 2004 Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279:34015-34022
112. **Hu G, Vastardis H, Bendall AJ, Wang Z, Logan M, Zhang H, Nelson C, Stein S, Greenfield N, Seidman CE, Seidman JG, Abate-Shen C** 1998 Haploinsufficiency of MSX1: a mechanism for selective tooth agenesis. *Mol Cell Biol* 18:6044-6051
113. **Blin-Wakkach C, Lezot F, Ghouli-Mazgar S, Hotton D, Monteiro S, Teillaud C, Pibouin L, Orestes-Cardoso S, Papagerakis P, Macdougall M, Robert B, Berdal A** 2001 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* 98:7336-7341
114. **Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR** 2007 Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 6:391-403
115. **Schlessinger J** 2000 Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-225
116. **Schlessinger J** 2002 Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110:669-672
117. **Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH** 2001 Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183
118. **Schaeffer HJ, Weber MJ** 1999 Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19:2435-2444
119. **Johnson GL, Lapadat R** 2002 Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298:1911-1912

120. **Bogoyevitch MA, Court NW** 2004 Counting on mitogen-activated protein kinases--ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* 16:1345-1354
121. **Ip YT, Davis RJ** 1998 Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10:205-219
122. **Roux PP, Blenis J** 2004 ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320-344
123. **Bobick BE, Kulyk WM** 2008 Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth Defects Res C Embryo Today* 84:131-154
124. **Murakami S, Balmes G, McKinney S, Zhang Z, Givol D, de Crombrughe B** 2004 Constitutive activation of MEK1 in chondrocytes causes Stat1-independent achondroplasia-like dwarfism and rescues the Fgfr3-deficient mouse phenotype. *Genes Dev* 18:290-305
125. **Provot S, Nachtrab G, Paruch J, Chen AP, Silva A, Kronenberg HM** 2008 A-raf and B-raf are dispensable for normal endochondral bone development, and parathyroid hormone-related peptide suppresses extracellular signal-regulated kinase activation in hypertrophic chondrocytes. *Mol Cell Biol* 28:344-357
126. **Zhang R, Murakami S, Coustry F, Wang Y, de Crombrughe B** 2006 Constitutive activation of MKK6 in chondrocytes of transgenic mice inhibits proliferation and delays endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:365-370
127. **Agoston H, Khan S, James CG, Gillespie JR, Serra R, Stanton LA, Beier F** 2007 C-type natriuretic peptide regulates endochondral bone growth through p38 MAP kinase-dependent and -independent pathways. *BMC Dev Biol* 7:18
128. **Zhen X, Wei L, Wu Q, Zhang Y, Chen Q** 2001 Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone. *J Biol Chem* 276:4879-4885
129. **Schindeler A, Little DG** 2006 Ras-MAPK signaling in osteogenic differentiation: friend or foe? *J Bone Miner Res* 21:1331-1338
130. **Ge C, Xiao G, Jiang D, Franceschi RT** 2007 Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *J Cell Biol* 176:709-718
131. **Ge C, Xiao G, Jiang D, Yang Q, Hatch NE, Franceschi RT** 2009 Identification and functional characterization of extracellular-regulated kinase/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. *J Biol Chem*
132. **Balint E, Lapointe D, Drissi H, van der Meijden C, Young DW, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB** 2003 Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 89:401-426
133. **Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Oiso Y, Bonjour JP, Caverzasio J** 2002 Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone* 30:91-98
134. **Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J** 2003 Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* 18:2060-2068
135. **Suzuki A, Ghayor C, Guicheux J, Magne D, Quillard S, Kakita A, Ono Y, Miura Y, Oiso Y, Itoh M, Caverzasio J** 2006 Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 21:674-683

136. **Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G** 2005 Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 19:1093-1104
137. **Boskey AL, Young MF, Kilts T, Verdelis K** 2005 Variation in mineral properties in normal and mutant bones and teeth. *Cells Tissues Organs* 181:144-153
138. **Loong CK, Rey C, Kuhn LT, Combes C, Wu Y, Chen S, Glimcher MJ** 2000 Evidence of hydroxyl-ion deficiency in bone apatites: an inelastic neutron-scattering study. *Bone* 26:599-602
139. **Rey C, Miquel JL, Facchini L, Legrand AP, Glimcher MJ** 1995 Hydroxyl groups in bone mineral. *Bone* 16:583-586
140. **Barrere F, van Blitterswijk CA, de Groot K** 2006 Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* 1:317-332
141. **Wachtel E, Weiner S** 1994 Small-angle x-ray scattering study of dispersed crystals from bone and tendon. *J Bone Miner Res* 9:1651-1655
142. **Landis WJ** 1996 Mineral characterization in calcifying tissues: atomic, molecular and macromolecular perspectives. *Connect Tissue Res* 34:239-246
143. **Bocciarelli DS** 1970 Morphology of crystallites in bone. *Calcif Tissue Res* 5:261-269
144. **Posner AS** 1969 Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol Rev* 49:760-792
145. **Dorozhkin SV, Epple M** 2002 Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 41:3130-3146
146. **Bonar LC, Shimizu M, Roberts JE, Griffin RG, Glimcher MJ** 1991 Structural and composition studies on the mineral of newly formed dental enamel: a chemical, x-ray diffraction, and 31P and proton nuclear magnetic resonance study. *J Bone Miner Res* 6:1167-1176
147. **Ishikawa K, Eanes ED, Tung MS** 1994 The effect of supersaturation on apatite crystal formation in aqueous solutions at physiologic pH and temperature. *J Dent Res* 73:1462-1469
148. **Eanes ED, Hailer AW** 1985 Liposome-mediated calcium phosphate formation in metastable solutions. *Calcif Tissue Int* 37:390-394
149. **Eanes ED, Hailer AW** 1987 Calcium phosphate precipitation in aqueous suspensions of phosphatidylserine-containing anionic liposomes. *Calcif Tissue Int* 40:43-48
150. **Blumenthal NC, Betts F, Posner AS** 1981 Formation and structure of Ca-deficient hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int* 33:111-117
151. **Bodier-Houille P, Steuer P, Voegel JC, Cuisinier FJ** 1998 First experimental evidence for human dentine crystal formation involving conversion of octacalcium phosphate to hydroxyapatite. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54:1377-1381
152. **Crane NJ, Popescu V, Morris MD, Steenhuis P, Ignelzi MA, Jr.** 2006 Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone* 39:434-442
153. **Kuhn LT, Wu Y, Rey C, Gerstenfeld LC, Grynpas MD, Ackerman JL, Kim HM, Glimcher MJ** 2000 Structure, composition, and maturation of newly deposited calcium-phosphate crystals in chicken osteoblast cell cultures. *J Bone Miner Res* 15:1301-1309
154. **Wu Y, Ackerman JL, Strawich ES, Rey C, Kim HM, Glimcher MJ** 2003 Phosphate ions in bone: identification of a calcium-organic phosphate complex by 31P solid-state NMR spectroscopy at early stages of mineralization. *Calcif Tissue Int* 72:610-626
155. **Velleman SG** 2000 The role of the extracellular matrix in skeletal development. *Poult Sci* 79:985-989

156. **Martin E, Shapiro JR** 2007 Osteogenesis imperfecta:epidemiology and pathophysiology. *Curr Osteoporos Rep* 5:91-97
157. **Garofalo S, Metsaranta M, Ellard J, Smith C, Horton W, Vuorio E, de Crombrughe B** 1993 Assembly of cartilage collagen fibrils is disrupted by overexpression of normal type II collagen in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3825-3829
158. **Boskey AL, Maresca M, Armstrong AL, Ehrlich MG** 1992 Treatment of proteoglycan aggregates with physal enzymes reduces their ability to inhibit hydroxyapatite proliferation in a gelatin gel. *J Orthop Res* 10:313-319
159. **Mwale F, Billingham C, Wu W, Alini M, Webber C, Reiner A, Ionescu M, Poole J, Poole AR** 2000 Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. *Dev Dyn* 218:648-662
160. **Kwan KM, Pang MK, Zhou S, Cowan SK, Kong RY, Pfordte T, Olsen BR, Sillence DO, Tam PP, Cheah KS** 1997 Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J Cell Biol* 136:459-471
161. **Shen G** 2005 The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod Craniofac Res* 8:11-17
162. **Wilson R, Freddi S, Chan D, Cheah KS, Bateman JF** 2005 Misfolding of collagen X chains harboring Schmid metaphyseal chondrodysplasia mutations results in aberrant disulfide bond formation, intracellular retention, and activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 280:15544-15552
163. **Glimcher MJ** 1989 Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat Rec* 224:139-153
164. **Anderson HC** 1995 Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res*:266-280
165. **Boskey AL** 1998 Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:83-91
166. **Anderson HC, Reynolds JJ** 1973 Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Dev Biol* 34:211-227
167. **Anderson HC** 1969 Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 41:59-72
168. **Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM** 2000 Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 289:265-270
169. **Anderson HC** 1976 Matrix vesicle calcification. *Fed Proc* 35:104
170. **Wuthier RE** 1989 Mechanism of de novo mineral formation by matrix vesicles. *Connect Tissue Res* 22:27-33; discussion 53-61
171. **Kardos TB, Hubbard MJ** 1982 Are matrix vesicles apoptotic bodies? *Prog Clin Biol Res* 101:45-60
172. **Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL** 2000 Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 87:1055-1062
173. **Ali SY** 1985 Apatite-type crystal deposition in arthritic cartilage. *Scan Electron Microsc*:1555-1566
174. **Di Mauro S, Manes T, Hesse L, Kozlenkov A, Pizauro JM, Hoylaerts MF, Millan JL** 2002 Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates. *J Bone Miner Res* 17:1383-1391

175. **Hsu HH, Camacho NP** 1999 Isolation of calcifiable vesicles from human atherosclerotic aortas. *Atherosclerosis* 143:353-362
176. **Tanimura A, McGregor DH, Anderson HC** 1983 Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med* 172:173-177
177. **Anderson HC, Garimella R, Tague SE** 2005 The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci* 10:822-837
178. **Morris DC, Moylan PE, Anderson HC** 1992 Immunochemical and immunocytochemical identification of matrix vesicle proteins. *Bone Miner* 17:209-213
179. **Bernard GW** 1972 Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J Ultrastruct Res* 41:1-17
180. **Peress NS, Anderson HC, Sajdera SW** 1974 The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calcif Tissue Res* 14:275-281
181. **Ali SY, Sajdera SW, Anderson HC** 1970 Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67:1513-1520
182. **Nakano Y, Addison WN, Kaartinen MT** 2007 ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* 41:549-561
183. **Zhang L, Balcerzak M, Radisson J, Thouverey C, Pikula S, Azzar G, Buchet R** 2005 Phosphodiesterase activity of alkaline phosphatase in ATP-initiated Ca(2+) and phosphate deposition in isolated chicken matrix vesicles. *J Biol Chem* 280:37289-37296
184. **Montessuit C, Caverzasio J, Bonjour JP** 1991 Characterization of a Pi transport system in cartilage matrix vesicles. Potential role in the calcification process. *J Biol Chem* 266:17791-17797
185. **Montessuit C, Bonjour JP, Caverzasio J** 1995 Expression and regulation of Na-dependent P(i) transport in matrix vesicles produced by osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 10:625-631
186. **Guicheux J, Palmer G, Shukunami C, Hiraki Y, Bonjour JP, Caverzasio J** 2000 A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone* 27:69-74
187. **Wu LN, Guo Y, Genge BR, Ishikawa Y, Wuthier RE** 2002 Transport of inorganic phosphate in primary cultures of chondrocytes isolated from the tibial growth plate of normal adolescent chickens. *J Cell Biochem* 86:475-489
188. **Kirsch T, Ishikawa Y, Mwale F, Wuthier RE** 1994 Roles of the nucleational core complex and collagens (types II and X) in calcification of growth plate cartilage matrix vesicles. *J Biol Chem* 269:20103-20109
189. **Boskey AL** 1992 Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop Relat Res*:244-274
190. **Anderson HC, Stechschulte DJ, Jr., Hsu HH, Morris DC** 1992 Comparison of normal and rachitic rat matrix vesicles. *Bone Miner* 17:119-122
191. **Wuthier RE** 1975 Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochim Biophys Acta* 409:128-143
192. **Wu LN, Genge BR, Kang MW, Arsenault AL, Wuthier RE** 2002 Changes in phospholipid extractability and composition accompany mineralization of chicken growth plate cartilage matrix vesicles. *J Biol Chem* 277:5126-5133
193. **D'Angelo M, Billings PC, Pacifici M, Leboy PS, Kirsch T** 2001 Authentic matrix vesicles contain active metalloproteases (MMP). a role for matrix vesicle-associated MMP-13 in activation of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 276:11347-11353

194. **Dean DD, Schwartz Z, Muniz OE, Gomez R, Swain LD, Howell DS, Boyan BD** 1992 Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 50:342-349
195. **Wu LN, Genge BR, Lloyd GC, Wuthier RE** 1991 Collagen-binding proteins in collagenase-released matrix vesicles from cartilage. Interaction between matrix vesicle proteins and different types of collagen. *J Biol Chem* 266:1195-1203
196. **Adams CS, Horton WE, Jr.** 1998 Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. *Anat Rec* 250:418-425
197. **Kirsch T, Swoboda B, Nah H** 2000 Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 8:294-302
198. **Stehbens WE** 2000 The significance of programmed cell death or apoptosis and matrix vesicles in atherogenesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46:99-110
199. **Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, Seegmiller JE, Terkeltaub R, Lotz M** 1998 Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3094-3099
200. **Stratmann U, Schaarschmidt K, Wiesmann HP, Plate U, Hohling HJ, Szuwart T** 1997 The mineralization of mantle dentine and of circumpulpal dentine in the rat: an ultrastructural and element-analytical study. *Anat Embryol (Berl)* 195:289-297
201. **Takano Y, Sakai H, Baba O, Terashima T** 2000 Differential involvement of matrix vesicles during the initial and appositional mineralization processes in bone, dentin, and cementum. *Bone* 26:333-339
202. **Kirsch T, Wang W, Pfander D** 2003 Functional differences between growth plate apoptotic bodies and matrix vesicles. *J Bone Miner Res* 18:1872-1881
203. **Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM** 1997 Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272:26159-26165
204. **Huitema LF, Vaandrager AB** 2007 What triggers cell-mediated mineralization? *Front Biosci* 12:2631-2645
205. **Nancollas GH, Zawacki SJ** 1989 Calcium phosphate mineralization. *Connect Tissue Res* 21:239-244; discussion 245-236
206. **Qin C, Brunn JC, Cook RG, Orkiszewski RS, Malone JP, Veis A, Butler WT** 2003 Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1. Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *J Biol Chem* 278:34700-34708
207. **D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M** 1997 Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12:2040-2049
208. **Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, D'Souza RN, Kozak CA, MacDougall M** 1998 Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dsp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem* 273:9457-9464
209. **Dahl T, Veis A** 2003 Electrostatic interactions lead to the formation of asymmetric collagen-phosphoryn aggregates. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:206-213
210. **Takagi Y, Veis A, Sauk JJ** 1983 Relation of mineralization defects in collagen matrices to noncollagenous protein components. Identification of a molecular defect in dentinogenesis imperfecta. *Clin Orthop Relat Res*:282-290

211. **Boskey AL** 1991 The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. *Crit Rev Oral Biol Med* 2:369-387
212. **He G, Ramachandran A, Dahl T, George S, Schultz D, Cookson D, Veis A, George A** 2005 Phosphorylation of phosphophoryn is crucial for its function as a mediator of biomineralization. *J Biol Chem* 280:33109-33114
213. **Termine JD, Eanes ED, Conn KM** 1980 Phosphoprotein modulation of apatite crystallization. *Calcif Tissue Int* 31:247-251
214. **Boskey AL, Maresca M, Doty S, Sabsay B, Veis A** 1990 Concentration-dependent effects of dentin phosphophoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Bone Miner* 11:55-65
215. **Linde A, Bhowm M, Butler WT** 1980 Noncollagenous proteins of dentin. A re-examination of proteins from rat incisor dentin utilizing techniques to avoid artifacts. *J Biol Chem* 255:5931-5942
216. **Boskey A, Spevak L, Tan M, Doty SB, Butler WT** 2000 Dentin sialoprotein (DSP) has limited effects on in vitro apatite formation and growth. *Calcif Tissue Int* 67:472-478
217. **Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB** 2003 Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 278:24874-24880
218. **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** 2001 Dentinogenesis imperfecta I with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet* 27:201-204
219. **Zhang X, Zhao J, Li C, Gao S, Qiu C, Liu P, Wu G, Qiang B, Lo WH, Shen Y** 2001 DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nat Genet* 27:151-152
220. **Beck GR, Jr., Zerler B, Moran E** 2000 Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8352-8357
221. **Kirsch T, Nah HD, Shapiro IM, Pacifici M** 1997 Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes. *J Cell Biol* 137:1149-1160
222. **Anderson HC, Harmey D, Camacho NP, Garimella R, Sipe JB, Tague S, Bi X, Johnson K, Terkeltaub R, Millan JL** 2005 Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *Am J Pathol* 166:1711-1720
223. **Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G** 2004 Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 165:625-630
224. **Beck GR, Jr., Sullivan EC, Moran E, Zerler B** 1998 Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem* 68:269-280
225. **Anderson HC, Hsu HH, Morris DC, Fedde KN, Whyte MP** 1997 Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am J Pathol* 151:1555-1561
226. **Anderson HC, Sipe JB, Hesse L, Dhanyamraju R, Atti E, Camacho NP, Millan JL** 2004 Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol* 164:841-847

227. **Mornet E** 2000 Hypophosphatasia: the mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. *Hum Mutat* 15:309-315
228. **Fisher LW, Fedarko NS** 2003 Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:33-40
229. **Somerman MJ, Sauk JJ, Foster RA, Norris K, Dickerson K, Argraves WS** 1991 Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum. *J Periodontal Res* 26:10-16
230. **Chen J, Shapiro HS, Sodek J** 1992 Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res* 7:987-997
231. **Hunter GK, Goldberg HA** 1994 Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 302 (Pt 1):175-179
232. **Fujisawa R, Nodasaka Y, Kuboki Y** 1995 Further characterization of interaction between bone sialoprotein (BSP) and collagen. *Calcif Tissue Int* 56:140-144
233. **Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, Laroche N, Roux JP, Burt-Pichat B, Duboeuf F, Boivin G, Jurdic P, Lafage-Proust MH, Amedee J, Vico L, Rossant J, Aubin JE** 2008 Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 205:1145-1153
234. **Oldberg A, Franzen A, Heinegard D** 1988 The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. *J Biol Chem* 263:19430-19432
235. **Ross FP, Chappel J, Alvarez JI, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresch DA** 1993 Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. *J Biol Chem* 268:9901-9907
236. **Razzouk S, Brunn JC, Qin C, Tye CE, Goldberg HA, Butler WT** 2002 Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone* 30:40-47
237. **Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS** 2001 Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 280:460-465
238. **George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A** 1993 Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem* 268:12624-12630
239. **MacDougall M, Gu TT, Luan X, Simmons D, Chen J** 1998 Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res* 13:422-431
240. **Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y, Tsutsui TW, Kunieda T, Castranio T, Scott G, Bonewald LB, Mishina Y** 2003 The Dentin matrix protein 1 (Dmp1) is specifically expressed in mineralized, but not soft, tissues during development. *J Dent Res* 82:776-780
241. **Wiesmann HP, Hohling HJ, Zierold K, Barckhaus R** 1995 Elemental distributions in predentine associated with dentine mineralization in rat incisor. *Connect Tissue Res* 33:179-184
242. **He G, Dahl T, Veis A, George A** 2003 Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater* 2:552-558
243. **Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE** 2006 Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 38:1310-1315

244. **Alford AI, Hankenson KD** 2006 Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 38:749-757
245. **Romberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG** 1986 Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* 25:1176-1180
246. **Doi Y, Horiguchi T, Kim SH, Moriwaki Y, Wakamatsu N, Adachi M, Ibaraki K, Moriyama K, Sasaki S, Shimokawa H** 1992 Effects of non-collagenous proteins on the formation of apatite in calcium beta-glycerophosphate solutions. *Arch Oral Biol* 37:15-21
247. **Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E** 2000 Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest* 105:1325
248. **Bornstein P, Sage EH** 2002 Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14:608-616
249. **Bianco P, Silvestrini G, Termine JD, Bonucci E** 1988 Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies. *Calcif Tissue Int* 43:155-161
250. **Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuette M** 2007 Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J Dent Res* 86:296-305
251. **Liemann S, Lewit-Bentley A** 1995 Annexins: a novel family of calcium- and membrane-binding proteins in search of a function. *Structure* 3:233-237
252. **Mollenhauer J** 1997 Annexins: what are they good for? *Cell Mol Life Sci* 53:506-507
253. **Mohiti J, Caswell AM, Walker JH** 1995 Calcium-induced relocation of annexins IV and V in the human osteosarcoma cell line MG-63. *Mol Membr Biol* 12:321-329
254. **Mohiti J, Caswell AM, Walker JH** 1997 The nuclear location of annexin V in the human osteosarcoma cell line MG-63 depends on serum factors and tyrosine kinase signaling pathways. *Exp Cell Res* 234:98-104
255. **Kim HJ, Kirsch T** 2008 Collagen/annexin V interactions regulate chondrocyte mineralization. *J Biol Chem* 283:10310-10317
256. **Liemann S, Huber R** 1997 Three-dimensional structure of annexins. *Cell Mol Life Sci* 53:516-521
257. **Reutelingsperger CP, van Heerde WL** 1997 Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 53:527-532
258. **Wang W, Kirsch T** 2006 Annexin V/beta5 integrin interactions regulate apoptosis of growth plate chondrocytes. *J Biol Chem* 281:30848-30856
259. **Gerke V, Moss SE** 1997 Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1357:129-154
260. **Ea HK, Monceau V, Camors E, Cohen-Solal M, Charlemagne D, Liote F** 2008 Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals. *Ann Rheum Dis* 67:1617-1625
261. **Haut Donahue TL, Genetos DC, Jacobs CR, Donahue HJ, Yellowley CE** 2004 Annexin V disruption impairs mechanically induced calcium signaling in osteoblastic cells. *Bone* 35:656-663
262. **von der Mark K, Mollenhauer J** 1997 Annexin V interactions with collagen. *Cell Mol Life Sci* 53:539-545
263. **Brachvogel B, Dikschas J, Moch H, Welzel H, von der Mark K, Hofmann C, Pöschl E** 2003 Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol* 23:2907-2913
264. **Gillette JM, Nielsen-Preiss SM** 2004 The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization. *J Cell Sci* 117:441-449

265. **Houston B, Seawright E, Jefferies D, Hoogland E, Lester D, Whitehead C, Farquharson C** 1999 Identification and cloning of a novel phosphatase expressed at high levels in differentiating growth plate chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1448:500-506
266. **Houston B, Paton IR, Burt DW, Farquharson C** 2002 Chromosomal localization of the chicken and mammalian orthologues of the orphan phosphatase PHOSPHO1 gene. *Anim Genet* 33:451-454
267. **Roberts SJ, Owen HC, Farquharson C** 2008 Identification of a novel splice variant of the haloacid dehalogenase: PHOSPHO1. *Biochem Biophys Res Commun* 371:872-876
268. **Houston B, Stewart AJ, Farquharson C** 2004 PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. *Bone* 34:629-637
269. **Roberts S, Narisawa S, Harmey D, Millan JL, Farquharson C** 2007 Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization. *J Bone Miner Res* 22:617-627
270. **Stewart AJ, Roberts SJ, Seawright E, Davey MG, Fleming RH, Farquharson C** 2006 The presence of PHOSPHO1 in matrix vesicles and its developmental expression prior to skeletal mineralization. *Bone* 39:1000-1007
271. **Chang AC, Dunham MA, Jeffrey KJ, Reddel RR** 1996 Molecular cloning and characterization of mouse stanniocalcin cDNA. *Mol Cell Endocrinol* 124:185-187
272. **Chang AC, Janosi J, Hulsbeek M, de Jong D, Jeffrey KJ, Noble JR, Reddel RR** 1995 A novel human cDNA highly homologous to the fish hormone stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 112:241-247
273. **Lafeber FP, Flik G, Wendelaar Bonga SE, Perry SF** 1988 Hypocalcin from *Stannius corpuscles* inhibits gill calcium uptake in trout. *Am J Physiol* 254:R891-896
274. **Sundell K, Bjornsson BT, Itoh H, Kawachi H** 1992 Chum salmon (*Oncorhynchus keta*) stanniocalcin inhibits *in vitro* intestinal calcium uptake in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J Comp Physiol B* 162:489-495
275. **Yoshiko Y, Aubin JE, Maeda N** 2002 Stanniocalcin 1 (STC1) protein and mRNA are developmentally regulated during embryonic mouse osteogenesis: the potential of *stc1* as an autocrine/paracrine factor for osteoblast development and bone formation. *J Histochem Cytochem* 50:483-492
276. **De Niu P, Olsen HS, Gentz R, Wagner GF** 1998 Immunolocalization of stanniocalcin in human kidney. *Mol Cell Endocrinol* 137:155-159
277. **Yoshiko Y, Son A, Maeda S, Igarashi A, Takano S, Hu J, Maeda N** 1999 Evidence for stanniocalcin gene expression in mammalian bone. *Endocrinology* 140:1869-1874
278. **Wagner GF, Vozzolo BL, Jaworski E, Haddad M, Kline RL, Olsen HS, Rosen CA, Davidson MB, Renfro JL** 1997 Human stanniocalcin inhibits renal phosphate excretion in the rat. *J Bone Miner Res* 12:165-171
279. **Zhang K, Lindsberg PJ, Tatlisumak T, Kaste M, Olsen HS, Andersson LC** 2000 Stanniocalcin: A molecular guard of neurons during cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3637-3642
280. **Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE** 2007 Osteoblast autonomous Pi regulation via *Pit1* plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 27:4465-4474
281. **Yang F, Schwartz Z, Swain LD, Lee CC, Bowman BH, Boyan BD** 1991 Alpha 2-HS-glycoprotein: expression in chondrocytes and augmentation of alkaline phosphatase and phospholipase A2 activity. *Bone* 12:7-15
282. **Ohnishi T, Arakaki N, Nakamura O, Hirono S, Daikuhara Y** 1991 Purification, characterization, and studies on biosynthesis of a 59-kDa bone sialic acid-containing

- protein (BSP) from rat mandible using a monoclonal antibody. Evidence that 59-kDa BSP may be the rat counterpart of human alpha 2-HS glycoprotein and is synthesized by both hepatocytes and osteoblasts. *J Biol Chem* 266:14636-14645
283. **Quelch KJ, Cole WG, Melick RA** 1984 Noncollagenous proteins in normal and pathological human bone. *Calcif Tissue Int* 36:545-549
284. **Ashton BA, Triffitt JT, Herring GM** 1974 Isolation and partial characterization of a glycoprotein from bovine cortical bone. *Eur J Biochem* 45:525-533
285. **Price PA, Lim JE** 2003 The inhibition of calcium phosphate precipitation by fetuin is accompanied by the formation of a fetuin-mineral complex. *J Biol Chem* 278:22144-22152
286. **Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Ketteler M** 2007 Vascular calcification and fetuin-A deficiency in chronic kidney disease. *Trends Cardiovasc Med* 17:124-128
287. **Fleckenstein-Grun G, Thimm F, Czirfuzs A, Matyas S, Frey M** 1994 Experimental vasoprotection by calcium antagonists against calcium-mediated arteriosclerotic alterations. *J Cardiovasc Pharmacol* 24 Suppl 2:S75-84
288. **Goyal L** 2001 Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell* 104:805-808
289. **Reynolds JL, Skepper JN, McNair R, Kasama T, Gupta K, Weissberg PL, Jahnen-Dechent W, Shanahan CM** 2005 Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 16:2920-2930
290. **Price PA, Toroian D, Lim JE** 2009 Mineralization by inhibitor exclusion: the calcification of collagen with fetuin. *J Biol Chem* 284:17092-17101
291. **Price PA, Williamson MK** 1985 Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 260:14971-14975
292. **Julien M, Magne D, Masson M, Rolli-Derkinderen M, Chassande O, Cario-Toumaniantz C, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J** 2007 Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology* 148:530-537
293. **Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC** 1993 Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 73:193-204
294. **Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL** 1994 High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 93:2393-2402
295. **Fraser JD, Price PA** 1988 Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J Biol Chem* 263:11033-11036
296. **Wajih N, Borrás T, Xue W, Hutson SM, Wallin R** 2004 Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: evidence for an uptake mechanism for serum fetuin. *J Biol Chem* 279:43052-43060
297. **Cancela ML, Price PA** 1992 Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cells. *Endocrinology* 130:102-108
298. **Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H** 1998 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases in vitro vascular calcification by modulating secretion of endogenous parathyroid hormone-related peptide. *Circulation* 98:1302-1306
299. **Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G** 1997 Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386:78-81

300. **Yagami K, Suh JY, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Abrams WR, Shapiro IM, Pacifici M, Iwamoto M** 1999 Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J Cell Biol* 147:1097-1108
301. **Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B, Gardiner RM, Chung E** 1999 Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 21:142-144
302. **Price PA, Urist MR, Otawara Y** 1983 Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 117:765-771
303. **Schinke T, McKee MD, Karsenty G** 1999 Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet* 21:150-151
304. **Price PA, Faus SA, Williamson MK** 2000 Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:317-327
305. **Xue W, Wallin R, Olmsted-Davis EA, Borrás T** 2006 Matrix GLA protein function in human trabecular meshwork cells: inhibition of BMP2-induced calcification process. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:997-1007
306. **Xue W, Comes N, Borrás T** 2007 Presence of an established calcification marker in trabecular meshwork tissue of glaucoma donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3184-3194
307. **Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, DeLange RJ** 1984 Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:371-375
308. **Canfield AE, Hadfield KD, Rock CF, Wylie EC, Wilkinson FL** 2007 HtrA1: a novel regulator of physiological and pathological matrix mineralization? *Biochem Soc Trans* 35:669-671
309. **Proudfoot D, Shanahan CM** 2006 Molecular mechanisms mediating vascular calcification: role of matrix Gla protein. *Nephrology (Carlton)* 11:455-461
310. **Newman B, Gigout LI, Sudre L, Grant ME, Wallis GA** 2001 Coordinated expression of matrix Gla protein is required during endochondral ossification for chondrocyte survival. *J Cell Biol* 154:659-666
311. **Weber GF, Cantor H** 1996 The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:241-248
312. **Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM** 1993 Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 92:1686-1696
313. **Liaw L, Lindner V, Schwartz SM, Chambers AF, Giachelli CM** 1995 Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res* 77:665-672
314. **Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, Nishizawa Y** 2002 Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res* 91:9-16
315. **Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM** 2002 Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 161:2035-2046
316. **Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H** 2005 Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 96:717-722

317. **Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sorensen ES, Boskey AL** 2005 Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int* 77:45-54
318. **Jono S, Peinado C, Giachelli CM** 2000 Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 275:20197-20203
319. **Li X, Yang HY, Giachelli CM** 2006 Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 98:905-912
320. **Christensen B, Petersen TE, Sorensen ES** 2008 Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochem J* 411:53-61
321. **Christensen B, Kazanekki CC, Petersen TE, Rittling SR, Denhardt DT, Sorensen ES** 2007 Cell type-specific post-translational modifications of mouse osteopontin are associated with different adhesive properties. *J Biol Chem* 282:19463-19472
322. **Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD** 2002 Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int* 71:145-154
323. **Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CA, Sodek J** 2002 Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res* 17:1486-1497
324. **Chellaiah MA, Kizer N, Biswas R, Alvarez U, Strauss-Schoenberger J, Rifas L, Rittling SR, Denhardt DT, Hruska KA** 2003 Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression. *Mol Biol Cell* 14:173-189
325. **Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C, Liaw L, Alpers CE, Couser WG, Kleinman JG, Hughes J** 2003 Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 14:139-147
326. **Ducy P, Karsenty G** 1995 Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 15:1858-1869
327. **Luo G, D'Souza R, Hogue D, Karsenty G** 1995 The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *J Bone Miner Res* 10:325-334
328. **Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G** 1996 Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452
329. **Poser JW, Price PA** 1979 A method for decarboxylation of gamma-carboxyglutamic acid in proteins. Properties of the decarboxylated gamma-carboxyglutamic acid protein from calf bone. *J Biol Chem* 254:431-436
330. **Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA** 1996 Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 317 (Pt 1):59-64
331. **Boskey AL, Wians FH, Jr., Hauschka PV** 1985 The effect of osteocalcin on in vitro lipid-induced hydroxyapatite formation and seeded hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int* 37:57-62
332. **Matsunaga S, Ito H, Sakou T** 1999 The effect of vitamin K and D supplementation on ovariectomy-induced bone loss. *Calcif Tissue Int* 65:285-289
333. **Hauschka PV, Carr SA** 1982 Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 21:2538-2547

334. **Goding JW, Grobden B, Slegers H** 2003 Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. *Biochim Biophys Acta* 1638:1-19
335. **Terkeltaub RA** 2001 Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1-C11
336. **Moochhala SH, Sayer JA, Carr G, Simmons NL** 2008 Renal calcium stones: insights from the control of bone mineralization. *Exp Physiol* 93:43-49
337. **Pendleton A, Johnson MD, Hughes A, Gurley KA, Ho AM, Doherty M, Dixey J, Gillet P, Loeuille D, McGrath R, Reginato A, Shiang R, Wright G, Netter P, Williams C, Kingsley DM** 2002 Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis. *Am J Hum Genet* 71:933-940
338. **Nurnberg P, Thiele H, Chandler D, Hohne W, Cunningham ML, Ritter H, Leschik G, Uhlmann K, Mischung C, Harrop K, Goldblatt J, Borochowitz ZU, Kotzot D, Westermann F, Mundlos S, Braun HS, Laing N, Tinschert S** 2001 Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia. *Nat Genet* 28:37-41
339. **Parker G, Bullingham R, Kamm B, Hale M** 1996 Pharmacokinetics of oral mycophenolate mofetil in volunteer subjects with varying degrees of hepatic oxidative impairment. *J Clin Pharmacol* 36:332-344
340. **Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC** 2004 Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 74:103-106
341. **Collin-Osdoby P** 2004 Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 95:1046-1057
342. **Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC** 2002 RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:549-553
343. **Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ** 1998 Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93:165-176
344. **Leibbrandt A, Penninger JM** 2008 RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 1143:123-150
345. **Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS** 1998 osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 12:1260-1268
346. **Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, Schoppet M, Dobnig H** 2007 Vascular calcification and osteoporosis--from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporos Int* 18:251-259
347. **Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G** 2006 The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4:801-811
348. **Giachelli CM** 2005 Inducers and inhibitors of biomineralization: lessons from pathological calcification. *Orthod Craniofac Res* 8:229-231
349. **Magne D, Julien M, Vinatier C, Merhi-Soussi F, Weiss P, Guicheux J** 2005 Cartilage formation in growth plate and arteries: from physiology to pathology. *Bioessays* 27:708-716

350. **Terkeltaub RA** 2002 What does cartilage calcification tell us about osteoarthritis? *J Rheumatol* 29:411-415
351. **Maldonado I, Reginato AM, Reginato AJ** 2001 Familial calcium crystal diseases: what have we learned? *Curr Opin Rheumatol* 13:225-233
352. **Zhang Y, Brown MA** 2005 Genetic studies of chondrocalcinosis. *Curr Opin Rheumatol* 17:330-335
353. **Wilson PW, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA** 2001 Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 103:1529-1534
354. **Bostrom KI** 2000 Cell differentiation in vascular calcification. *Z Kardiol* 89 Suppl 2:69-74
355. **Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson MK** 2001 Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1610-1616
356. **Schinke T, Karsenty G** 2000 Vascular calcification--a passive process in need of inhibitors. *Nephrol Dial Transplant* 15:1272-1274
357. **Ketteler M, Vermeer C, Wanner C, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Floege J** 2002 Novel insights into uremic vascular calcification: role of matrix Gla protein and alpha-2-Heremans Schmid glycoprotein/fetuin. *Blood Purif* 20:473-476
358. **Merx MW, Schafer C, Westenfeld R, Brandenburg V, Hidajat S, Weber C, Ketteler M, Jahnen-Dechent W** 2005 Myocardial stiffness, cardiac remodeling, and diastolic dysfunction in calcification-prone fetuin-A-deficient mice. *J Am Soc Nephrol* 16:3357-3364
359. **Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM** 2000 Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 87:E10-17
360. **Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM** 2001 Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ Res* 89:1147-1154
361. **Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM** 2003 Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:489-494
362. **Proudfoot D, Shanahan CM, Weissberg PL** 1998 Vascular calcification: new insights into an old problem. *J Pathol* 185:1-3
363. **Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME** 1999 Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100:2168-2176
364. **Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL** 2000 Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 102:2636-2642
365. **Nielsen LB, Pedersen FS, Pedersen L** 2001 Expression of type III sodium-dependent phosphate transporters/retroviral receptors mRNAs during osteoblast differentiation. *Bone* 28:160-166
366. **Parhami F, Tintut Y, Patel JK, Mody N, Hemmat A, Demer LL** 2001 Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. *Z Kardiol* 90 Suppl 3:27-30
367. **Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL** 2001 Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 88:954-960

368. **Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottier P** 2003 Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48:3118-3129
369. **Lotz M** 1999 The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 25:269-282
370. **Giachelli CM** 2003 Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* 14:S300-304
371. **Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS** 1995 Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol* 25 Suppl 2:S9-12
372. **Hruska KA, Mathew S, Lund R, Qiu P, Pratt R** 2008 Hyperphosphatemia of chronic kidney disease. *Kidney Int* 74:148-157
373. **Kumar R** 2009 Phosphate sensing. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18:281-284
374. **Mouillon JM, Persson BL** 2006 New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:171-176
375. **Lamarche MG, Wanner BL, Crepin S, Harel J** 2008 The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 32:461-473
376. **Ullrich KJ, Murer H** 1982 Sulphate and phosphate transport in the renal proximal tubule. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 299:549-558
377. **Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS** 1998 Targeted inactivation of *Npt2* in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5372-5377
378. **Segawa H, Onitsuka A, Kuwahata M, Hanabusa E, Furutani J, Kaneko I, Tomoe Y, Aranami F, Matsumoto N, Ito M, Matsumoto M, Li M, Amizuka N, Miyamoto K** 2009 Type IIc sodium-dependent phosphate transporter regulates calcium metabolism. *J Am Soc Nephrol* 20:104-113
379. **Prie D, Huart V, Bakouh N, Planelles G, Dellis O, Gerard B, Hulin P, Benque-Blanchet F, Silve C, Grandchamp B, Friedlander G** 2002 Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter. *N Engl J Med* 347:983-991
380. **Magen D, Berger L, Coady MJ, Ilivitzki A, Militianu D, Tieder M, Selig S, Lapointe JY, Zelikovic I, Skorecki K** A loss-of-function mutation in *NaPi-IIa* and renal Fanconi's syndrome. *N Engl J Med* 362:1102-1109
381. **Miyamoto K, Ito M, Tatsumi S, Kuwahata M, Segawa H** 2007 New aspect of renal phosphate reabsorption: the type IIc sodium-dependent phosphate transporter. *Am J Nephrol* 27:503-515
382. **Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, Kuwahata M, Ito M, Ohkido I, Tatsumi S, Miyamoto K** 2002 Growth-related renal type II *Na/Pi* cotransporter. *J Biol Chem* 277:19665-19672
383. **Bergwitz C, Roslin NM, Tieder M, Loreda-Osti JC, Bastepe M, Abu-Zahra H, Frappier D, Burkett K, Carpenter TO, Anderson D, Garabedian M, Sermet I, Fujiwara TM, Morgan K, Tenenhouse HS, Juppner H** 2006 *SLC34A3* mutations in patients with hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria predict a key role for the sodium-phosphate cotransporter *NaPi-IIc* in maintaining phosphate homeostasis. *Am J Hum Genet* 78:179-192
384. **Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Eckstein G, Tenenbaum-Rakover Y, Wagenstaller J, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Albers N, Lichtner P, Schnabel D, Hochberg Z, Strom TM** 2006 Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria is caused by mutations in the sodium-phosphate cotransporter gene *SLC34A3*. *Am J Hum Genet* 78:193-201

385. **Broer S, Schuster A, Wagner CA, Broer A, Forster I, Biber J, Murer H, Werner A, Lang F, Busch AE** 1998 Chloride conductance and Pi transport are separate functions induced by the expression of NaPi-1 in *Xenopus* oocytes. *J Membr Biol* 164:71-77
386. **Urano W, Taniguchi A, Anzai N, Inoue E, Kanai Y, Yamanaka M, Kamatani N, Endou H, Yamanaka H** 2009 Sodium-dependent phosphate cotransporter type 1 (NPT1) sequence polymorphisms in male patients with gout. *Ann Rheum Dis*
387. **Villa-Bellosta R, Ravera S, Sorribas V, Stange G, Levi M, Murer H, Biber J, Forster IC** 2009 The Na⁺-Pi cotransporter PiT-2 (SLC20A2) is expressed in the apical membrane of rat renal proximal tubules and regulated by dietary Pi. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F691-699
388. **Villa-Bellosta R, Sorribas V** Compensatory regulation of the sodium/phosphate cotransporters NaPi-IIc (SCL34A3) and Pit-2 (SLC20A2) during Pi deprivation and acidosis. *Pflugers Arch* 459:499-508
389. **Sabbagh Y, O'Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C, Schiavi SC** 2009 Intestinal Npt2b Plays a Major Role in Phosphate Absorption and Homeostasis. *J Am Soc Nephrol*
390. **Hilfiker H, Hattenhauer O, Traebert M, Forster I, Murer H, Biber J** 1998 Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14564-14569
391. **Feild JA, Zhang L, Brun KA, Brooks DP, Edwards RM** 1999 Cloning and functional characterization of a sodium-dependent phosphate transporter expressed in human lung and small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 258:578-582
392. **O'Hara B, Johann SV, Klinger HP, Blair DG, Rubinson H, Dunn KJ, Sass P, Vitek SM, Robins T** 1990 Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Differ* 1:119-127
393. **Johann SV, Gibbons JJ, O'Hara B** 1992 GLVR1, a receptor for gibbon ape leukemia virus, is homologous to a phosphate permease of *Neurospora crassa* and is expressed at high levels in the brain and thymus. *J Virol* 66:1635-1640
394. **Miller DG, Edwards RH, Miller AD** 1994 Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:78-82
395. **Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, Miller AD** 1994 Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7071-7075
396. **Kavanaugh MP, Kabat D** 1996 Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family. *Kidney Int* 49:959-963
397. **Uckert W, Willimsky G, Pedersen FS, Blankenstein T, Pedersen L** 1998 RNA levels of human retrovirus receptors Pit1 and Pit2 do not correlate with infectibility by three retroviral vector pseudotypes. *Hum Gene Ther* 9:2619-2627
398. **Palmer G, Zhao J, Bonjour J, Hofstetter W, Caverzasio J** 1999 In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development. *Bone* 24:1-7
399. **Masukawa H, Miura Y, Sato I, Oiso Y, Suzuki A** 2001 Stimulatory effect of endothelin-1 on Na-dependent phosphate transport and its signaling mechanism in osteoblast-like cells. *J Cell Biochem* 83:47-55
400. **Sato I, Suzuki A, Kakita A, Ono Y, Miura Y, Itoh M, Oiso Y** 2003 Stimulatory effect of prostaglandin F(2alpha) on Na-dependent phosphate transport in osteoblast-like cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68:311-315

401. **Yoshiko Y, Maeda N, Aubin JE** 2003 Stanniocalcin 1 stimulates osteoblast differentiation in rat calvaria cell cultures. *Endocrinology* 144:4134-4143
402. **Palmer G, Guicheux J, Bonjour JP, Caverzasio J** 2000 Transforming growth factor-beta stimulates inorganic phosphate transport and expression of the type III phosphate transporter *Glvr-1* in chondrogenic ATDC5 cells. *Endocrinology* 141:2236-2243
403. **Suzuki A, Palmer G, Bonjour JP, Caverzasio J** 2001 Stimulation of sodium-dependent inorganic phosphate transport by activation of Gi/o-protein-coupled receptors by epinephrine in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Bone* 28:589-594
404. **Zoidis E, Ghirlanda-Keller C, Gosteli-Peter M, Zapf J, Schmid C** 2004 Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts. *J Endocrinol* 181:531-540
405. **Lundquist P, Murer H, Biber J** 2007 Type II Na⁺-Pi cotransporters in osteoblast mineral formation: regulation by inorganic phosphate. *Cell Physiol Biochem* 19:43-56
406. **Khadeer MA, Tang Z, Tenenhouse HS, Eiden MV, Murer H, Hernando N, Weinman EJ, Chellaiah MA, Gupta A** 2003 Na⁺-dependent phosphate transporters in the murine osteoclast: cellular distribution and protein interactions. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1633-1644
407. **Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ** 2003 Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Embo J* 22:776-785
408. **Perez AV, Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta Lopez ME, Tolosa de Talamoni NG** 2008 Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion* 77:22-34
409. **Philipson KD, Nicoll DA, Matsuoka S, Hryshko LV, Levitsky DO, Weiss JN** 1996 Molecular regulation of the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Ann N Y Acad Sci* 779:20-28
410. **Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M, Houillier P** 2001 Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int* 59:2206-2215
411. **Boros S, Bindels RJ, Hoenderop JG** 2009 Active Ca⁽²⁺⁾ reabsorption in the connecting tubule. *Pflugers Arch* 458:99-109
412. **Lytton J** 2007 Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem J* 406:365-382
413. **Barry EL** 2000 Expression of mRNAs for the alpha 1 subunit of voltage-gated calcium channels in human osteoblast-like cell lines and in normal human osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 66:145-150
414. **Francis MJ, Lees RL, Trujillo E, Martin-Vasallo P, Heersche JN, Mobasheri A** 2002 ATPase pumps in osteoclasts and osteoblasts. *Int J Biochem Cell Biol* 34:459-476
415. **Madgwick S, Lévassieur M, Jones KT** 2005 Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *J Cell Sci* 118:3849-3859
416. **Mailland M, Waelchli R, Ruat M, Boddeke HG, Seuwen K** 1997 Stimulation of cell proliferation by calcium and a calcimimetic compound. *Endocrinology* 138:3601-3605
417. **Quarles LD, Hartle JE, 2nd, Siddhanti SR, Guo R, Hinson TK** 1997 A distinct cation-sensing mechanism in MC3T3-E1 osteoblasts functionally related to the calcium receptor. *J Bone Miner Res* 12:393-402

418. **Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC** 1993 Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 366:575-580
419. **Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Butters RR, Jr., Sugimoto T, Brown EM** 1998 Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca^{2+})-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 13:1530-1538
420. **Yamaguchi T, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM** 1998 Expression of extracellular calcium (Ca^{2+})-sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2. *Biochem Biophys Res Commun* 243:753-757
421. **Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Ye C, Vassilev PM, Sanders JL, Brown EM** 2001 Expression of extracellular calcium-sensing receptor in human osteoblastic MG-63 cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C382-393
422. **Chang W, Tu C, Chen TH, Komuves L, Oda Y, Pratt SA, Miller S, Shoback D** 1999 Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology* 140:5883-5893
423. **Chang W, Tu C, Chen TH, Bikle D, Shoback D** 2008 The extracellular calcium-sensing receptor (CaSR) is a critical modulator of skeletal development. *Sci Signal* 1:ra1
424. **Brown EM, Lian JB** 2008 New insights in bone biology: unmasking skeletal effects of the extracellular calcium-sensing receptor. *Sci Signal* 1:pe40
425. **Chattopadhyay N, Yano S, Tfelt-Hansen J, Rooney P, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S, Ren X, Terwilliger E, Brown EM** 2004 Mitogenic action of calcium-sensing receptor on rat calvarial osteoblasts. *Endocrinology* 145:3451-3462
426. **Ward BK, Magno AL, Davis EA, Hanyaloglu AC, Stuckey BG, Burrows M, Eidne KA, Charles AK, Ratajczak T** 2004 Functional deletion of the calcium-sensing receptor in a case of neonatal severe hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3721-3730
427. **Pi M, Garner SC, Flannery P, Spurney RF, Quarles LD** 2000 Sensing of extracellular cations in CasR-deficient osteoblasts. Evidence for a novel cation-sensing mechanism. *J Biol Chem* 275:3256-3263
428. **Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, Wang N, Fontilla-Poole M, Mays RW, Brunden KR, Harrington JJ, Quarles LD** 2005 Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 280:40201-40209
429. **Pi M, Quarles LD** 2005 Osteoblast calcium-sensing receptor has characteristics of ANF/7TM receptors. *J Cell Biochem* 95:1081-1092
430. **Wellendorph P, Brauner-Osborne H** 2009 Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 156:869-884
431. **Caverzasio J, Bonjour JP** 1985 Mechanism of rapid phosphate (P_i) transport adaptation to a single low P_i meal in rat renal brush border membrane. *Pflugers Arch* 404:227-231
432. **Levi M, Kempson SA, Lotscher M, Biber J, Murer H** 1996 Molecular regulation of renal phosphate transport. *J Membr Biol* 154:1-9
433. **Kido S, Miyamoto K, Mizobuchi H, Taketani Y, Ohkido I, Ogawa N, Kaneko Y, Harashima S, Takeda E** 1999 Identification of regulatory sequences and binding proteins in the type II sodium/phosphate cotransporter NPT2 gene responsive to dietary phosphate. *J Biol Chem* 274:28256-28263
434. **Biber J, Hernando N, Forster I, Murer H** 2009 Regulation of phosphate transport in proximal tubules. *Pflugers Arch* 458:39-52

435. **Capuano P, Radanovic T, Wagner CA, Bacic D, Kato S, Uchiyama Y, St-Arnoud R, Murer H, Biber J** 2005 Intestinal and renal adaptation to a low-Pi diet of type II NaPi cotransporters in vitamin D receptor- and 1 α OHase-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C429-434
436. **Silver J, Yalcindag C, Sela-Brown A, Kilav R, Naveh-Many T** 1999 Regulation of the parathyroid hormone gene by vitamin D, calcium and phosphate. *Kidney Int Suppl* 73:S2-7
437. **Bruin WJ, Baylink DJ, Wergedal JE** 1975 Acute inhibition of mineralization and stimulation of bone resorption mediated by hypophosphatemia. *Endocrinology* 96:394-399
438. **Thompson ER, Baylink DJ, Wergedal JE** 1975 Increases in number and size of osteoclasts in response to calcium or phosphorus deficiency in the rat. *Endocrinology* 97:283-289
439. **Hayashibara T, Hiraga T, Sugita A, Wang L, Hata K, Ooshima T, Yoneda T** 2007 Regulation of osteoclast differentiation and function by phosphate: potential role of osteoclasts in the skeletal abnormalities in hypophosphatemic conditions. *J Bone Miner Res* 22:1743-1751
440. **Segawa H, Yamanaka S, Ito M, Kuwahata M, Shono M, Yamamoto T, Miyamoto K** 2005 Internalization of renal type IIc Na-Pi cotransporter in response to a high-phosphate diet. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F587-596
441. **Silver J, Kilav R, Naveh-Many T** 2002 Mechanisms of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F367-376
442. **Almaden Y, Hernandez A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernandez Cruz L, Campistol JM, Torres A, Rodriguez M** 1998 High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol* 9:1845-1852
443. **Slatopolsky E, Finch J, Denda M, Ritter C, Zhong M, Dusso A, MacDonald PN, Brown AJ** 1996 Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest* 97:2534-2540
444. **Huttunen MM, Tillman I, Viljakainen HT, Tuukkanen J, Peng Z, Pekkinen M, Lamberg-Allardt CJ** 2007 High dietary phosphate intake reduces bone strength in the growing rat skeleton. *J Bone Miner Res* 22:83-92
445. **Chattopadhyay N, Mithal A, Brown EM** 1996 The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr Rev* 17:289-307
446. **Iida K, Shinki T, Yamaguchi A, DeLuca HF, Kurokawa K, Suda T** 1995 A possible role of vitamin D receptors in regulating vitamin D activation in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6112-6116
447. **D'Amour P** 2006 Circulating PTH molecular forms: what we know and what we don't. *Kidney Int Suppl*:S29-33
448. **Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P** 2001 Synthetic carboxyl-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTH-related peptide receptor. *Endocrinology* 142:1386-1392
449. **Weinman EJ, Biswas RS, Peng G, Shen L, Turner CL, E X, Steplock D, Shenolikar S, Cunningham R** 2007 Parathyroid hormone inhibits renal phosphate transport by phosphorylation of serine 77 of sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1. *J Clin Invest* 117:3412-3420

450. **Fernandes I, Beliveau R, Friedlander G, Silve C** 1999 NaPO(4) cotransport type III (PiT1) expression in human embryonic kidney cells and regulation by PTH. *Am J Physiol* 277:F543-551
451. **Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, Suda T, DeLuca HF** 1998 Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1387-1391
452. **Datta NS, Abou-Samra AB** 2009 PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal* 21:1245-1254
453. **Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC** 1999 Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104:439-446
454. **Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL** 2003 Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 89:180-190
455. **Silver J, Naveh-Manly T** 2009 Phosphate and the parathyroid. *Kidney Int* 75:898-905
456. **Verhave G, Siegert CE** Role of vitamin D in cardiovascular disease. *Neth J Med* 68:113-118
457. **Malloy PJ, Pike JW, Feldman D** 1999 The vitamin D receptor and the syndrome of hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets. *Endocr Rev* 20:156-188
458. **Nemere I, Safford SE, Rohe B, DeSouza MM, Farach-Carson MC** 2004 Identification and characterization of 1,25D3-membrane-associated rapid response, steroid (1,25D3-MARRS) binding protein. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90:281-285
459. **Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E** 2005 Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289:F8-28
460. **Roodman GD** 1996 Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 17:308-332
461. **Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, Juppner H, Jonsson KB** 2004 Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology* 145:3087-3094
462. **Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T** 2004 FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19:429-435
463. **Miyamoto K, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H** 2005 Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 9:331-335
464. **Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T** 2004 Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 113:561-568
465. **Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T** 2001 Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6500-6505
466. **Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T** 2006 Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444:770-774

467. **Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M** 2006 Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 281:6120-6123
468. **Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI** 1997 Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45-51
469. **Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD** 2003 Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem* 278:37419-37426
470. **Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T** 2002 Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology* 143:3179-3182
471. **Burnett SM, Gunawardene SC, Bringham FR, Juppner H, Lee H, Finkelstein JS** 2006 Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res* 21:1187-1196
472. **Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R** 2005 Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1519-1524
473. **Nampei A, Hashimoto J, Hayashida K, Tsuboi H, Shi K, Tsuji I, Miyashita H, Yamada T, Matsukawa N, Matsumoto M, Morimoto S, Ogihara T, Ochi T, Yoshikawa H** 2004 Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone. *J Bone Miner Metab* 22:176-184
474. **MacDougall M, Simmons D, Gu TT, Dong J** 2002 MEPE/OF45, a new dentin/bone matrix protein and candidate gene for dentin diseases mapping to chromosome 4q21. *Connect Tissue Res* 43:320-330
475. **Rowe PS, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL** 2000 MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics* 67:54-68
476. **Quarles LD, Drezner MK** 2001 Pathophysiology of X-linked hypophosphatemia, tumor-induced osteomalacia, and autosomal dominant hypophosphatemia: a perPHEXing problem. *J Clin Endocrinol Metab* 86:494-496
477. **Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, Tkalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD, Brown TA** 2003 Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem* 278:1998-2007
478. **Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD, Mundy GR** 2004 MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. *Bone* 34:303-319
479. **Guo R, Rowe PS, Liu S, Simpson LG, Xiao ZS, Quarles LD** 2002 Inhibition of MEPE cleavage by Phex. *Biochem Biophys Res Commun* 297:38-45
480. **Zhang GX, Mizuno M, Tsuji K, Tamura M** 2004 Regulation of mRNA expression of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)/ osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45) by fibroblast growth factor 2 in cultures of rat bone marrow-derived osteoblastic cells. *Endocrine* 24:15-24
481. **Siggelkow H, Schmidt E, Hennies B, Hufner M** 2004 Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts. *Bone* 35:570-576

482. **Liu S, Brown TA, Zhou J, Xiao ZS, Awad H, Guilak F, Quarles LD** 2005 Role of matrix extracellular phosphoglycoprotein in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemia. *J Am Soc Nephrol* 16:1645-1653
483. **Ye L, Mishina Y, Chen D, Huang H, Dallas SL, Dallas MR, Sivakumar P, Kunieda T, Tsutsui TW, Boskey A, Bonewald LF, Feng JQ** 2005 Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J Biol Chem* 280:6197-6203
484. **Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, Jan De Beur SM, Schiavi SC, Kumar R** 2003 Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest* 112:785-794
485. **Francis F, Strom TM, Hennig S, Boddlich A, Lorenz B, Brandau O, Mohnike KL, Cagnoli M, Steffens C, Klages S, Borzym K, Pohl T, Oudet C, Econs MJ, Rowe PS, Reinhardt R, Meitinger T, Lehrach H** 1997 Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. *Genome Res* 7:573-585
486. **Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski MC, Beaumont A** 1993 Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45:87-146
487. **Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS** 1997 Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 99:1200-1209
488. **Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G** 1998 Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* 46:459-468
489. **Carpinelli MR, Wicks IP, Sims NA, O'Donnell K, Hanzinikolas K, Burt R, Foote SJ, Bahlo M, Alexander WS, Hilton DJ** 2002 An ethyl-nitrosourea-induced point mutation in pex causes exon skipping, x-linked hypophosphatemia, and rickets. *Am J Pathol* 161:1925-1933
490. **Meyer RA, Jr., Henley CM, Meyer MH, Morgan PL, McDonald AG, Mills C, Price DK** 1998 Partial deletion of both the spermine synthase gene and the Pex gene in the X-linked hypophosphatemic, gyro (Gy) mouse. *Genomics* 48:289-295
491. **Eicher EM, Southard JL, Scriver CR, Glorieux FH** 1976 Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4667-4671
492. **Tenenhouse HS, Werner A, Biber J, Ma S, Martel J, Roy S, Murer H** 1994 Renal Na(+)-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. *J Clin Invest* 93:671-676
493. **Tenenhouse HS, Beck L** 1996 Renal Na(+)-phosphate cotransporter gene expression in X-linked Hyp and Gy mice. *Kidney Int* 49:1027-1032
494. **Tenenhouse HS, Martel J, Gauthier C, Segawa H, Miyamoto K** 2003 Differential effects of Npt2a gene ablation and X-linked Hyp mutation on renal expression of Npt2c. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F1271-1278
495. **Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y, Yamamoto T, Hampson G, Koshiyama H, Ljunggren O, Oba K, Yang IM, Miyauchi A, Econs MJ, Lavigne J, Juppner H** 2003 Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. *N Engl J Med* 348:1656-1663
496. **Martin A, David V, Laurence JS, Schwarz PM, Lafer EM, Hedge AM, Rowe PS** 2008 Degradation of MEPE, DMP1, and release of SIBLING ASARM-peptides

- (minhibins): ASARM-peptide(s) are directly responsible for defective mineralization in HYP. *Endocrinology* 149:1757-1772
497. Addison WN, Nakano Y, Loisel T, Crine P, McKee MD 2008 MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 23:1638-1649
 498. Beck GR, Jr., Knecht N 2003 Osteopontin regulation by inorganic phosphate is ERK1/2-, protein kinase C-, and proteasome-dependent. *J Biol Chem* 278:41921-41929
 499. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ 1988 Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 175:266-276
 500. Marenzana M, Shipley AM, Squitiero P, Kunkel JG, Rubinacci A 2005 Bone as an ion exchange organ: evidence for instantaneous cell-dependent calcium efflux from bone not due to resorption. *Bone* 37:545-554
 501. Bingham PJ, Raisz LG 1974 Bone growth in organ culture: effects of phosphate and other nutrients on bone and cartilage. *Calcif Tissue Res* 14:31-48
 502. Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Chihara K 2002 IGF-I mediates the stimulatory effect of high phosphate concentration on osteoblastic cell proliferation. *J Cell Physiol* 190:306-312
 503. Beck GR, Jr., Moran E, Knecht N 2003 Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res* 288:288-300
 504. Conrads KA, Yu LR, Lucas DA, Zhou M, Chan KC, Simpson KA, Schaefer CF, Issaq HJ, Veenstra TD, Beck GR, Jr., Conrads TP 2004 Quantitative proteomic analysis of inorganic phosphate-induced murine MC3T3-E1 osteoblast cells. *Electrophoresis* 25:1342-1352
 505. Conrads KA, Yi M, Simpson KA, Lucas DA, Camalier CE, Yu LR, Veenstra TD, Stephens RM, Conrads TP, Beck GR, Jr. 2005 A combined proteome and microarray investigation of inorganic phosphate-induced pre-osteoblast cells. *Mol Cell Proteomics* 4:1284-1296
 506. Naviglio S, Spina A, Chiosi E, Fusco A, Illiano F, Pagano M, Romano M, Senatore G, Sorrentino A, Sorvillo L, Illiano G 2006 Inorganic phosphate inhibits growth of human osteosarcoma U2OS cells via adenylate cyclase/cAMP pathway. *J Cell Biochem* 98:1584-1596
 507. Zucchini C, Bianchini M, Valvassori L, Perdichizzi S, Benini S, Manara MC, Solmi R, Strippoli P, Picci P, Carinci P, Scotlandi K 2004 Identification of candidate genes involved in the reversal of malignant phenotype of osteosarcoma cells transfected with the liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *Bone* 34:672-679
 508. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB 1987 Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev Biol* 122:49-60
 509. Bellows CG, Heersche JN, Aubin JE 1992 Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner* 17:15-29
 510. Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM 1992 Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int* 51:305-311
 511. Denhardt DT, Noda M 1998 Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:92-102

512. **Chang SH, Yu KN, Lee YS, An GH, Beck GR, Jr., Colburn NH, Lee KH, Cho MH** 2006 Elevated inorganic phosphate stimulates Akt-ERK1/2-Mnk1 signaling in human lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:528-539
513. **Fujita T, Izumo N, Fukuyama R, Meguro T, Nakamuta H, Kohno T, Koida M** 2001 Phosphate provides an extracellular signal that drives nuclear export of Runx2/Cbfa1 in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280:348-352
514. **Chang YL, Stanford CM, Keller JC** 2000 Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (HA)-enhanced bone formation. *J Biomed Mater Res* 52:270-278
515. **Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT** 1999 Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *J Bone Miner Res* 14:893-903
516. **Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN** 1991 Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner* 14:27-40
517. **Tenenbaum HC, Limeback H, McCulloch CA, Mamujee H, Sukhu B, Torontali M** 1992 Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by beta-glycerophosphate in chick periosteal cultures. *Bone* 13:129-138
518. **Meleti Z, Shapiro IM, Adams CS** 2000 Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone* 27:359-366
519. **Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC** 1998 Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res* 13:793-802
520. **Williams G, Sallis JD** 1979 Structure--activity relationship of inhibitors of hydroxyapatite formation. *Biochem J* 184:181-184
521. **Mwale F, Tchentina E, Wu CW, Poole AR** 2002 The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. *J Bone Miner Res* 17:275-283
522. **Alini M, Carey D, Hirata S, Grynblas MD, Pidoux I, Poole AR** 1994 Cellular and matrix changes before and at the time of calcification in the growth plate studied in vitro: arrest of type X collagen synthesis and net loss of collagen when calcification is initiated. *J Bone Miner Res* 9:1077-1087
523. **Cecil DL, Rose DM, Terkeltaub R, Liu-Bryan R** 2005 Role of interleukin-8 in PiT-1 expression and CXCR1-mediated inorganic phosphate uptake in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 52:144-154
524. **Fujita T, Meguro T, Izumo N, Yasutomi C, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M** 2001 Phosphate stimulates differentiation and mineralization of the chondroprogenitor clone ATDC5. *Jpn J Pharmacol* 85:278-281
525. **Sabbagh Y, Carpenter TO, Demay MB** 2005 Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9637-9642
526. **Teixeira CC, Mansfield K, Hertkorn C, Ischiropoulos H, Shapiro IM** 2001 Phosphate-induced chondrocyte apoptosis is linked to nitric oxide generation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C833-839
527. **Teixeira CC, Costas AP, Nemelivsky Y** 2007 Apoptosis of growth plate chondrocytes occurs through a mitochondrial pathway. *Angle Orthod* 77:129-134
528. **Donohue MM, Demay MB** 2002 Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology* 143:3691-3694

529. **Mansfield K, Teixeira CC, Adams CS, Shapiro IM** 2001 Phosphate ions mediate chondrocyte apoptosis through a plasma membrane transporter mechanism. *Bone* 28:1-8
530. **Mansfield K, Pucci B, Adams CS, Shapiro IM** 2003 Induction of apoptosis in skeletal tissues: phosphate-mediated chick chondrocyte apoptosis is calcium dependent. *Calcif Tissue Int* 73:161-172
531. **Wada K, Mizuno M, Komori T, Tamura M** 2004 Extracellular inorganic phosphate regulates gibbon ape leukemia virus receptor-2/phosphate transporter mRNA expression in rat bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 198:40-47
532. **Wu S, Yoshiko Y, De Luca F** 2006 Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis. *J Biol Chem* 281:5120-5127
533. **Chien ML, O'Neill E, Garcia JV** 1998 Phosphate depletion enhances the stability of the amphotropic murine leukemia virus receptor mRNA. *Virology* 240:109-117
534. **Yates AJ, Oreffo RO, Mayor K, Mundy GR** 1991 Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of mature osteoclasts. *J Bone Miner Res* 6:473-478
535. **Kanatani M, Sugimoto T, Kano J, Kanzawa M, Chihara K** 2003 Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity. *J Cell Physiol* 196:180-189
536. **Takeyama S, Yoshimura Y, Deyama Y, Sugawara Y, Fukuda H, Matsumoto A** 2001 Phosphate decreases osteoclastogenesis in coculture of osteoblast and bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun* 282:798-802
537. **Mozar A, Haren N, Chasseraud M, Louvet L, Maziere C, Wattel A, Mentaverri R, Morliere P, Kamel S, Brazier M, Maziere JC, Massy ZA** 2008 High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK-RANKL signaling in osteoclast-like cells. *J Cell Physiol* 215:47-54
538. **Foster BL, Nociti FH, Jr., Swanson EC, Matsa-Dunn D, Berry JE, Cupp CJ, Zhang P, Somerman MJ** 2006 Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro. *Calcif Tissue Int* 78:103-112
539. **Rutherford RB, Foster BL, Bammler T, Beyer RP, Sato S, Somerman MJ** 2006 Extracellular phosphate alters cementoblast gene expression. *J Dent Res* 85:505-509
540. **Lundquist P** 2002 Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis. *Swed Dent J Suppl*:1-52
541. **Villa-Bellosta R, Bogaert YE, Levi M, Sorribas V** 2007 Characterization of phosphate transport in rat vascular smooth muscle cells: implications for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1030-1036
542. **Sugimoto T, Kanatani M, Kano J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Fukase M, Chihara K** 1994 IGF-I mediates the stimulatory effect of high calcium concentration on osteoblastic cell proliferation. *Am J Physiol* 266:E709-716
543. **Schmid C, Keller C, Schlapfer I, Veldman C, Zapf J** 1998 Calcium and insulin-like growth factor I stimulation of sodium-dependent phosphate transport and proliferation of cultured rat osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 245:220-225
544. **Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J** 2005 The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 26:4847-4855
545. **Wu X, Itoh N, Taniguchi T, Nakanishi T, Tanaka K** 2003 Requirement of calcium and phosphate ions in expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 and osteopontin in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1641:65-70

546. **Adams CS, Mansfield K, Perlot RL, Shapiro IM** 2001 Matrix regulation of skeletal cell apoptosis. Role of calcium and phosphate ions. *J Biol Chem* 276:20316-20322
547. **Wang D, Canaff L, Davidson D, Corluka A, Liu H, Hendy GN, Henderson JE** 2001 Alterations in the sensing and transport of phosphate and calcium by differentiating chondrocytes. *J Biol Chem* 276:33995-34005
548. **Kameda T, Mano H, Yamada Y, Takai H, Amizuka N, Kobori M, Izumi N, Kawashima H, Ozawa H, Ikeda K, Kameda A, Hakeda Y, Kumegawa M** 1998 Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245:419-422
549. **Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor O, Ye C, Brown EM** 2007 The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem Pharmacol* 74:438-447
550. **Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Sanders JL, Brown EM** 2000 Activation of p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinases by extracellular calcium-sensing receptor agonists induces mitogenic responses in the mouse osteoblastic MC3T3-E1 cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 279:363-368
551. **Xu JL, Khor KA, Sui JJ, Zhang JH, Chen WN** 2009 Protein expression profiles in osteoblasts in response to differentially shaped hydroxyapatite nanoparticles. *Biomaterials* 30:5385-5391
552. **Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC** 1999 The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res* 45:311-321
553. **Anada T, Kumagai T, Honda Y, Masuda T, Kamijo R, Kamakura S, Yoshihara N, Kuriyagawa T, Shimauchi H, Suzuki O** 2008 Dose-Dependent Osteogenic Effect of Octacalcium Phosphate on Mouse Bone Marrow Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*
554. **Alliot-Licht B, Gregoire M, Orly I, Menanteau J** 1991 Cellular activity of osteoblasts in the presence of hydroxyapatite: an in vitro experiment. *Biomaterials* 12:752-756
555. **Song JH, Kim JH, Park S, Kang W, Kim HW, Kim HE, Jang JH** 2008 Signaling responses of osteoblast cells to hydroxyapatite: the activation of ERK and SOX9. *J Bone Miner Metab* 26:138-142
556. **Molloy ES, McCarthy GM** 2006 Calcium crystal deposition diseases: update on pathogenesis and manifestations. *Rheum Dis Clin North Am* 32:383-400, vii
557. **Halverson PB, Greene A, Cheung HS** 1998 Intracellular calcium responses to basic calcium phosphate crystals in fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 6:324-329
558. **Sun Y, Zeng XR, Wenger L, Cheung HS** 2003 Basic calcium phosphate crystals stimulate the endocytotic activity of cells--inhibition by anti-calcification agents. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1053-1059
559. **Mitchell PG, Pledger WJ, Cheung HS** 1989 Molecular mechanism of basic calcium phosphate crystal-induced mitogenesis. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 264:14071-14077
560. **Reuben PM, Brogley MA, Sun Y, Cheung HS** 2002 Molecular mechanism of the induction of metalloproteinases 1 and 3 in human fibroblasts by basic calcium phosphate crystals. Role of calcium-dependent protein kinase C alpha. *J Biol Chem* 277:15190-15198
561. **Bai G, Howell DS, Howard GA, Roos BA, Cheung HS** 2001 Basic calcium phosphate crystals up-regulate metalloproteinases but down-regulate tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in human fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 9:416-422
562. **Sallis JD, Cheung HS** 2003 Inhibitors of articular calcium crystal formation. *Curr Opin Rheumatol* 15:321-325

563. Brogley MA, Cruz M, Cheung HS 1999 Basic calcium phosphate crystal induction of collagenase 1 and stromelysin expression is dependent on a p42/44 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Cell Physiol* 180:215-224
564. Molloy ES, McCarthy GM 2006 Basic calcium phosphate crystals: pathways to joint degeneration. *Curr Opin Rheumatol* 18:187-192
565. Pedraza CE, Chien YC, McKee MD 2008 Calcium oxalate crystals in fetal bovine serum: implications for cell culture, phagocytosis and biomineralization studies in vitro. *J Cell Biochem* 103:1379-1393
566. Campos AH, Schor N 2000 Mechanisms involved in calcium oxalate endocytosis by Madin-Darby canine kidney cells. *Braz J Med Biol Res* 33:111-118
567. Prudhommeaux F, Schiltz C, Liote F, Hina A, Champy R, Bucki B, Ortiz-Bravo E, Meunier A, Rey C, Bardin T 1996 Variation in the inflammatory properties of basic calcium phosphate crystals according to crystal type. *Arthritis Rheum* 39:1319-1326
568. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Addadi-Rebbah S, Jallot E, Laurent-Maquin D, Frayssinet P, Guenounou M 2004 MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 25:2515-2524
569. Lieske JC, Norris R, Toback FG 1997 Adhesion of hydroxyapatite crystals to anionic sites on the surface of renal epithelial cells. *Am J Physiol* 273:F224-233
570. Liu-Bryan R, Pritzker K, Firestein GS, Terkeltaub R 2005 TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *J Immunol* 174:5016-5023
571. Scott P, Ma H, Viriyakosol S, Terkeltaub R, Liu-Bryan R 2006 Engagement of CD14 mediates the inflammatory potential of monosodium urate crystals. *J Immunol* 177:6370-6378
572. El-Maadawy S, Kaartinen MT, Schinke T, Murshed M, Karsenty G, McKee MD 2003 Cartilage formation and calcification in arteries of mice lacking matrix Gla protein. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:272-278
573. Farzaneh-Far A, Davies JD, Braam LA, Spronk HM, Proudfoot D, Chan SW, O'Shaughnessy KM, Weissberg PL, Vermeer C, Shanahan CM 2001 A polymorphism of the human matrix gamma-carboxyglutamic acid protein promoter alters binding of an activating protein-1 complex and is associated with altered transcription and serum levels. *J Biol Chem* 276:32466-32473
574. Li X, Giachelli CM 2007 Sodium-dependent phosphate cotransporters and vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 16:325-328
575. Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ 1995 Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem* 270:9420-9428
576. Gopalakrishnan R, Suttamanatwong S, Carlson AE, Franceschi RT 2005 Role of matrix Gla protein in parathyroid hormone inhibition of osteoblast mineralization. *Cells Tissues Organs* 181:166-175
577. Coen G, Ballanti P, Silvestrini G, Mantella D, Manni M, Di Giulio S, Pisano S, Leopizzi M, Di Lullo G, Bonucci E 2009 Immunohistochemical localization and mRNA expression of matrix Gla protein and fetuin-A in bone biopsies of hemodialysis patients. *Virchows Arch* 454:263-271
578. Schurgers LJ, Spronk HM, Skepper JN, Hackeng TM, Shanahan CM, Vermeer C, Weissberg PL, Proudfoot D 2007 Post-translational modifications regulate matrix Gla protein function: importance for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Thromb Haemost* 5:2503-2511

579. **Price PA, Faus SA, Williamson MK** 1998 Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1400-1407
580. **Price PA, Rice JS, Williamson MK** 1994 Conserved phosphorylation of serines in the Ser-X-Glu/Ser(P) sequences of the vitamin K-dependent matrix Gla protein from shark, lamb, rat, cow, and human. *Protein Sci* 3:822-830
581. **Westenfeld R, Schafer C, Kruger T, Haarmann C, Schurgers LJ, Reutelingsperger C, Ivanovski O, Druke T, Massy ZA, Ketteler M, Floege J, Jahnhen-Dechent W** 2009 Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol* 20:1264-1274
582. **Zeboudj AF, Imura M, Bostrom K** 2002 Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 277:4388-4394
583. **Hadfield KD, Rock CF, Inkson CA, Dallas SL, Sudre L, Wallis GA, Boot-Handford RP, Canfield AE** 2008 HtrA1 inhibits mineral deposition by osteoblasts: requirement for the protease and PDZ domains. *J Biol Chem* 283:5928-5938
584. **Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA** 2003 Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo J* 22:6267-6276
585. **van Bezooijen RL, Svensson JP, Eefting D, Visser A, van der Horst G, Karperien M, Quax PH, Vrieling H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Lowik CW** 2007 Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Bone Miner Res* 22:19-28
586. **Terasawa K, Okazaki K, Nishida E** 2003 Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells* 8:263-273
587. **Brown EM, MacLeod RJ** 2001 Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 81:239-297
588. **Spurney RF, Pi M, Flannery P, Quarles LD** 1999 Aluminum is a weak agonist for the calcium-sensing receptor. *Kidney Int* 55:1750-1758
589. **Canaff L, Petit JL, Kisiel M, Watson PH, Gascon-Barre M, Hendy GN** 2001 Extracellular calcium-sensing receptor is expressed in rat hepatocytes. coupling to intracellular calcium mobilization and stimulation of bile flow. *J Biol Chem* 276:4070-4079
590. **Mahamid J, Aichmayer B, Shimoni E, Ziblat R, Li C, Siegel S, Paris O, Fratzl P, Weiner S, Addadi L** Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6316-6321
591. **Conner SD, Schmid SL** 2003 Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44
592. **Suzuki A, Ammann P, Nishiwaki-Yasuda K, Sekiguchi S, Asano S, Nagao S, Kaneko R, Hirabayashi M, Oiso Y, Itoh M, Caverzasio J** Effects of transgenic Pit-1 overexpression on calcium phosphate and bone metabolism. *J Bone Miner Metab* 28:139-148
593. **Miller J, Vaughan-Williams E, Furlong R, Harrison L** 1982 Dental caries and children's weights. *J Epidemiol Community Health* 36:49-52
594. **Magloire H, Bouvier M, Joffre A** 1992 Odontoblast response under carious lesions. *Proc Finn Dent Soc* 88 Suppl 1:257-274
595. **Magloire H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC** 2001 Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res* 15:46-50

596. **Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J** 2000 The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med* 11:481-495
597. **Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J** 2005 Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res* 321:391-400
598. **Larmas M** 2001 Odontoblast function seen as the response of dentinal tissue to dental caries. *Adv Dent Res* 15:68-71
599. **Zhao D, Vaziri Sani F, Nilsson J, Rodenburg M, Stocking C, Linde A, Gritli-Linde A** 2006 Expression of Pit2 sodium-phosphate cotransporter during murine odontogenesis is developmentally regulated. *Eur J Oral Sci* 114:517-523
600. **Lundquist P, Ritchie HH, Moore K, Lundgren T, Linde A** 2002 Phosphate and calcium uptake by rat odontoblast-like MRPC-1 cells concomitant with mineralization. *J Bone Miner Res* 17:1801-1813
601. **Terezhalmay GT, Safadi TJ, Longworth DL, Muehrcke DD** 1997 Oral disease burden in patients undergoing prosthetic heart valve implantation. *Ann Thorac Surg* 63:402-404
602. **Friedlander AH, Sung EC, Chung EM, Garrett NR** Radiographic quantification of chronic dental infection and its relationship to the atherosclerotic process in the carotid arteries. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:615-621
603. **Muller J, Bruckner G, Horz W** 1991 [In vitro culture of pulp cells]. *Dtsch Stomatol* 41:161-165
604. **Tatsumi S, Segawa H, Morita K, Haga H, Kouda T, Yamamoto H, Inoue Y, Nii T, Katai K, Taketani Y, Miyamoto KI, Takeda E** 1998 Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology* 139:1692-1699
605. **Mitsiadis TA, De Bari C, About I** 2008 Apoptosis in developmental and repair-related human tooth remodeling: a view from the inside. *Exp Cell Res* 314:869-877

Abstract

Inorganic phosphate (Pi) acts as a signalling molecule in skeletal cells, affecting cell functions and gene expression. With respect to the presence of elevated extracellular calcium and phosphate levels during bone remodelling or carious processes, we questioned whether calcium may play a role in the differentiation of osteoblasts and odontoblasts. In a first part, as evidenced by real-time PCR and Western blot, we show that Pi stimulates the matrix gla protein (MGP) expression in osteoblasts through the ERK1/2-Fra-1 pathway. We next show that calcium is required in these effects of Pi and that the formation of calcium phosphate precipitates might also be involved in these events. In a second part, we showed that Pi stimulates the type III sodium dependant phosphate transporters in odontoblasts through the ERK1/2 pathway and that Pi is involved in the apoptosis of these cells. These data highlight the importance of Pi in the differentiation of skeletal cells that are localized in a phosphate-rich environment.

Key words

inorganic phosphate, calcium, calcium-phosphate precipitates, skeletal cells, differentiation, ERK1/2, matrix gla protein, type III phosphate transporters

Solmaz Khoshniat

Thèse : Doctorat d'Université, Nantes (2010)

Résumé

L'importance du phosphate inorganique (Pi) est soulignée par les pathologies qui découlent d'un dérèglement de son homéostasie. Ainsi l'hypophosphatémie entraîne rachitisme et ostéomalacie tandis que l'hyperphosphatémie provoque des calcifications vasculaires. Suite à la dissolution des cristaux d'apatites de l'os lors de la résorption osseuse ou de la dentine au cours de processus carieux par exemple, les ostéoblastes (OB) et les odontoblastes (OD) se trouvent dans un environnement riche en Pi et en calcium (Ca). Dans ce contexte, le rôle du Pi dans la différenciation de ces cellules a été étudié. Dans une première partie, nous avons montré que le Pi stimule l'expression de la Protéine Gla Matricielle (MGP) via la voie ERK1/2-Fra-1 dans les OB et que le Ca est impliqué dans les effets du Pi. Les précipités de phosphate de Ca (CaPp), se formant par précipitation de Pi et de Ca, joueraient également un rôle dans la stimulation de l'expression des gènes. Au vu du rôle de la MGP en tant qu'inhibiteur de la minéralisation et des CaPp à la base des cristaux d'apatites, les données de ces études contribuent à une meilleure connaissance du rôle du Pi dans la formation osseuse et les processus de calcification. Dans une deuxième partie, nous avons montré que le Pi stimule l'expression de ses transporteurs PiT-1 et PiT-2 via la voie ERK1/2 et qu'il provoque l'apoptose des OD. Ces données contribuent à améliorer la connaissance du rôle du Pi dans les OD au cours de pathologies conduisant à une libération de Pi dans l'environnement. De façon générale, notre étude souligne l'importance du Pi dans la différenciation des cellules squelettiques qui sont en permanence au contact du Pi.

Mots clefs

phosphate inorganique, calcium, précipités de phosphate de calcium, cellules squelettiques, différenciation, ERK1/2, protéine gla matricielle, transporteurs de phosphate de type III

Laboratoire

UMR S/INSERM U791, LIAOD, Laboratoire d'Ingénierie des tissus Ostéo-Articulaires et Dentaires ; Groupe STEP « Skeletal Tissue Engineering and Physiopathology », 1 Place Alexis Ricordeau, 44 042 Nantes Cedex 1, France.