HAL
open science

Contribution du gène "Ank" dans la balance PPi/Pi et dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire

Frédéric Cailotto

To cite this version:

Frédéric Cailotto. Contribution du gène "Ank" dans la balance PPi/Pi et dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10114 . tel-01748300

HAL Id: tel-01748300

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748300v1

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

UFR de Médecine

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : Ingénierie cellulaire et tissulaire

par **Frédéric CAILOTTO**

« Contribution du gène *Ank* dans la balance PPi/Pi et dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire »

Soutenue le 06/11/2009

Membres du jury :

Rapporteurs :

Monsieur le Professeur **Frédéric LIOTÉ**	PU-PH UMR 606 INSERM, Paris
Monsieur le Professeur **Jérôme GUICHEUX**	DR2 UMR 791 INSERM, Nantes

Examinateurs :

Monsieur le Professeur **Yves HENROTIN**	PU Université de Liège
Monsieur le Professeur **Patrick NETTER**	PU-PH UMR7561, directeur de Thèse
Monsieur le Docteur **Arnaud BIANCHI**	IR CNRS UMR7561, co-directeur de Thèse
Monsieur le Professeur **Jean-Yves JOUZEAU**	PU-PH UMR7561, Nancy

---

Travail effectué au sein de l'UMR 7561 Nancy Université-CNRS « Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires »

Je tiens à remercier Monsieur le professeur Patrick NETTER, qui m'a permis de réaliser cette thèse dans son laboratoire. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour avoir été mon directeur de thèse durant ces quatre années.

Je remercie tout spécialement Monsieur le docteur Arnaud « Nono » BIANCHI, pour toute l'aide, scientifique et humaine, qu'il m'a apporté, que ce soit pendant mon DEA, pour l'obtention de ma bourse de thèse, pour l'obtention de vacations d'enseignement, et plus généralement durant toute ma thèse. Il m'a laissé énormément d'indépendance sur tous les aspects de la « vie » d'un projet de recherche, ce qui a été très formateur. Nono, je sais tout ce que je te dois, et je tiens particulièrement à le rappeler ici.

Je remercie également le Professeur Jean-Yves JOUZEAU, pour le temps, et plus souvent les fins de (longues) journées qu'il a bien voulu me consacrer. Ses précieux conseils et sons sens critique ont été très utiles pour l'aboutissement de ces travaux, ainsi que dans la rédaction des articles scientifiques. Je lui témoigne ici ma reconnaissance, pour son sens de la rigueur scientifique, mais également pour nos discussions « non scientifiques », toujours agréables !

Je remercie Messieurs les Professeurs Frédéric LIOTÉ et Jérôme GUICHEUX de l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant de d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Ils prennent une partie de leur temps pour évaluer ce travail et je leur en suis reconnaissant.

Je suis également très honoré que le Professeur Yves HENROTIN ait accepté d'être examinateur de cette thèse, se déplaçant ainsi de Belgique pour l'occasion. Je l'en remercie tout particulièrement.

Je tiens à dire un grand merci à Madame Sylvie SEBILLAUD, pour le temps qu'elle a consacré à ce sujet de thèse. Sa bonne humeur constante, sa rigueur scientifique et ses compétences ont été des éléments clés au cours de ma thèse. Merci encore de m'avoir supporté durant ces quatre ans, et je te suis sincèrement reconnaissant de toute l'aide que tu m'as apporté.

Un grand merci à Madame le Docteur Armelle ROPARS. Merci Armelle de m'avoir enseigné la rigueur scientifique et le sens de l'organisation dans un projet scientifique. Ton savoir faire technique, ta bonne humeur et tes connaissances sur de nombreux domaines, scientifiques et non-scientifiques, m'ont permis de passer une excellente année de DEA, pendant laquelle j'ai beaucoup appris. Merci encore pour tout.

Je remercie le docteur David MOULIN, pour son aide scientifique et sa sympathie. Merci à toi, pour tous les bons moments, surtout ceux passés à élaborer des expériences du domaine de la chimie-physique, plus particulièrement celles portant sur l'intérêt et l'utilisation de l'azote liquide dans le domaine de l'aéronautique légère.

Merci également à Valérie OLIVE et Meriem KOUFANY pour votre soutien et votre bonne humeur au travail. Merci aussi pour tous les moments passés ensemble. Valérie, je te remercie pour les nombreux délires qui m'ont bien fait décompresser pendant les pauses association de médecine !

Je remercie le docteur Jean-Baptiste VINCOURT pour nos pauses, nos discussions, ses conseils scientifiques, son esprit de contradiction, les parties d'échecs...Ton soutien m'a été précieux, tout particulièrement au cours de ma dernière année de thèse. Trouve ici le témoignage de mon amitié.

Merci à Joseph PAQUET pour son soutien et sa sympathie. Des supers instants passés en ta compagnie, des bonnes soirées footballistiques...des bons moments tout court en fait ! Mention spécial aux parties d'Uno et aux idées supra-puissantes, éléments moteurs de nos conversations.

Je remercie également mon « frère d'armes », mon « tag-team partner » Mosellan, le dénommé Hervé ZILLE. Merci encore mon gars pour m'aider à convaincre toutes les personnes que nous rencontrons, et celles que nous rencontrerons dans l'avenir, que Metz est une plus belle ville que Nancy, le concept « 5-7 4 life », etc...Tu connais aussi bien que moi nos arguments !

Merci à Pierre-Jean « Le Gros » FRANCIN. Merci encore, t'as vu !? Grâce à toi on a réussi à maîtriser BBL le Grand, tu vois !? Respect à toi, Big Up !

Je remercie les professeurs Henri SCHROEDER et Didier DESOR pour m'avoir permis d'effectuer toutes ces vacations d'enseignement, de m'avoir permis d'avoir un aperçu du métier d'enseignant-chercheur.

Merci aux docteurs François DUPUIS, Caroline PERRIN-SARRADO, Gabriel TROCKLÉ et au professeur Isabelle LARTAUD pour leurs conseils durant mon année d'ATER à la faculté de pharmacie. Merci pour le temps que vous m'avez consacré.

Merci à tout le personnel du laboratoire de pharmacologie, physiopathologie et ingénieries articulaires. Merci pour tous les moments passés avec vous. Vous avez contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse, que ce soit dans le travail ou dans les moments de détente.

Je remercie particulièrement Jean-Baptiste FOURMANN. Merci à toi J-B, pour les longues discussions que nous avons eu, ton soutien indéfectible, ton écoute et ta patience. Nous avons passé la quasi-intégralité de notre cursus de faculté ensemble, et tu as été là dans tous les coups durs. Je voulais te dire encore merci, pour ton amitié, tout simplement.

Je remercie également mes amis Matthieu, Débo et Hakim, Ken, Zozo et Charlotte, Amélie P., Nico et Carole, Djé, « Le Doc » et Floriane, Pauline, Joffrey et Catherine, Amélie C.... et tous les autres !

A mes parents,
Sonia et Bruno

A mes grands-parents,
Giorgio, Clelia, Antoinette et Nazzareno

A mon frère,
Anthony

pour votre amour et votre soutien permanent.

A toute ma famille.

A tous mes amis.

A « Svetlana »,
pour les très bons moments passés, présents et à venir...

Je dédie ce travail de thèse

PREAMBULE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL **16**

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **19**

I. LE GENE ANK 20
I.A. Historique de la découverte du gène *20*
I.B. Structure et fonction de la protéine ANK *21*
II. CONTRIBUTION DU GENE ANK DANS LA REGULATION DE LA BALANCE PPI (PYROPHOSPHATE INORGANIQUE)/PI (PHOSPHATE INORGANIQUE) DU CHONDROCYTE ARTICULAIRE 25
II.A. Les acteurs de la balance PPi/Pi dans le chondrocyte articulaire *26*
II.A.1. Les ecto-nucléotide pyrophosphatases/phosphodiestérases (NPP) *26*
II.A.2. La phosphatase alcaline tissu non-spécifique (TNAP) *27*
II.A.3. Les transporteurs de phosphate inorganique (PiT) *28*
II.A.4. Le transporteur de pyrophosphate inorganique ANK *28*
II.B. Les dysfonctionnements d'ANK entraînent l'apparition d'arthropathies microcristallines *30*
II.B.1. Le rhumatisme à apatite *31*
II.B.2. La chondrocalcinose articulaire (CCA) *35*
II.B.2.a. Revue sur les formes familiales de CCA : article 1 ..... *41*
II.B.2.b. Les formes sporadiques de CCA *48*
II.B.2.c. Les formes secondaires de CCA *51*
III. CONTRIBUTION DU GENE ANK DANS LA REGULATION DU PHENOTYPE CELLULAIRE. 52
III.A. Influence d'Ank sur le phénotype des érythrocytes *53*
III.B. Influence d'Ank sur le phénotype des ostéoblastes *54*
III.C. Influence d'Ank sur le phénotype des chondrocytes *57*

CHAPITRE 2 : RESULTATS **61**

I. CONTRIBUTION DU GENE ANK DANS LA BALANCE PPI/PI DU CHONDROCYTE ARTICULAIRE STIMULE PAR LE TGF-B1 62
I.A. Article 2 : "Inorganic pyrophosphate generation by TGF-β1 is mainly dependent on ANK induction by Ras/Raf-1/ERK pathways in chondrocyte." *62*
I.A.1. Objectifs du travail *62*
I.A.2. Article *62*
I.A.3. Conclusions *76*
I.B. Résultats complémentaires *79*
II. CONTRIBUTION DU GENE ANK DANS LE MAINTIEN DU PHENOTYPE DU CHONDROCYTE ARTICULAIRE 82
II.A. Article 3 : "The inorganic pyrophosphate transporter ANK preserves the differentiated phenotype of articular chondrocyte." *82*
II.A.1. Objectifs du travail *82*
II.A.2. Article *82*
II.A.3. Conclusions *105*
III. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE CALCIUM SUR LA PRODUCTION D'EPPI : ROLE DU GENE ANK DANS UN CONTEXTE DE CCA SECONDAIRE. 108
III.A. Objectifs de travail *108*
III.B. Résultats *110*
III.C. Discussion et perspectives *119*

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES **121**

Liste des publications dans la thématique de la thèse

Chondrocalcinoses articulaires familiales: nouvelles approches physiopathologiques.
CAILOTTO F., BIANCHI A., SEBILLAUD S., GILLET P., LOEUILLE D., JOUZEAU J-Y., NETTER P. *Revue du Rhumatisme*, 2007; **74** : 177-182.

Inorganic pyrophosphate generation by TGF-beta1 is mainly dependent on ANK induction by Ras/Raf-1/ERK pathways in chondrocytes.
CAILOTTO F., BIANCHI A., SEBILLAUD S., MOULIN D., VENKATESAN N., JOUZEAU J-Y., NETTER P. *Arthritis Research & Therapy,* 2007, **9** : R122.

The inorganic pyrophosphate transporter preserves the differentiated phenotype of articular chondrocyte.
CAILOTTO F., SEBILLAUD S., NETTER P., JOUZEAU J-Y., BIANCHI A. *The Journal of Biological Chemistry*, en revision.

Influence of calcium level on the effect of Transforming Growth Factor-beta1 in the generation of inorganic pyrophosphate by articular chondrocyte.
CAILOTTO F., SEBILLAUD S., NETTER P., JOUZEAU J-Y., BIANCHI A.
En préparation

Communications avec actes publiés

Implication of Ankh expression and ePPi/ePi ratio in chondrocyte phenotype sustain.
CAILOTTO F., BIANCHI A., SEBILLAUD S., JOUZEAU J-Y., NETTER P. American College of Rheumatology/Association of Rheumatology Health Professionals (ACR/ARHP) Annual Scientific Meeting, Washington (DC), 2006. *Arthritis & Rheumatism*, 2006, **54**(9), 1608, S648.

Inorganic pyrophosphate generation by TGF-β1 is mainly dependent on ANK induction by Ras/Raf-1/ERK pathways in chondrocytes.

CAILOTTO F., BIANCHI A., SEBILLAUD S., MOULIN D., JOUZEAU J-Y., NETTER P. Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress on osteoarthritis, Ft. Lauderdale (FL), 2007. *Osteoarthritis & cartilage*, 2007, **15**(C), 167, C100-101.

Implication of the inorganic pyrophosphate transporter ANK in articular chondrocyte phenotype sustain.

CAILOTTO F., SEBILLAUD S., MOULIN D., JOUZEAU J-Y., NETTER P., BIANCHI A. Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress on osteoarthritis, Roma, Italy, 2008. *Osteoarthritis & cartilage*, 2008, **16**(Suppl. 4), 238, S110.

Implication of the inorganic pyrophosphate transporter ANK in articular chondrocyte phenotype maintenance.

CAILOTTO F., SEBILLAUD S., MOULIN D., JOUZEAU J-Y., NETTER P., BIANCHI A. Young Scientist Forum – FEBS congress, Prague, Czech Republic, 2009. *FEBS J.*, 2009, **276**(Suppl. 1), YSF-11, 360.

Influence of calcium level on the effect of TGF-β1 in the generation of inorganic pyrophosphate by articular chondrocyte.

CAILOTTO F., SEBILLAUD S., NETTER P., JOUZEAU J-Y., BIANCHI A. Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress on osteoarthritis, Montreal, Canada, 2009.

Implication of inorganic pyrophosphate and its transporter ANK in the maintenance of articular chondrocyte phenotype. Role of Wnt-5a

CAILOTTO F., SEBILLAUD S., MOULIN D., NETTER P., JOUZEAU J-Y., BIANCHI A. Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress on osteoarthritis, Montreal, Canada, 2009.

Communications orales sans acte publié

Rôle du gène *Ank* dans la physiopathologie des chondrocalcinoses et la régulation du phénotype chondrocytaire

F. CAILOTTO, S. SEBILLAUD, A. BIANCHI, J-Y. JOUZEAU et P. NETTER

Conférence invitée au laboratoire « Os et articulation » INSERM - UMR-S 606, Paris, Avril 2008.

Contribution du transporteur de pyrophosphate inorganique ANK au maintien du phénotype du chondrocyte articulaire

F. CAILOTTO, S. SEBILLAUD, J-Y. JOUZEAU, A. BIANCHI et P. NETTER

4ème Journées de la Recherche « Claude Huriet », Nancy, Decembre 2008. Prix de la meilleure communication orale de recherche expérimentale.

Les chondrocalcinosis articulaires : rôle du gène *Ank*

F. CAILOTTO, S. SEBILLAUD, J-Y. JOUZEAU, A. BIANCHI et P. NETTER

54ème Semaine de Rhumatologie, Aix-les-Bains, Avril 2009

Le transporteur de pyrophosphate inorganique ANK préserve le phénotype différencié du chondrocyte articulaire

F. CAILOTTO, S. SEBILLAUD, J-Y. JOUZEAU, A. BIANCHI et P. NETTER

Congrès annuel de la SFBBM (Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire), Nancy, Août 2009

Liste des figures

Figure 1 : Alignement des séquences humaine, de rat et de souris de la protéine ANK (réalisé avec les logiciels Multalin et ESPript 2.2) 21

Figure 2 : Organisation spatiale de la protéine ANK (d'après Nurnberg *et al.,* 2001) 22

Figure 3 : Métabolisme du pyrophosphate inorganique (PPi) et du phosphate inorganique (Pi) dans le chondrocyte 28

Figure 4 : La balance PPi/Pi est fortement tributaire de l'activité d'ANK 29

Figure 5 : Aspect de cristaux d'hydroxyapatite en microscopie optique (X 10) après coloration au rouge Alizarine (Gerster JC, 2007) 31

Figure 6 : Radiographie du métatarse montrant d'importantes calcifications périarticulaires de l'hallux par des cristaux basiques de phosphate de calcium (Gerster JC, 2007) 31

Figure 7 : Effet des cristaux basiques de phosphate de calcium (BPC) sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes 33

Figure 8 : Les trois différentes formes de chondrocalcinose articulaire 34

Figure 9 : Aspect de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté en microscopie électronique à balayage (X 10000) (Faure G *et al.,* 1981) 35

Figure 10 : Radiographie du bassin montrant l'opacification anormale de la symphyse pubienne (flèches blanches) due à la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté 35

Figure 11 : Effet des cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD) sur les monocytes et les neutrophiles 37

Figure 12 : Effet des cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD) sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes 39

Figure 13 : Principales voies de signalisation Smad-dépendantes et Smad-indépendantes activées par le TGF-β1 dans le chondrocyte 49

Figure 14 : Activation de la voie « canonique » et « non-canonique » par les protéines Wnt 58

Figure 15: La production d'ePPi par les chondrocytes stimulés avec le TGF-β1 dépend principalement de l'induction d'ANK par la voie Ras/Raf-1/ERK 1/2 77

Figure 16 : Impact d'une invalidation individuelle ou conjointe d'*Ank* et *PC-1* sur la génération d'ePPi stimulée par le TGF-β1 78

Figure 17 : Etude des voies de signalisation impliquées dans l'expression de l'ARNm de PC-1 stimulée par le TGF-β1 80

Figure 18 : L'ePPi et son transporteur ANK préservent le phénotype du chondrocyte articulaire en exerçant un contrôle négatif sur l'expression de Wnt-5a 106

Figure 19 : Analyse *in silico* du promoteur du gène *Ank* (réalisée avec le logiciel TFSearch v1.3)..... 108

Figure 20 : Influence de la concentration d'eCa^{2+} sur les effets inducteurs du TGF-β1..... 109-110

Figure 21 : Impact des inhibiteurs de canaux calciques sur les effets inducteurs du TGF-β1 111-112

Figure 22 : Impact d'une modulation des niveaux d'iCa^{2+} sur les effets inducteurs du TGF-β1 113-114

Figure 23 : Influence du facteur de transcription Sp1 sur les effets inducteurs du TGF-β1 115-116

Figure 24 : Les effets inducteurs du TGF-β1 sur la production d'ePPi dépendent des concentrations d'eCa^{2+} et d'iCa^{2+} 117

Liste des abréviations

5'UTR ..... région 5' transcrite non traduite
AA ..... Acide Arachdonique
ABC ..... ATP Binding Cassette
ADN ..... Acide DésoxyriboNucléique
ADP ..... adénosine diphosphate
AMP ..... Adénosine MonoPhosphate
ANOVA ..... ANalysis Of VAriance
AP-1 ..... Activator Protein-1
APC ..... Adenomatous Polyposis Coli
ARN/RNA ..... Acide RiboNucléique
ARNm ..... ARN messager
ASC ..... Apoptosis-associated Speck-Like protein containing a CARD
ATP ..... Adénosine TriPhosphate
BAC ..... Chromosome Artificiel Bactérien
BMSC ..... Cellules Stromales de la Moelle osseuse
BPC ..... Basique de Phosphate de Calcium
CamKII ..... Ca^{2+}/Calmodulin-dependent kinase II
CARD ..... Caspase Recruitment Domain
CaSR ..... Calcium-Sensing Receptor
CCA ..... ChondroCalcinose Articulaire
COX ..... CycloOXygénase
CREB ..... Cyclic AMP Response Element-Binding protein
DSH ..... Dishevelled
eCa^{2+} ..... calcium extracellulaire
EPO ..... Erythropoïétine
EPO-R ..... Récepteur à l'EPO
ePPi ..... PPi extracellulaire
ERK ..... MAPK Extracellular signal-Regulated Kinase
EST ..... Expressed Sequence Tags
Frz ..... Frizzled
$GdCl_3$ ..... Chlorure de Gadolinium

GSK ..... Glycogen Synthase Kinase
HA ..... HydroxyApatite
HIF ..... Hypoxia inducible factor
iCa^{2+} ..... calcium intracellulaire
IGF ..... Insulin Growth Factor
IKK-2 ..... IκB kinase-2
IL ..... Interleukine
iNOS ..... Nitric Oxyde Synthase inductible
IP_3 ..... Inositol-1, 4, 5-triPhosphate
iPPi ..... PPi intracellulaire
IRAK-1 ..... IL-1Receptor-associated kinase-1
JAK ..... Janus Kinase
JNK ..... c-Jun N-terminal Kinase
kDa ..... kiloDalton
LRP ..... LipoProtein-related Receptor
LTB4 ..... LeucoTriène B4
MAPK ..... Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC ..... Matrice ExtraCellulaire
MEK ..... MAPK/ERK Kinase
MMP ..... MetalloProtéase Matricielle
MSC ..... Cellules Souches Mésenchymateuses
MyD88 ..... Myeloid differentiation primary response gene 88
MZF ..... Myeloid Zinc Finger
NALP ..... NACHT-, LRR-, and pyrin-domain-containing protein
NFκB ..... Nuclear Factor-κB
$NiCl_2$ ..... Chlorure de Nickel
NO ..... monoxyde d'azote
NPP ..... ecto-Nucléotide Pyrophosphatase/Phosphodiestérase
NTP ..... Nucléotide TriPhosphate
ORF ..... Open Reading Frame
p70S6K ..... p70 ribosomal protein S6 Kinase
PC-1 ..... Plasma Cell membrane glycoprotein-1
PCR ..... Polymerase Chain Reaction
$PG(E_2)$ ..... ProstaGlandine(E_2)

PGES ..... PGE synthase
Pi ..... Phosphate inorganique
PI3K ..... Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
PiT ..... Transporteur de Pi
PKA ..... Protein Kinase A
PKB ..... Protein Kinase B
PKC ..... Protein Kinase C
PLA_2 ..... Phospholipase A2
PLC ..... PhosphoLipase C
PLD ..... PhosphoLipase D
PLM ..... PhosphoLipide Membranaire
PPCD ..... PyroPhosphate de Calcium Dihydraté
PPi ..... PyroPhosphate inorganique
REL ..... Réticulum Endoplasmique Lisse
R-Smad protéines ..... Smad associées aux Récepteurs
RT-PCR ..... Reverse Transcription-PCR
SARA ..... Smad-Anchor for Receptor Activation
SERCA ..... Sarco/EndoplasmicReticulum Ca^{2+} ATPase
shRNA ..... short hairpin RNA
siRNA ..... small interference RNA
Sp1 ..... Specific protein 1
STAT ..... Signal Transducers and Activators of Transcirption
TCF/LEF ..... T Cell-specific transcription Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor
TGFR ..... TGF receptor
TGF ..... Transforming Growth Factor
TIMP ..... Tissue Inhibitor of MMP
TLR ..... Toll-like receptors
TNAP ..... Phosphatase Alcaline Tissu Non-spécifique
TRAF-6 ..... TNF receptor-associated factor-6
TNF ..... Tumor Necrosis Factor
VOC ..... canal calcique voltage-dépendant
VSMC ..... Cellules Musculaires lisses Vasculaires
Wnt ..... Wingless and Integration site

PREAMBULE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les chondrocalcinoses articulaires (CCA) sont des arthropathies microcristallines se caractérisant par la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydratés (PPCD) au sein du liquide synovial, du cartilage et des tissus périarticulaires (Netter *et al.*, 2001). Ces microcristaux engendrent de fortes poussées inflammatoires, conjointes à des phénomènes de destruction du cartilage articulaire (Liu-Bryan et Liote, 2005). Une forme familiale de cette pathologie a été mise en évidence en 1957 (Zitnan et Sitaj, 1957), et a par la suite été liée sur le plan génétique à un locus situé dans le bras court du chromosome 5 baptisée CCAL2 (Hughes *et al.*, 1995 ; Andrew *et al.*, 1999 ; Rojas *et al.*, 1999).

Le gène *Ank*, qui code un transporteur exprimé dans la plupart des tissus de l'organisme et dont la fonction est d'exporter le pyrophosphate inorganique (PPi) hors des cellules, a été mis en évidence à partir de travaux portant sur une lignée de souris présentant un phénotype d'ankylose progressive (Ho *et al.*, 2000). Ces analyses ont ainsi pu corréler une mutation de ce gène avec le phénotype de ces souris, mutation présente sur une région du chromosome 15 murin très analogue au locus CCAL2 humain responsable des formes de CCA familiales. Les travaux de Williams et Pendleton ont clairement établi un lien entre des mutations « gain de fonction » dans la séquence codante du gène *Ank* situé dans le locus CCAL2 et les formes familiales de la pathologie (Pendleton *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2002). Il existe également des formes sporadiques de CCA indépendantes des mutations décrites dans la littérature. Bien qu'elles aient été corrélées avec des mutations du promoteur du gène *Ank* (Zhang *et al.*, 2005), leur fréquence très élevée, qui augmente avec l'âge des patients atteints de la maladie (Ryan et McCarty, 1997), laisse présager une étiologie indépendante des facteurs génétiques. Par ailleurs, le Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) stimule la production de PPi par les chondrocytes articulaires de manière plus importante lorsque ces cellules proviennent de patients plus âgés comparativement à des personnes plus jeunes (Rosen *et al.*, 1997). Ce facteur de croissance est également capable d'induire l'expression de l'ARNm d'Ank (Hirose *et al.*, 2002), mais les mécanismes moléculaires impliqués restent à ce jour non-élucidés. Au vu de ces éléments, il nous a paru intéressant d'étudier les mécanismes de régulation du gène *Ank* par le TGF-β1, qui pourraient permettre de mieux appréhender l'apparition de cristaux de PPCD lors des CCA sporadiques. En plus des CCA sporadiques, il existe une troisième forme de CCA : les CCA secondaires à d'autres pathologies. Parmi ces formes se trouvent des CCA associées aux hyperparathyroïdies primaires (Rynes et Merzig, 1978). Même si l'hypercalcémie chronique accompagnant l'hyperparathyroïdie primaire n'a jamais été corrélée de manière significative avec la prévalence de la CCA (McGill *et al.*, 1984), le composition chimique des PPCD, qui

inclue le calcium, suggère un rôle important de cet ion sur formation de ces microcristaux. En considérant ces éléments, et connaissant le rôle d'*Ank* dans l'export de l'ePPi, il nous a semblé important d'analyser l'influence de la concentration de calcium sur l'expression de ce gène et la production d'ePPi.

Tout comme les arthropathies microcristallines, l'arthrose se caractérise également par une dégénérescence du cartilage articulaire. Un autre phénomène se produit lors de la mise en place de cette pathologie : il s'agit de la dédifférenciation, autrement dit la perte des marqueurs spécifiques du phénotype des chondrocytes articulaires (Aigner *et al.*, 2007). Habituellement, ce dernier est défini par un niveau d'expression élevé de gènes spécifiques codant la matrice extracellulaire (agrécane, collagène de type II) ou codant des régulateurs de l'expression des ces molécules (Sox-9). (Zhao *et al.*, 1997 ; Goldring, 2006). Il est clairement établi que la famille des protéines Wingless and Integration site (Wnt) est impliquée dans les phénomènes d'arthroses, puisque leur expression est augmentée dans le cartilage de patients atteints de cette pathologie (Nakamura *et al.*, 2005 ; Dell'accio *et al.*, 2008). L'interleukine-1β (IL-1β), principale cytokine induisant la dégradation du tissu cartilagineux (Martel-Pelletier *et al.*, 1999), est également décrite comme étant à la fois capable d'induire l'expression de certaines Wnt (Ryu et Chun, 2006), mais également comme pouvant inhiber la production de PPi par les chondrocytes articulaires (Lotz *et al.*, 1995). Au vu du rôle d'ANK dans l'export de PPi, du fait de l'association fréquente des cristaux de PPCD avec l'arthrose (Cheung, 2005) et de la régulation fine du niveau d'expression d'*Ank* lors de la chondrogenèse (Johnson *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2008), nous avons voulu étudier l'implication éventuelle d'*Ank* dans des phénomènes de perte du phénotype du chondrocyte articulaire similaires aux processus se produisant lors de l'arthrose.

Il sera présenté dans le premier chapitre un rappel bibliographique concernant le gène *Ank*, et plus précisément de la place d'Ank dans la régulation de la balance PPi/phosphate inorganique (Pi) du chondrocyte articulaire, pour finir par rappeler la contribution d'Ank dans la régulation du phénotype cellulaire. Dans le deuxième chapitre seront exposés les résultats obtenus au cours de cette thèse. Enfin, il sera proposé dans le troisième chapitre une discussion plus générale sur le sujet ainsi que les perspectives ouvertes par ce travail.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le gène *Ank*

I.A. Historique de la découverte du gène

C'est en 1981 qu'ont été publiés les travaux mettant en évidence chez le souris *mus musculus* une mutation récessive dans les tissus squelettiques (os et cartilage), responsable d'atteintes articulaires (Sweet et Green, 1981). Au vu du phénotype d'ankylose progressive présenté par les souris porteuses de la mutation, les auteurs lui ont donné le nom « *ank* ». Cette étude a permis de mettre en évidence une hyperplasie des cellules et des tissus articulaires, couplée à une dégénérescence des ligaments et des tendons, ainsi qu'une calcification plus importante des différentes zones du cartilage. Cette diminution de mobilité articulaire, qui se manifeste primitivement pour l'articulation tibio-tarsienne, s'aggrave au fur et à mesure du temps, et finit par s'étendre aux autres articulations. Le squelette axial est finalement atteint lui aussi, aboutissant à une rigidité complète et à la mort de l'animal aux alentours de l'âge de 6 mois.

D'autres travaux ont plus précisément décrit le phénotype de ces souris quelques années plus tard, en se focalisant sur deux points : d'une part, la présence de très nombreux cristaux d'hydroxyapatite au sein des articulations, et d'autre part, une composante inflammatoire importante dans le phénotype des souris *ank/ank*, que les auteurs vont alors qualifier de bon modèle d'étude des arthropathies microcristallines (Hakim *et al.*, 1984). D'autres manifestations histologiques ont également été décrites chez les souris *ank/ank,* telles que le rétrécissement des interlignes articulaires, l'érosion du cartilage articulaire, ainsi que l'apparition d'ostéophytes (Hakim *et al.*, 1984 ; Sampson, 1988a ; Sampson, 1988b). Ces phénomènes provoquent une fusion des pièces articulaires, cause de l'ankylose progressive décrite chez ces souris.

L'analyse de liaison génétique réalisée dans l'étude de 1981 avait permis d'établir une carte génétique situant la mutation responsable du phénotype des souris *ank/ank* sur le chromosome 15 (Sweet et Green, 1981). Il a fallu attendre près de 20 ans et les travaux de l'équipe de David Kingsley pour obtenir une analyse génétique fine du locus « *ank* », qui constituent plus globalement l'étude princeps de la fonction du gène *Ank*. En effet, des croisements entre les souris *ank/ank* et des souris ne portant pas la mutation permirent d'identifier les deux marqueurs microsatellites *D15Mit251* et *D15Mit55*, entourant la mutation *ank* à moins de 0,06 centimorgan (Ho *et al.*, 2000). L'utilisation de la technique de marche sur le chromosome a permis de reconstituer la carte chromosomique de la région

« *ank* » et ainsi d'établir, à travers l'isolement de 8 clones (numérotés A à H) dans un système de chromosome artificiel bactérien (BAC), un intervalle candidat de 400 kb environ. Afin d'affiner l'intervalle candidat, les différents clones BAC ont été micro-injectés dans des oocytes de souris FVB/N ayant un phénotype sauvage, croisées alors avec des souris *ank/ank*. Au final, seules les lignées descendant des souris ayant reçu le clone BAC C ne présentaient pas d'ankylose progressive caractéristique, suggérant ainsi que le phénotype provenait d'un gène contenu dans la séquence de ce clone BAC, réduisant la taille de l'intervalle candidat à 190 kb environ.

Par la méthode de séquençage « shotgun », Ho et ses collaborateurs ont mis en évidence 11 marqueurs de séquence exprimée (EST, expressed sequence tags). Des méthodes de séquençage plus fines permirent la découverte d'une substitution de G en T chez les souris *ank/ank* au sein de l'un de ces EST. Cette modification fut alors caractérisée comme étant une mutation non-sens pour un cadre ouvert de lecture (ORF, open reading frame) codant une protéine : la protéine ANK.

I.B. Structure et fonction de la protéine ANK

La séquence codante du gène *Ank* de la souris *mus musculus* est constituée de 1479 nucléotides répartis en 12 exons. Cette séquence, très conservée dans l'évolution chez tous les animaux vertébrés (*Danio rerio, rattus norvegicus, homo sapiens…*), est traduite en une protéine de 492 acides aminés, d'une masse moléculaire d'environ 54,3 kilodaltons (kDa), ayant un point isoélectrique de 8,01. La figure 1 est un exemple d'alignement de séquences d'ANK, ici pour l'Homme, le rat et la souris, montrant une très forte homologie entre les différentes espèces. En effet, comparativement à la séquence de souris, sur 492 acides aminés, seuls 8 sont différents pour la séquence humaine (98,4 % d'homologie), contre 3 uniquement pour la séquence de rat (99,4 % d'homologie). La forte conservation de la séquence protéique chez tous les vertébrés est un élément en faveur d'un gain évolutif pour leur physiologie comparativement aux invertébrés pour lesquels il n'existe aucun homologue d'ANK.

L'utilisation des techniques de Northern blot et d'hybridation *in situ* a permis aux auteurs de démonter que l'ARNm d'Ank était présent dans de très nombreux tissus, tels que le foie, le cœur, les poumons, le cerveau, le tissu musculaire, le rein, la rate, ainsi que le tissu osseux et la cartilage (Ho *et al.*, 2000). Une étude plus approfondie réalisée quelques années plus tard a rendu possible l'obtention d'un profil d'expression détaillé de la protéine ANK dans les différentes zones du cerveau, les auteurs montrant notamment une très forte

expression d'ANK dans les neurones du thalamus, des couches corticales III et V, de la moelle épinière ainsi que dans les cellules de Purkinje du cervelet (Yepes *et al.*, 2003).

```
                1         10        20        30        40        50        60        70
ANK_humain      MVKFPALTHYWPLIRFLVPLGITNIAIDFGEQALNRGIAAVKEDAVEMLASYGLAYSLMKFFTGPMSDFK
ANK_rat         MVKFPALTHYWPLIRFLVPLGITNIAIDFGEQALNRGIAAVKEDAVEMLASYGLAYSLMKFFAGPMSDFK
ANK_souris      MVKFPALTHYWPLIRFLVPLGITNIAIDFGEQALNRGIAAVKEDAVEMLASYGLAYSLMKFFTGPMSDFK
consensus       MVKFPALTHYWPLIRFLVPLGITNIAIDFGEQALNRGIAAVKEDAVEMLASYGLAYSLMKFF●GPMSDFK

                          80        90       100       110       120       130       140
ANK humain      NVGLVFVNSKRDRTKAVLCMVVAGAIAAVFHTLIAYSDLGYYIINKLHHVDESVGSKTRRAFLYLAAFPF
ANK rat         NVGLVFVNSKRDRAKAVLCMVVAGAIAAVFHTLIAYSDLGYYIINKLHHVDESVGSKTRRAFLYLAAFPF
ANK souris      NVGLVFVNSKRDRAKAVLCMVVAGAIAAVFHTLIAYSDLGYYIINKLHHVDESVGSKTRRAFLYLAAFPF
consensus       NVGLVFVNSKRDR●KAVLCMVVAGAIAAVFHTLIAYSDLGYYIINKLHHVDESVGSKTRRAFLYLAAFPF

                         150       160       170       180       190       200       210
ANK humain      MDAMAWTHAGILLKHKYSFLVGCASISDVIAQVVFVAILLHSHLECREPLLIPILSLYMGALVRCTTLCL
ANK rat         MDAMAWTHAGILLKHKYSFLVGCASISDVIAQVVFVAILLHSHLECREPLLIPILSLYMGALVRCTTLCL
ANK souris      MDAMAWTHAGILLKHKYSFLVGCASISDVIAQVVFVAILLHSHLECREPLLIPILSLYMGALVRCTTLCL
consensus       MDAMAWTHAGILLKHKYSFLVGCASISDVIAQVVFVAILLHSHLECREPLLIPILSLYMGALVRCTTLCL

                         220       230       240       250       260       270       280
ANK humain      GYYKNIHDIIPDRSGPELGGDATIRKMLSFWWPLALILATQRISRPIVNLFVSRDLGGSSAATEAVAILT
ANK rat         GYYRNIHDIIPDRSGPELGGDATIRKMLSFWWPLALILATQRISRPIVNLFVSRDLGGSSAATEAVAILT
ANK souris      GYYRNIHDIIPDRSGPELGGDATIRKMLSFWWPLALILATQRISRPIVNLFVSRDLGGSSAATEAVAILT
consensus       GYY●NIHDIIPDRSGPELGGDATIRKMLSFWWPLALILATQRISRPIVNLFVSRDLGGSSAATEAVAILT

                         290       300       310       320       330       340       350
ANK humain      ATYPVGHMPYGWLTEIRAVYPAFDKNNPSNKLVSTSNTVTAAHIKKFTFVCMALSLTLCFVMFWTPNVSE
ANK rat         ATYPVGHMPYGWLTEIRAVYPAFDKNNPSNKLANTNNTVTSAHIKKFTFVCMALSLTLCFVMFWTPNVSE
ANK souris      ATYPVGHMPYGWLTEIRAVYPAFDKNNPSNKLANTSNTVTSAHIKKFTFVCMALSLTLCFVMFWTPNVSE
consensus       ATYPVGHMPYGWLTEIRAVYPAFDKNNPSNKL●●T●NTVT●AHIKKFTFVCMALSLTLCFVMFWTPNVSE

                         360       370       380       390       400       410       420
ANK humain      KILIDIIGVDFAFAELCVVPLRIFSFFPVPVTVRAHLTGWLMTLKKTFVLAPSSVLRIIVLIASLVVLPY
ANK rat         KILIDIIGVDFAFAELCVIPLRIFSFFPVPVTVRAHLTGWLMTLKKTFVLAPSSVLRIIVLITSLVVLPY
ANK souris      KILIDIIGVDFAFAELCVIPLRIFSFFPVPVTVRAHLTGWLMTLKKTFVLAPSSVLRIIVLITSLVVLPY
consensus       KILIDIIGVDFAFAELCV●PLRIFSFFPVPVTVRAHLTGWLMTLKKTFVLAPSSVLRIIVLI●SLVVLPY

                         430       440       450       460       470       480       490
ANK humain      LGVHGATLGVGSLLAGFVGESTMVAIAACYVYRKQKKKMENESATEGEDSAMTDMPPTEEVTDIVEMREE
ANK rat         LGVHGATLGVGSLLAGFVGESTMVALAACYVYRKQKKKMENESATEGEDSAMTDMPPAEEVTDIVEMREE
ANK souris      LGVHGATLGVGSLLAGFVGESTMVALAACYVYRKQKKKMENESATEGEDSAMTDMPPTEEVTDIVEMREE
consensus       LGVHGATLGVGSLLAGFVGESTMVA●AACYVYRKQKKKMENESATEGEDSAMTDMPP●EEVTDIVEMREE

ANK humain      NE
ANK rat         NE
ANK souris      NE
consensus       NE
```

Figure 1: Alignement des séquences humaine, de rat et de souris de la protéine ANK (réalisé avec les logiciels Multalin et ESPript 2.2)

Les étoiles vertes * indiquent une différence entre la séquence humaine et de souris
Les étoiles bleues * indiquent une différence entre la séquence de rat et de souris

L'analyse du profil d'hydropathie de la séquence d'ANK réalisée à l'aide de l'algorithme de Kyte-Doolittle a mis en évidence l'existence de 9 à 12 domaines transmembranaires d'approximativement 20 acides aminés (Ho *et al.*, 2000). L'utilisation d'anticorps dirigés contre trois épitopes différents a permis aux auteurs de localiser en microscopie confocale la protéine ANK à la surface cellulaire. La protéine ANK a ainsi d'abord été décrite comme étant une protéine intrinsèque de la membrane plasmatique, constituée de 10 hélices transmembranaires.

D'autres travaux ont affiné la prédiction de structure à l'aide du logiciel TMpred, et ont permis de proposer une structure plus précise de la protéine ANK (Nurnberg *et al.*, 2001). En effet, les auteurs ont décrit une organisation en 12 hélices transmembranaires, organisées de façon tête-bêche, qui correspond à une alternance de profil d'hydrophobicité des hélices α. La figure 2 représente le modèle réévalué de l'organisation d'ANK par Nurnberg et ses collaborateurs. Il y apparaît que les 12 hélices y sont disposées de façon alternative (6 externes/6 internes), de manière à constituer un véritable canal, dont la face interne serait composée très majoritairement d'acides aminés polaires chargés positivement (arginine, lysine…), favorisant ainsi le passage d'un anion comme le pyrophosphate inorganique (PPi). Les auteurs estiment son diamètre comme étant supérieur à 5,3 angströms, taille minimale d'une molécule de PPi libre. Cet élément était capital à prendre en compte lors de la prédiction de structure, car un modèle de canal à 5 hélices externes/5 hélices internes (comme le phospholamban) n'autorise qu'un diamètre de 4 angströms au maximum, et un modèle de canal organisé sans alternance (12 hélices formant un pore) serait beaucoup trop large pour être sélectif du PPi.

Représentation de dessus

Représentation tridimensionnelle

Figure 2: Organisation spatiale de la protéine ANK
(d'après Nurnberg *et al.*, 2001)

En rouge sont représentées les hélices exposant leurs résidus chargés positivement
En bleu sont représentées les boucles inter-hélices

En effet, la fonction principale de la protéine ANK est de transporter le PPi de l'intérieur vers l'extérieur des cellules comme l'ont démontré Ho et ses collaborateurs (Ho *et al.*, 2000). Les auteurs ont évalué les contenus en PPi intra- (iPPi) et extracellulaire (ePPi, contenu dans le surnageant de culture des cellules) de fibroblastes provenant de souris *ank/ank* et de souris de type sauvage. Les cellules provenant des animaux porteurs de la mutation avaient un contenu en iPPi deux fois plus important que les cellules provenant d'animaux sains. De la même façon, le surnageant de culture des fibroblastes sains contenait trois à cinq fois plus d'ePPi que le surnageant provenant des cellules porteuses de la mutation *ank*, ce qui suggère que la mutation non-sens provoque une perte de fonction de la protéine ANK. Les auteurs ont également démontré que la transfection des fibroblastes des souris *ank/ank* avec un plasmide de surexpression de la forme sauvage d'ANK contrecarrait les effets de la mutation, mettant ainsi en évidence le rôle d'ANK dans l'export de PPi.

Pour compléter cette démonstration sur la fonction de transporteur d'ANK, Ho et collaborateurs ont analysé les effets du probénécide, un inhibiteur des transporteurs d'anion (Ho *et al.*, 2000). A l'aide de la lignée cellulaire COS-7, transfectée ou non avec le plasmide de surexpression d'ANK, les auteurs ont démontré que le niveau d'iPPi n'était plus détectable dans les cellules transfectées, et que le surnageant de ces cellules contenait deux à quatre fois plus d'ePPi. L'ajout de probénécide a permis d'empêcher totalement la chute du taux d'iPPi, démontrant ainsi qu'ANK fonctionne comme un transporteur d'anion organique sensible au probénécide.

Quelques années plus tard, une étude a voulu caractériser encore plus finement la capacité de transport d'ANK par le biais d'un système d'expression hétérologue dans des oocytes de *Xenopus laevis* (Gurley *et al.*, 2006). Les auteurs ont démontré par injection de l'ARNm d'Ank dans ces cellules, en utilisant du PPi radiomarqué, que le transport de PPi dépendant d'ANK était saturable (aux alentours de 7 µM), et que son K_M apparent était de l'ordre de 1,33 ± 0,59 µM. Ces résultats sont cependant à considérer avec prudence, puisque malgré l'intérêt et la qualité indéniable des expériences présentées, les auteurs présentent des données démontrant une internalisation de PPi (et non pas un export de PPi à partir de l'intérieur de la cellule) pour des raisons de « limitations techniques », et affirment, sans démonstration à l'appui, qu'ANK est un transporteur de PPi bidirectionnel. Il est fort possible que la constante de Michaelis-Menten soit différente si l'on considère l'export et non pas la capture de PPi par les cellules. De la même façon, ces travaux de l'équipe de David Kingsley contredisent leurs propres travaux princeps réalisés en 2000 et évoqués plus haut, démontrant

qu'une surexpression d'ANK est responsable d'une diminution d'iPPi, en faveur d'une augmentation d'ePPi (Ho *et al.*, 2000).

Il a également été question durant quelques années, de considérer ANK comme pouvant être un transporteur d'ATP. Cette observation particulièrement intéressante a été mise en lumière par Lawrence M. Ryan en 2001 dans sa revue sur l'histoire du gène *Ank* (Ryan, 2001). L'auteur soulève cette question, au vu des expériences réalisées avec le probénécide par Ho est ses collaborateurs (Ho *et al.*, 2000). En effet, cet inhibiteur des transporteurs d'anions organiques est aussi capable de déstabiliser le fonctionnement des transporteurs d'ATP « ABC » (ATP binding cassette). Par ailleurs, l'hypothèse du transporteur d'ATP a été reprise dans des travaux réalisés quelques années plus tard discutant du rôle d'ANK dans un modèle de crises convulsives (retrouvées dans l'épilepsie) chez le rat (Yepes *et al.*, 2003). Les auteurs soutiennent le fait qu'ANK puisse être un transporteur d'ATP, en plus d'exporter le PPi, car son expression est fortement augmentée dans les zones responsables des crises de convulsions. Or, l'augmentation de la quantité d'ATP dans la fente synaptique située entre les cellules nerveuses de ces zones du cerveau favorise l'état hyperexcitabilité des neurones, état caractéristique des crises convulsives. Cependant, il n'a encore jamais été clairement démontré à ce jour qu'ANK était réellement capable de transporter l'ATP hors des cellules, ou voire même de réguler le transport d'ATP.

Le rôle de transporteur de PPi d'ANK le place au centre du métabolisme du pyrophosphate inorganique et du phosphate inorganique, essentiels dans de nombreux phénomènes cellulaires (phosphorylation, etc...), mais également au centre des phénomènes de minéralisation de la matrice extracellulaire (MEC), qui influe grandement sur le phénotype des cellules ostéo-articulaires (Aigner et McKenna, 2002).

II. Contribution du gène *Ank* dans la régulation de la balance PPi (pyrophosphate inorganique)/Pi (phosphate inorganique) du chondrocyte articulaire

Le chondrocyte articulaire assure, à l'état physiologique, l'homéostasie du cartilage articulaire. En effet, cette cellule assure un équilibre permanent entre la dégradation de la MEC (catabolisme) et sa synthèse (anabolisme). Cet équilibre est en fait dépendant des divers *stimuli* captés par le chondrocyte, tels que les cytokines pro- (Interleukine (IL)-1β, Tumor necrosis factor (TNF)-α) ou anti-inflammatoires (IL-4, IL-10), voire les facteurs de croissance

(Transforming growth factor (TGF)-β1, Insulin growth factor (IGF)-1…) (Goldring, 2006). Une autre balance est essentielle dans la composition de la MEC des cellules du cartilage, pouvant même influencer sa synthèse. En effet, la balance entre le niveau de pyrophosphate inorganique (PPi) et le niveau de phosphate inorganique (Pi) est maintenue dans un état stable en permanence par les chondrocytes articulaires.

II.A. Les acteurs de la balance PPi/Pi dans le chondrocyte articulaire

Plusieurs partenaires protéiques sont susceptibles d'être impliqués dans le fonctionnement de cette balance. Les principaux partenaires pouvant être les enzymes à activité ecto-nucléotide pyrophosphatase/phosphodiestérase (retrouvées sous plusieurs abréviations dans la littérature, comme NTPPH, E-NPP ou encore NPP), la phosphatase alcaline tissu non-spécifique (TNAP), les transporteurs de Pi (PiT) et ANK, le transporteur de PPi, dont il a été question dans la partie I. Tous influent directement sur le métabolisme du PPi et du Pi du chondrocyte au sein du cartilage articulaire.

II.A.1. Les ecto-nucléotide pyrophosphatases/phosphodiestérases (NPP)

Il s'agit d'une famille d'enzyme appartenant à la famille des ecto-nucléotidases. Les ecto-nucléotide pyrophosphatases/phosphodiestérases (NPP) sont des glycoprotéines intégrales, dont la fonction est de cliver la liaison phosphodiester des nucléotides triphosphates (NTP) (Bollen *et al.*, 2000). Bien que le substrat de prédilection pour évaluer *in vitro* l'activité NPP soit le thymidine-5'-monophosphate *p*-nitrophenyl ester (avec un K_M d'environ 830 µM d'après (Cardenal *et al.*, 1996)), le susbtrat de prédilection reste l'ATP, avec un K_M d'approximativement 13 µM (Lazarowski *et al.*, 2000). Ainsi, le chondrocyte clive préférentiellement une molécule d'ATP en molécule d'AMP et une molécule de PPi.

A l'heure actuelle, cinq gènes codant des NPP ont été décrits pour *homo sapiens*, dénommés *Npp-1* à *-5* (Bollen *et al.*, 2000). Seules les trois ecto-enzymes NPP-1, -2 et -3 ont été décrites comme étant exprimées dans les ménisques de genou (Johnson *et al.*, 2001), mais il faut noter qu'il n'y a que les ARNm de Npp-1 et Npp-3 qui ont pu être détectés au sein des chondrocytes articulaires (Johnson *et al.*, 1999). La même étude met en évidence la localisation spécifique de NPP-1 à la membrane plasmique des cellules, d'où son autre dénomination « plasma cell membrane glycoprotein-1 » ou PC-1, alors que NPP-3 est décrite

comme étant restreinte au domaine du pré-Golgi dans le cytoplasme. Il est intéressant de noter qu'il existe des formes solubles de NPP-1 et NPP-3, qui ont été détectées dans le plasma sanguin (Goding *et al.*, 1998 ; Rutsch *et al.*, 2001). Cependant, seule la forme soluble de NPP-1 a pu être détectée à la fois dans les surnageants de culture de chondrocytes articulaires (Huang *et al.*, 1994), et dans les liquides synoviaux de genoux humains (Huang *et al.*, 1994 ; Masuda *et al.*, 1997). Les analyses par western blot réalisées sur des extraits protéiques totaux de chondrocytes articulaires en culture ont révélé la présence de deux bandes, l'une à 130 kDa représentant la forme de PC-1 intégrale à la membrane plasmique, et l'autre à 60 kDa, signal de la forme soluble (tronquée) (Huang *et al.*, 1994). Enfin, il a été démontré que PC-1 est à elle seule responsable d'environ 50% de l'activité NPP du chondrocyte articulaire cultivé en monocouche (Lotz *et al.*, 1995).

II.A.2. La phosphatase alcaline tissu non-spécifique (TNAP)

Il existe 3 gènes codant des phosphatases alcalines, un pour la phosphatase alcaline intestinale, un pour la phosphatase alcaline placentaire et un pour la phosphatase alcaline tissu non-spécifique (TNAP). Seule la TNAP est exprimée dans le tissu osseux (Hoshi *et al.*, 1997) et dans le cartilage, principalement par les chondrocytes hypertrophiques localisés dans la zone calcifiée (Dickson, 1978 ; Ekman et Rodriguez-Martinez, 1991; Xu *et al.*, 1994).

La TNAP est une protéine ancrée à la membrane plasmique des cellules par une ancre glycosyl phosphatidyl-inositol. L'enzyme clive le groupe phosphate terminal des substrats pris en charge, et fonctionne de manière optimale au pH physiologique 7,4 (Harada *et al.*, 1986). La TNAP est capable de prendre en charge les nucléotides (tri-, di- et monophosphates) pour générer du Pi et l'homologue nucléotidique correspondant, soustrait d'un groupement phosphate (par exemple, ATP clivé en ADP + Pi, ou ADP clivé en AMP + Pi) (Tenenbaum *et al.*, 1981). Cependant, les constantes d'affinités pour l'ATP (K_M d'environ 25 µM) ou encore l'ADP (K_M environ 36 µM) sont deux fois plus élevées que pour le PPi (aux alentours de 10 µM), qui apparaît ainsi comme le substrat de prédilection de la TNAP (Fedde *et al.*, 1988).

Il est essentiel de noter que l'activité phosphatase alcaline dans les zones intermédiaires ou radiales du cartilage, où sont présents les chondrocytes articulaires sains, n'a à ce jour pas été décrite. Cependant, il a été démontré que cette activité, habituellement sous le seuil de détection, devient quantifiable dans certaines conditions pathologiques, comme l'arthrose (Rees et Ali, 1988). En effet, le cartilage des patients souffrant d'arthrose

présente de nombreuses vésicules matricielles, localisées dans toutes les zones du cartilage (bien qu'étant beaucoup plus nombreuses dans la zone calcifiée), exhibant une activité phosphatase alcaline.

II.A.3. Les transporteurs de phosphate inorganique (PiT)

Les concentrations de Pi extracellulaire (ePi) sont en général hautement régulées par les transporteurs de Pi Na^+-dépendants, les protéines PiT, chargées d'internaliser l'ePi dans les chondrocytes au travers un système de symport utilisant le sodium (Kavanaugh et Kabat, 1996 ; Salaun *et al.*, 2001). Le transport de phosphate par les protéines PiT-1 (appelée aussi Glvr-1 ou SLC20A1) et PiT-2 (dénommé Ram-1 ou encore SLC20A2) a initialement été caractérisé au sein des chondrocytes de la zone calcifiée du cartilage (Palmer *et al.*, 1999 ; Guicheux *et al.*, 2000 ; Palmer *et al.*, 2000). Des analyses de Northern blot réalisées sur la lignée chondrogénique murine ATDC5 montrent que ces cellules expriment les ARNm PiT-1 et PiT-2 (Palmer *et al.*, 2000). Récemment, une étude a permis de démontrer, par RT-PCR et des mesures de flux de Pi, que les chondrocytes articulaires exprimaient également PiT-1 et PiT-2 (Solomon *et al.*, 2007). Sur le plan biochimique, les PiT sont des protéines transmembranaires effectuant 9 à 11 passages transmembranaires selon les logiciels de prédiction de structure utilisés (Virkki *et al.*, 2007).

II.A.4. Le transporteur de pyrophosphate inorganique ANK

Les caractéristiques du transporteur de PPi ANK ont déjà été évoquées précédemment dans la partie I. Son rôle est d'exporter l'iPPi vers l'extérieur du chondrocyte articulaire, augmentant ainsi le niveau d'ePPi. Il est intéressant d'analyser le profil d'expression d'ANK au sein du cartilage articulaire. En effet, la distribution de ce transporteur varie en fonction des différentes zones, puisque la protéine est quasiment indétectable dans la zone radiale (zone de prolifération recouvrant le zone hypertrophique calcifiée), alors que son expression est particulièrement forte dans la partie superficielle de la zone intermédiaire du cartilage, ainsi que dans la zone calcifiée (Johnson et Terkeltaub, 2004 ; Wang *et al.*, 2005). Une explication possible à ces différences d'expression est proposée par les récents travaux de Raihana Zaka et collaborateurs sur les effets de la tension en oxygène sur l'expression d'ANK (Zaka *et al.*, 2009). En effet, les auteurs démontrent que le promoteur proximal du gène *Ank* contient deux éléments de réponse à HIF-1, facteur de transcription sensible aux conditions

hypoxiques. Or, les zones du cartilage ou la tension en oxygène est très basse coïncident avec les zones où l'expression d'ANK est la plus faible. Les auteurs démontrent ainsi qu'en conditions hypoxiques, HIF-1 ne peut pas se fixer au promoteur d'*Ank*, qui est alors moins transcrit, et ainsi moins traduit.

Un schéma de conclusion résumant le rôle de chaque acteur de la balance PPi/Pi est proposé en figure 3.

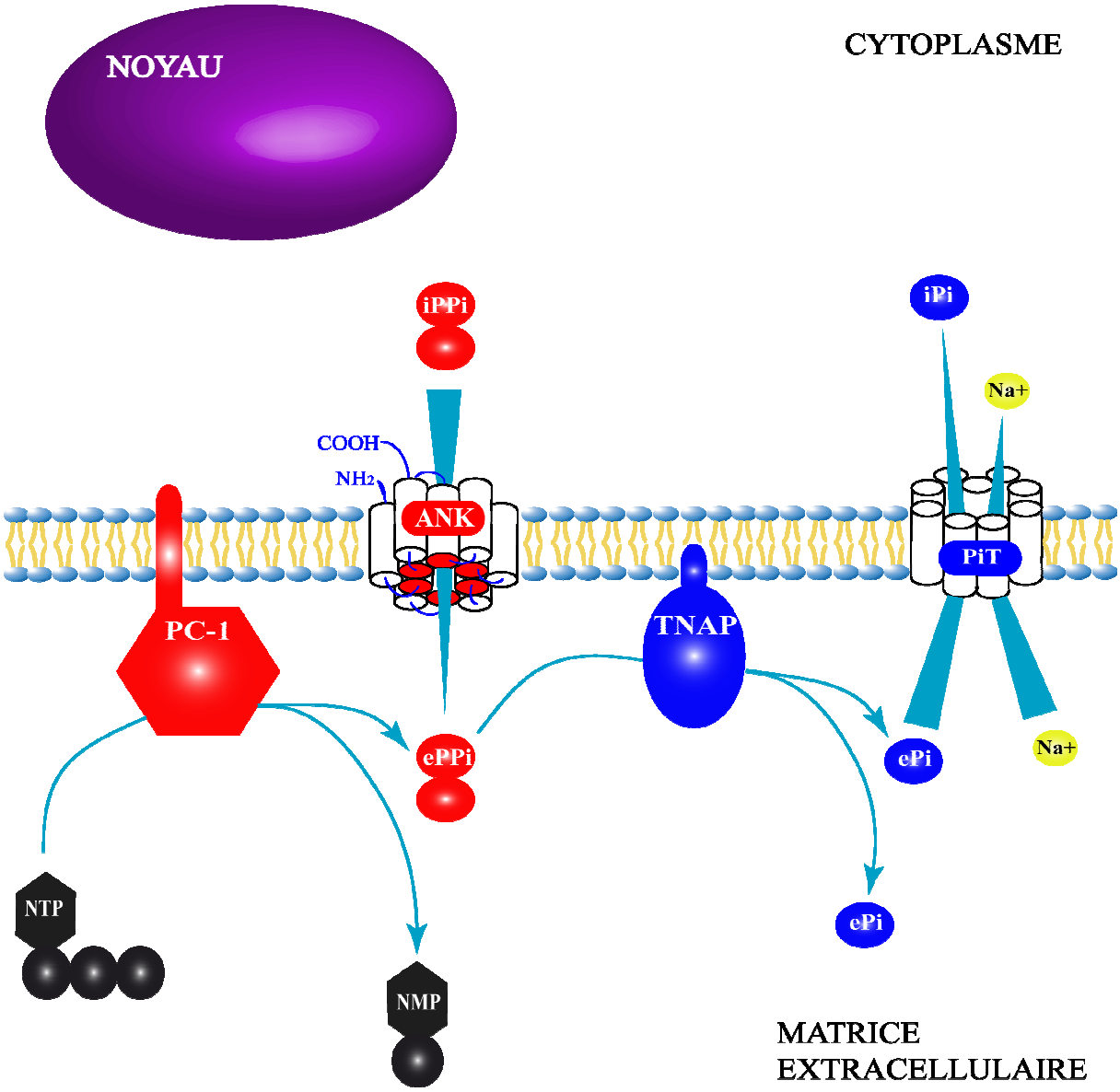


Figure 3: Métabolisme du pyrophosphate inorganique (PPi) et du phosphate inorganique (Pi) dans le chondrocyte

ePi : Pi extracellulaire ; ePPi : PPi extracellulaire ; iPi : Pi intracellulaire ; iPPi : PPi intracellulaire ;
NTP : nucléotide triphosphate ; NMP : nucléotide monophosphate ; PC-1 : plasma cell glycoprotein-1 ;
PiT : transporteur de Pi ; TNAP : phosphatase alcaline tissu non-spécifique.

.

II.B. Les dysfonctionnements d'ANK entraînent l'apparition d'arthropathies microcristallines

Les arthropathies microcristallines sont des affections rhumatologiques se caractérisant par des dépôts de microcristaux au sein des articulations et des tissus périarticulaires. Ces affections se manifestent en clinique par des crises inflammatoires localisées très aiguës et particulièrement destructrices pour le tissu cartilagineux.

Les trois types d'arthropathies microcristallines les plus connues sont la goutte, causée par la présence de cristaux d'urate monosodique, le rhumatisme à apatite, déclenché par la présence de cristaux basiques de phosphate de calcium (BPC) et enfin la chondrocalcinose articulaire, dont les responsables sont les dépôts de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD). La place centrale d'ANK dans la balance PPi/Pi constitue la raison principale pour laquelle les anomalies de fonctionnement de cette protéine affectent de façon directe la cristallogenèse des cristaux BPC et de PPCD (dont la base chimique est respectivement le Pi et le PPi), mais pas la formation d'urate monosodique (chimie à priori indépendante du Pi et du PPi). La figure 4 schématise la balance PPi/Pi et les conséquences de sa déstabilisation.

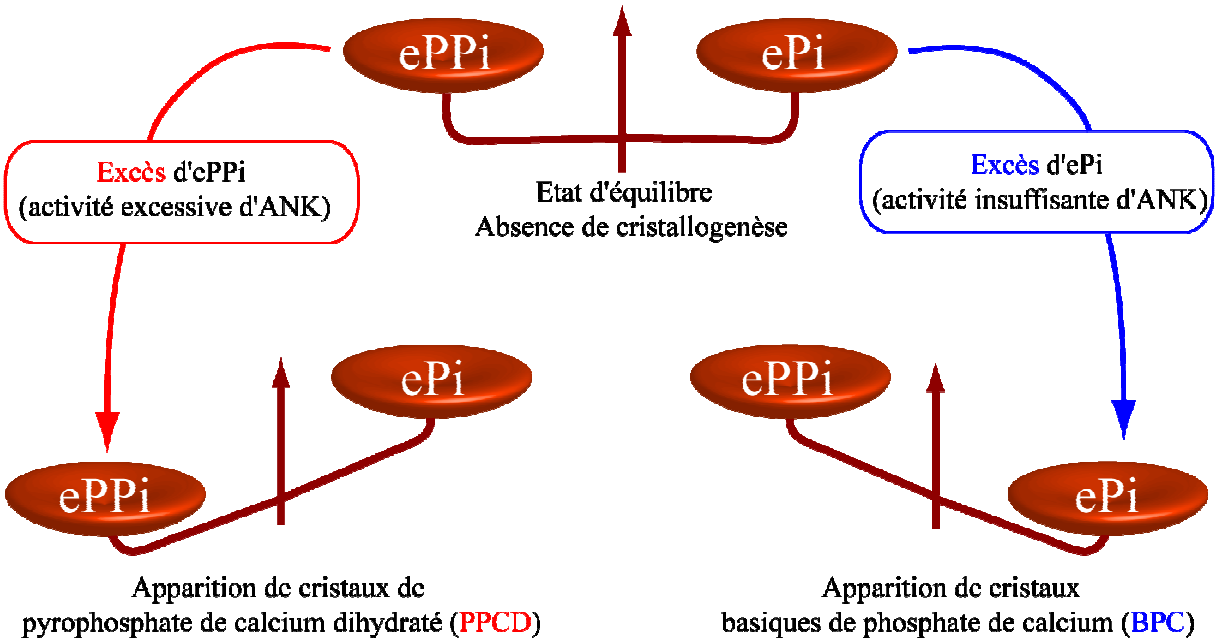


Figure 4: La balance PPi/Pi est fortement tributaire de l'activité d'ANK

II.B.1. Le rhumatisme à apatite

La formation de cristaux BPC est à l'origine du rhumatisme à hydroxyapatite. Bien qu'il n'existe absolument aucune corrélation décrite entre une altération de fonction d'ANK et les rhumatismes à apatite en clinique, de nombreux cristaux d'hydroxyapatite (HA) ont été décrits au sein des articulations des souris *ank/ank* (Hakim *et al.*, 1984). De plus, l'étude réalisée par le groupe de Ho et collaborateurs a permis de démontrer que les fibroblastes des souris porteuses de la mutation *ank* exportaient moins de PPi dans leur surnageant de culture que ceux provenant des souris de type sauvage (Ho *et al.*, 2000). Or l'ePPi est un inhibiteur de la cristallogenèse des cristaux BPC, et une diminution d'ePPi prédispose donc à leur apparition (Masuda et Hirose, 2002), suggérant une forte relation entre la fonction d'ANK et la probabilité de développement d'un rhumatisme à apatite.

Il existe plusieurs catégories de cristaux BPC, selon leur composition physicochimique, leur structure cristalline et leurs propriétés biologiques (Prudhommeaux *et al.*, 1996). Les cristaux retrouvés le plus fréquemment sont les cristaux d'hydroxyapatite (HA, de formulation chimique $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), mais des cristaux de phosphate octocalcique (de formule $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4$, 5 H_2O), ou encore de phosphate tricalcique ($Ca_3(PO_4)_2$) peuvent également être détectés chez les patients souffrant de rhumatisme à hydroxyapatite (McCarty *et al.*, 1983). Pour les cristaux d'HA purs, le rapport phosphate sur calcium mesuré lors de microanalyses aux rayons X est de 0,44, alors qu'une étude réalisée sur le liquide synovial de 25 patients souffrant de rhumatisme à apatite a permis d'obtenir une valeur moyenne significativement inférieure de 0,41 due à l'hétérogénéité des cristaux BPC (Gerster *et al.*, 1986).

En clinique, la présence de cristaux BPC peut provoquer une arthrite aiguë très inflammatoire (Schumacher *et al.*, 1977) ou encore une tendinite calcifiante (McCarty et Gatter, 1966), qui peuvent aboutir chez quelques patients à une arthrite érosive (Schumacher *et al.*, 1981). Dans la plupart des cas cependant la présence de cristaux BPC est associée à une destruction du cartilage articulaire (Garancis *et al.*, 1981; Halverson *et al.*, 1981 ; McCarty *et al.*, 1981). La prévalence des ces microcristaux augmente de manière significative avec l'âge des patients, et leur présence est détectée dans le liquide synovial de 60% des patients arthrosiques opérés dans le cadre d'une arthroplastie totale du genou (Derfus *et al.*, 2002). Par ailleurs, les cristaux d'HA peuvent être détectés usuellement, mais de façon non-spécifique, par la coloration rouge alizarine, comme illustré par la figure 5 (Gerster, 2007). Il est intéressant de noter que la présence de ces cristaux BPC est fortement corrélée aux signes

radiographiques de destruction articulaire, comme par exemple une réduction de l'interligne articulaire (Derfus *et al.*, 2002). En outre, l'utilisation de la radiographie permet de clairement distinguer le présence d'amas de cristaux d'HA comme cela est visible dans la figure 6 (Gerster, 2007).

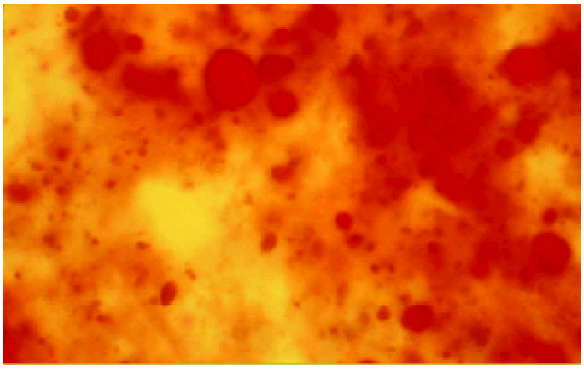


Figure 5: Aspect de cristaux d'hydroxyapatite en microscopie optique (X 10) après coloration au rouge Alizarine (Gerster JC, 2007)

Figure 6: Radiographie du métatarse montrant d'importantes calcifications périarticulaires de l'hallux par des cristaux basiques de phosphate de calcium (Gerster JC, 2007)

Sur le plan biologique, les cristaux BPC ont une très grande influence sur le métabolisme des chondrocytes. En effet, les récents travaux réalisés par Hang-Korng Ea et collaborateurs suggèrent que ces microcristaux peuvent pénétrer dans les cellules par phagocytose et interagir avec les chondrocytes *via* l'annexine V, induisant dans les deux cas l'apoptose de ces cellules (Ea *et al.*, 2008). Par ailleurs, la même équipe a démontré que les cristaux BPC étaient capables de provoquer la production de monoxyde d'azote (NO) *via* l'induction de la nitric oxyde synthase inductible (iNOS), mais également l'augmentation de production de l'ARNm de la cytokine pro-inflammatoire l'IL-1β (Ea *et al.*, 2005). Les microcristaux BPC sont également capables d'entraîner la libération du médiateur Prostaglandine E_2 (PGE_2) et de l'IL-1β par les chondrocytes (Dayer *et al.*, 1987). Ces molécules, ainsi que les cristaux BPC eux-mêmes, induisent la synthèse de molécules pouvant dégrader la MEC (notamment la MMP-13) (Cheung *et al.*, 1983 ; Mitchell *et al.*, 1992 ; McCarthy *et al.*, 2001).

D'autres travaux ont démontré les effets délétères des cristaux BPC sur le cartilage, notamment *via* la membrane synoviale. En effet, les cristaux BPC ont un fort effet proliférative lorsqu'ils sont internalisés par endocytose par les fibroblastes synoviaux (Cheung *et al.*, 1986 ; Mitchell *et al.*, 1989 ; Mitchell *et al.*, 1992). Ces cristaux induisent également la sécrétion

d'enzymes responsables de la dégradation de la MEC du cartilage, les métalloprotéases matricielles (MMP) stromélysine (MMP-3), les collagénases (MMP-1 et MMP-9), ainsi que MMP-8 et MMP-13 (McCarthy *et al.*, 1991 ; McCarthy *et al.*, 1992 ; Bai *et al.*, 2001 ; McCarthy *et al.*, 2001 ; Reuben *et al.*, 2001 ; Reuben *et al.*, 2002 ; Sun *et al.*, 2002). Par ailleurs, les microcristaux BPC sont capables d'induire la libération de PGE_2 par les fibroblastes synoviaux provenant de patients arthrosiques, *via* l'intermédiaire de la cyclooxygénase (COX)-1 (Molloy *et al.*, 2008) et d'IL-1β (Morgan *et al.*, 2004) par les fibroblastes.

Les cristaux BPC sont capables d'induire de tels effets par l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, telles que les voies p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), la c-Jun N-terminal kinase (JNK) et le complexe activator protein-1 (AP-1) pour l'augmentation de l'expression d'iNOS par le chondrocyte articulaire (Ea *et al.*, 2005). Il a également été décrit l'activation de la MAPK extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 et des protein kinase C (PKC) Ca^{2+}-dépendantes pour l'induction de MMP-1 et MMP-3 dans les fibroblastes (Reuben *et al.*, 2002 ; Reuben *et al.*, 2004). L'activation de Ras, Raf, et AP-1 par les microcristaux a également été rapportée pour l'induction de MMP-1 et MMP-3 (Sun *et al.*, 2002). Des travaux ont également démontré que l'activation des PKC et d'ERK 1/2 était responsable de l'augmentation d'expression de COX-1 (Molloy *et al.*, 2008). Enfin, des travaux ont permis d'observer l'implication de la voie de la phospholipase C (PLC) pour les effets mitogènes des cristaux BPC sur la membrane synoviale (Rothenberg, 1987 ; Rothenberg *et al.*, 1988). Une autre étude réalisée sur les mécanismes responsables de la prolifération des fibroblastes synoviaux a également permis de décrire l'activation d'ERK 1/2, de PKC, du nuclear factor-κB (NFκB) par ces microcristaux (McCarthy *et al.*, 1998).

Un schéma de synthèse des principaux effets des cristaux BPC est proposé en figure 7.

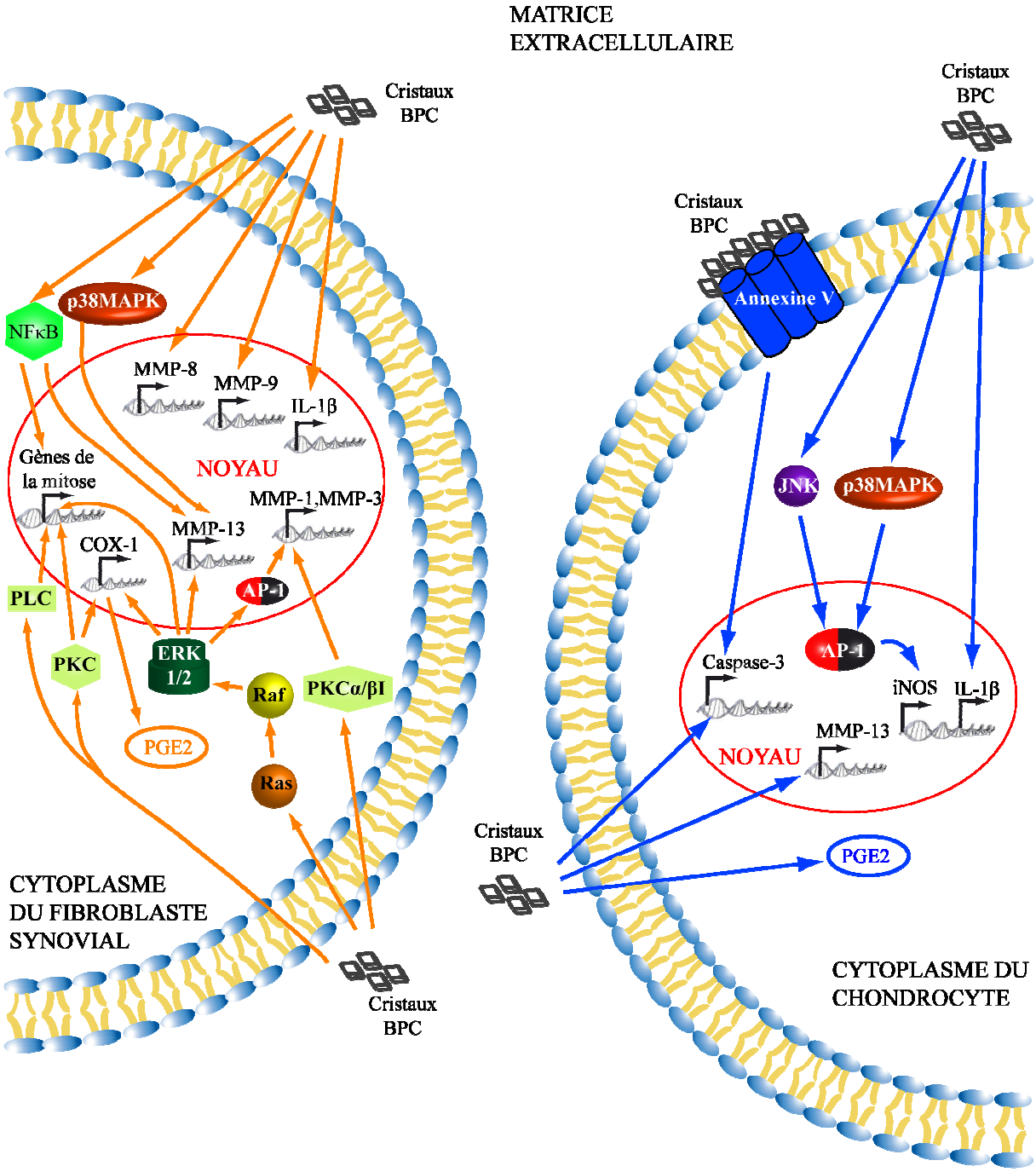


Figure 7: Effet des cristaux basiques de phosphate de calcium (BPC) sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes
→ : activation ⊣ : inhibition

II.B.2. La chondrocalcinose articulaire (CCA)

La formation de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD) est à l'origine de la chondrocalcinose articulaire (CCA). La CCA a été mise en évidence en 1957 lors du IXe congrès international des maladies rhumatismales à Toronto par Sitaj et Zitnan (Zitnan et Sitaj, 1957). Ils décrivent une incrustation calcique des cartilages hyalins et des fibrocartilages et soulignent son caractère familial à partir de leurs 14 observations. Quelques années plus tard, les travaux de Mc Carty (Mc Carty *et al.*, 1962) réalisés chez des patients souffrant d'une arthrite aiguë pseudogoutteuse du genou ont permis d'identifier dans le liquide synovial des microcristaux, différents de ceux d'urate monosodique impliqués dans les crises de goutte : les cristaux de PPCD (Kohn *et al.*, 1962).

La CCA provoque donc des accès articulaires particulièrement aigus et inflammatoires, et s'observe dans des circonstances très variées, ce qui suppose qu'elle répond à des mécanismes pathogéniques différents. Néanmoins, une augmentation du niveau d'ePPi semble primordiale pour la cristallogenèse de ces microcristaux de PPCD, dont la formule chimique est $Ca_2P_2O_7$, 2 H_2O. Il existe trois formes de CCA, qui sont différenciées en fonction de leur origine: les formes familiales sont des affections génétiques dépendantes de mutations du gène *Ank*, les formes sporadiques, dont la fréquence augmente avec l'âge et les formes secondaires "métaboliques", dont l'apparition dépend d'autres pathologies. La figure 8 expose les principales différences entre ces trois formes.

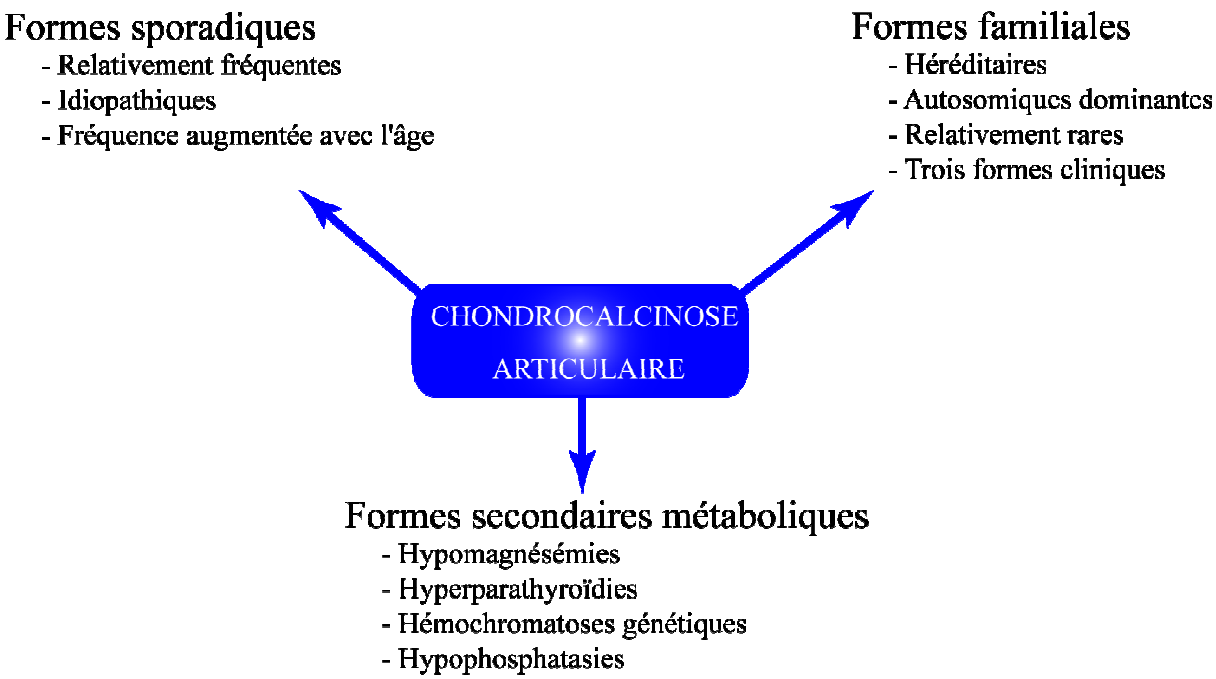


Figure 8: Les trois différentes formes de chondrocalcinose articulaire

Le diagnostic de chondrocalcinose articulaire se base sur la mise en évidence de microcristaux de PPCD dans le liquide synovial par l'observation en microscopie optique classique, puisque ces cristaux ne sont que faiblement biréfringent en microscopie à lumière polarisée. Une observation en microscopie électronique à balayage, couplée à une diffraction aux rayons X permet une identification formelle de ces microcristaux. Un cliché caractéristique issu des travaux de Faure et collaborateurs (Faure *et al.*, 1981) est visible dans la figure 9. Dans ces microanalyses, le rapport phosphate sur calcium mesuré pour les CPPD est de 0,72 (Gerster *et al.*, 1986). L'examen radiographique fournit également des informations essentielles pour le diagnostic des CCA, qui se manifestent par une opacification stratifiée ou granuleuse, de tonalité calcique, des cartilages de revêtement épiphysaire, des fibrocartilages et de certains tendons, ligaments, aponévroses et synoviales (Gaucher *et al.*, 1986). Un cliché radiographique de CCA est fourni dans la figure 10.

Figure 9: Aspect de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté en microscopie électronique à balayage (X 10000) (Faure G *et al.*, 1981)

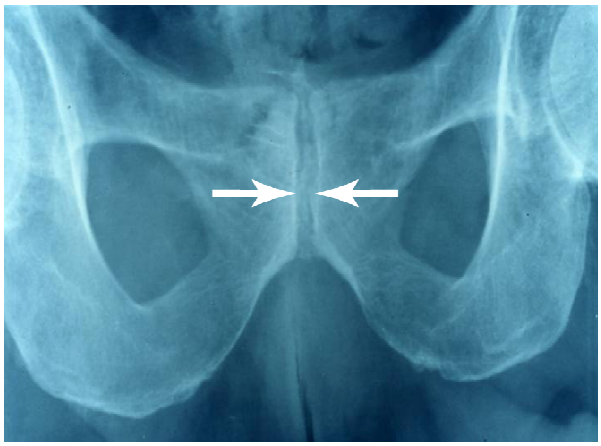


Figure 10: Radiographie du bassin montrant l'opacification anormale de la symphyse pubienne (flèches blanches) due à la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté

Sur le plan moléculaire, les cristaux de PPCD induisent de nombreux effets biologiques. Un des effets les plus étudiés est sans nul doute l'inflammation aiguë causée par la présence des microcristaux de PPCD, qui résulte principalement de l'interaction entre les cristaux et la membrane synoviale, mais aussi entre les cristaux et l'infiltrat leucocytaire (monocytes et neutrophiles), induisant le relargage de cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IL-1β, ou encore de la chemokine IL-8 (Terkeltaub, 1993). Plusieurs de ces médiateurs

participent à l'activation des neutrophiles, aggravant ainsi l'inflammation (Guerne *et al.*, 1989 ; Terkeltaub *et al.*, 1991 ; Hachicha *et al.*, 1995)

En effet, l'endocytose des microcristaux de PPCD par les cellules monocytaires induit de leur part le relargage de TNF-α, d'IL-6, mais également d'IL-8 (Liu *et al.*, 2000). Cette chemokine est retrouvée en quantité importante dans le liquide synovial de patients atteints de CCA (Miller et Brelsford, 1993) et est responsable du déploiement massif de neutrophiles dans la cavité articulaire. Il a été démontré que les cristaux de PPCD étaient capables d'induire la voie des MAPK (JNK, ERK 1/2 et p38 MAPK) dans les cellules monocytaires THP-1 (Liu *et al.*, 2000), p38 MAPK étant essentielle pour l'induction de l'ARNm de l'IL-8. Il est intéressant de noter que l'activation du promoteur de l'IL-8 est dépendante d'AP-1 (activé par ERK 1/2) et du complexe NFκB de classe II (formé de c-Rel/RelA), activés tous les deux par les cristaux de PPCD (Liu *et al.*, 2000). Il a en revanche été démontré que ces microcristaux étaient incapables de stimuler l'expression de la COX-2 par les monocytes, contrairement aux cristaux d'urate monosodique (Pouliot *et al.*, 1998). Un effet essentiel des cristaux de PPCD sur les monocytes et les macrophages est leur capacité d'induire l'inflammasome contenant la NACHT-, LRR-, and pyrin-domain-containing protein (NALP)-3, qui permet la maturation de l'IL-1β (et de l'IL-18) (Martinon *et al.*, 2006).

L'activation des neutrophiles, augmentée par l'IL-8 (Detmers *et al.*, 1990), entretien et aggrave l'inflammation articulaire, notamment par la libération d'éicosanoïdes (Leucotriène B4, LTB4) (Poubelle *et al.*, 1987), d'IL-1β (Roberge *et al.*, 1994), d'IL-8 (Miller et Brelsford, 1993). Certaines voies de signalisation ont également été décrites comme étant activées au sein des neutrophiles par les cristaux de PPCD, comme la stimulation de la voie de la phospholipase D (Naccache *et al.*, 1993), une augmentation de la mobilisation de calcium intracellulaire (Poubelle *et al.*, 1987 ; Naccache *et al.*, 1991), et une induction de la phosphorylation des groupements tyrosines des protéines (Burt *et al.*, 1993; Gaudry *et al.*, 1993 ; Roberge *et al.*, 1993). Il a également été démontré que l'activation des neutrophiles par les microcristaux de PPCD reposait sur l'activation de la p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) *via* l'activation de PKC, mais indépendamment des voies phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) et protein kinase B (PKB) (Tudan *et al.*, 1998). L'enzyme p70S6K est en effet essentielle dans l'activation des neutrophiles, particulièrement par son action positive sur l'appareil de traduction de ces cellules. Un autre effet essentiel des cristaux de PPCD sur la biologie du neutrophile est sans conteste l'inhibition de l'apoptose spontanée survenant habituellement lors de la phase de résolution de l'inflammation. Or ces microcristaux sont capables d'inhiber l'apoptose spontanée (Tudan *et al.*, 2000a) et induite par le TNF-α,

notamment en inhibant les voies ERK 1/2 et PI3K/Akt qui relaient habituellement la synthèse de la protéase pro-apoptotique caspase-3 (Tudan *et al.*, 2000b). Un résumé des effets des cristaux de PPCD sur les cellules immunitaires est proposé en figure 11.

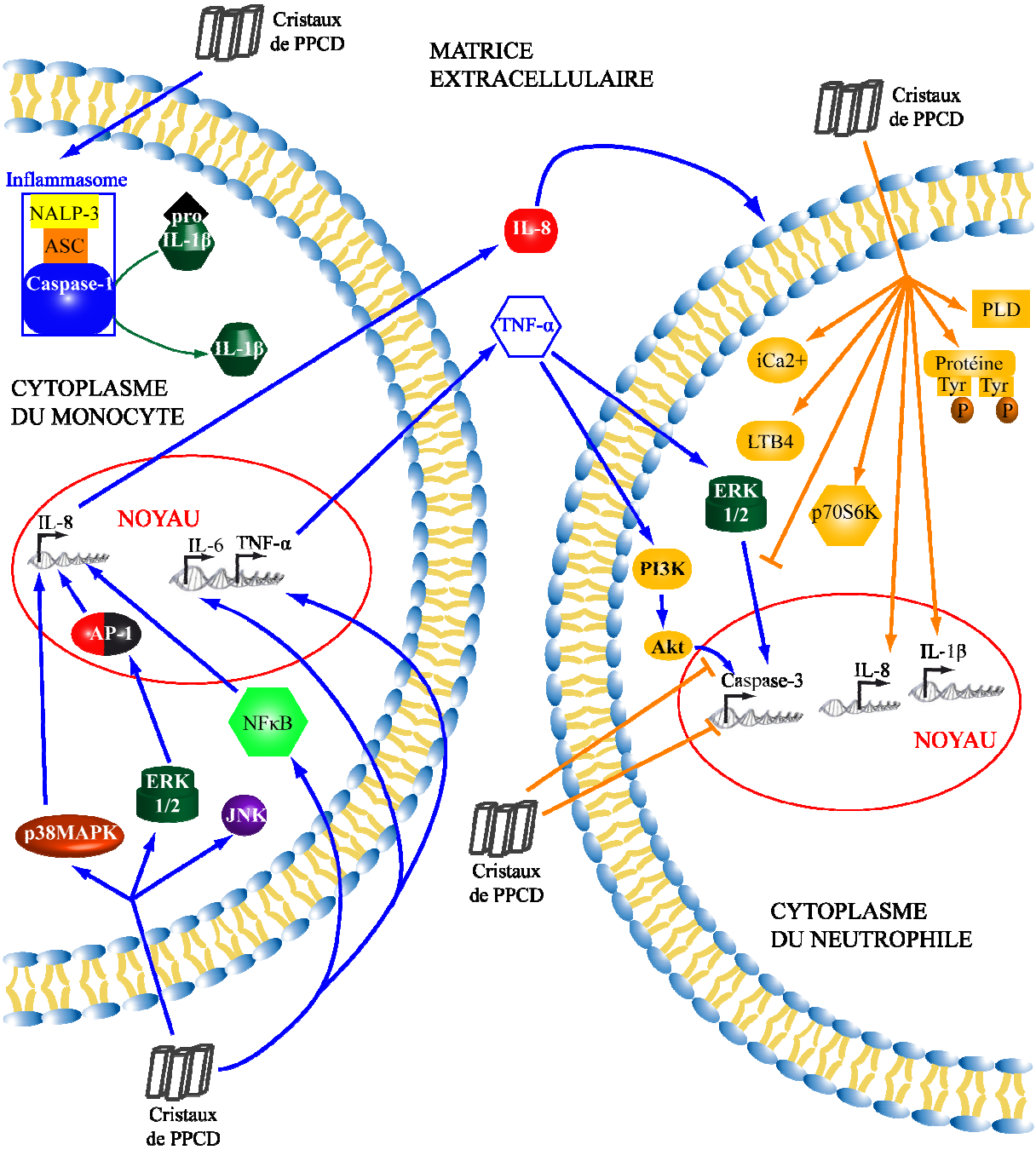


Figure 11: Effet des cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD) sur les monocytes et les neutrophiles
→ : activation ⊣ : inhibition

ASC : Apoptosis-associated Speck-Like protein containing a CARD ; CARD : Caspase Recruitment Domain ; Tyr : résidu tyrosine

Les microcristaux de PPCD ont également un effet délétère important sur les cellules de la cavité articulaire, qu'il s'agisse des fibroblastes synoviaux ou des chondrocytes. En effet, les travaux de Liu-Bryan et collaborateurs démontrent que ces cristaux sont capables, *via* leur interaction avec les Toll-like receptors 2 (TLR2), de déclencher la cascade de signalisation canonique des TLR, passant par MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), IRAK-1 (IL-1Receptor-associated kinase-1), TRAF-6 (TNF receptor-associated factor-6), et IκB kinase-2 (IKK-2).

La liaison des microcristaux de PPCD au TLR2 stimule l'assemblage du complexe MyD88-Rac1-PI3K, responsable de l'activation d'Akt et d'IRAK-1 (Liu-Bryan *et al.*, 2005). Ces signaux intracellulaires permettent, *via* NF-κB, de stimuler la libération de NO par les chondrocytes articulaires. La production de NO stimulée par les cristaux de PPCD a également été démontrée au sein des fibroblastes synoviaux provenant de patients arthrosiques (Liu *et al.*, 2009). Ces résultats mettent en évidence le rôle délétère des cristaux sur l'intégrité du cartilage articulaire.

D'autres travaux ont également démontré que les cristaux de PPCD avaient des effets mitogènes (Cheung *et al.*, 1984) sur les fibroblastes synoviaux, et induisaient la libération de plusieurs MMP par ces cellules, notamment la MMP-3 (Cheung *et al.*, 1997), la MMP-8 (Reuben *et al.*, 2001) et la MMP-13 (Liu *et al.*, 2009). Par ailleurs, ces microcristaux induisent la libération de MMP-3 (Cheung *et al.*, 1997) et de MMP-13 (Liu *et al.*, 2009) par les chondrocytes articulaires. En outre, les cristaux de PPCD sont capables d'induire la production de PGE_2 par les chondrocytes (Liu *et al.*, 2009), ainsi que par les fibroblastes synoviaux *via* la voie de la phospholipase A2 (PLA_2)/COX-2, mais également d'activer la voie de le PLC, la voie ERK 1/2, activant ainsi respectivement le facteur de transcription cyclic AMP response element-binding protein (CREB) et les proto-oncogènes *c-fos* et *c-jun* (sous la forme d'AP-1), responsables des effets mitogènes (Cheung *et al.*, 1996 ; Nair *et al.*, 1997).

Un résumé des effets des cristaux de PPCD sur les cellules articulaires est proposé en figure 12.

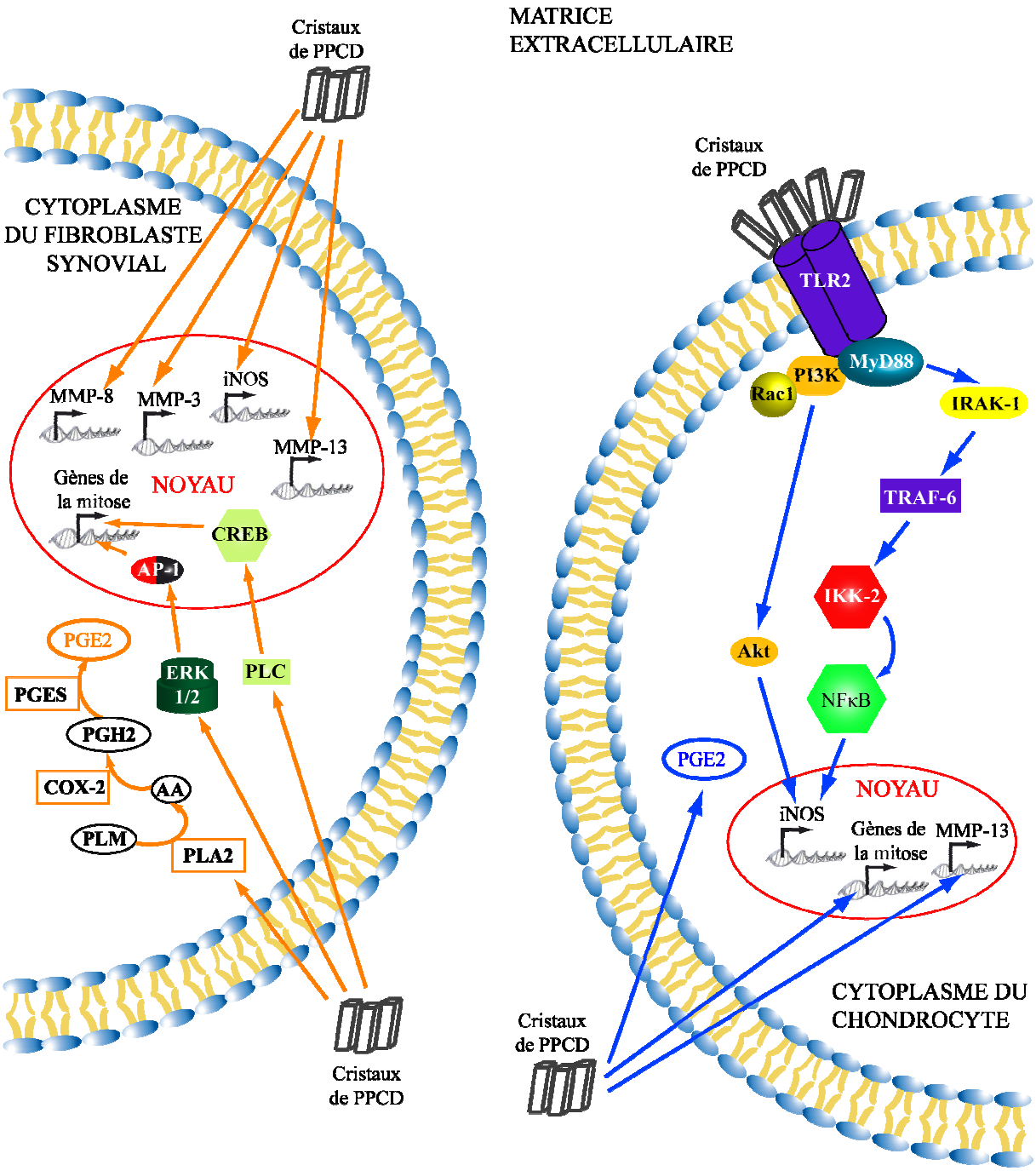


Figure 12: Effet des cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (PPCD) sur les fibroblastes synoviaux et les chondrocytes

→ : activation ⊣ : inhibition

AA : acide arachdonique ; PGES : PGE synthase ; PLM : phospholipide membranaire

II.B.2.a. Revue sur les formes familiales de CCA : article 1

Nous avons voulu faire un point sur les formes familiales de CCA, directement liées à des mutations "gain de fonction" du gène *Ank*, dans la revue ci-après parue dans *La revue du Rhumatisme* en 2006 intitulée « Chondrocalcinoses familiales : nouvelles approches physiopathologiques » (Cailotto et *al.*, 2007, Revue du Rhumatisme, 74, 177–182).

ELSEVIER MASSON

Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Revue du Rhumatisme 74 (2007) 177–182

REVUE DU RHUMATISME

http://france.elsevier.com/direct/REVRHU/

Chondrocalcinoses articulaires familiales : nouvelles approches physiopathologiques

Familial articular chondrocalcinosis: new pathogenic insights

Frédéric Cailotto[a], Arnaud Bianchi[a], Sylvie Sebillaud[a], Pierre Gillet[a], Damien Loeuille[a,b], Jean-Yves Jouzeau[a], Patrick Netter[a,*]

[a] *Laboratoire de physiopathologie et pharmacologie articulaires, UMR 7561, CNRS–Université Henri-Poincaré–Nancy-I, faculté de médecine, BP 184, avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

[b] *Service de rhumatologie, CHU de Nancy, France*

Reçu le 27 juillet 2006 ; accepté le 28 novembre 2006

Disponible sur internet le 19 décembre 2006

Mots clés : Chondrocalcinose ; Pyrophosphate inorganique ; Mutations ; ANKH

Keywords: Chondrocalcinosis; Inorganic pyrophosphate; Mutations; ANKH

1. Introduction

C'est en 1957, lors du IXe congrès international des maladies rhumatismales à Toronto, que Sitaj et Zitnan décrivent une nouvelle maladie dont la caractéristique essentielle est l'incrustation calcique des cartilages hyalins et des fibrocartilages ; ils l'appellent chondrocalcinose articulaire (CCA) et soulignent son caractère familial à partir de leurs 14 observations [1].

Les travaux de Mc Carty [2] réalisés quelques années plus tard chez des patients souffrant d'une arthrite aiguë pseudogoutteuse du genou ont permis d'identifier dans le liquide synovial des microcristaux, différents de ceux d'urate monosodique monohydratés impliqués dans les crises de goutte : les cristaux de pyrophosphate de calcium dihydratés (PPCD) [3].

La chondrocalcinose s'observe dans des circonstances très diverses, ce qui suppose qu'elle répond à des mécanismes pathogéniques différents. On distingue en effet des *formes sporadiques* qui accompagnent le vieillissement articulaire, des *formes associées à des maladies généralement métaboliques* (hyperparathyroïdie primitive, hypophosphatasie, hypercalcémie familiale hypocalciurique, hémochromatose, amylose, hypomagnésémie [4]) et des *formes familiales* (Fig. 1).

Depuis cette époque, de nombreuses études ont permis de décrire la CCA familiale, qui est la forme la plus pure et la plus complète dans son expression clinique, radiologique et biologique [5].

2. Caractéristiques cliniques et radiologiques des chondrocalcinoses familiales

Ces affections chroniques se caractérisent par des accès articulaires aigus, la présence des microcristaux de PPCD dans le liquide synovial, le cartilage et les tissus périarticulaires et une incrustation calcique du cartilage et des fibrocartilages [6–8].

Une cinquantaine de familles sont actuellement répertoriées (Canada, Chili, Espagne, États-Unis, Hollande, Suède, République Tchèque, Argentine, Italie, Israël, Suisse, Allemagne, Japon, Tunisie, France [5] ...).

Trois formes cliniques peuvent être décrites :

- les formes *précoces* sont les plus facilement reconnues et sont caractérisées par des atteintes articulaires et rachidiennes étendues et une évolution lente. Elles se traduisent souvent par une arthrite aiguë pseudogoutteuse qui peut être déclenchée par un exercice inhabituel, un traumatisme ou une intervention chirurgicale. Cette arthrite évolue souvent vers la guérison en une ou deux semaines mais peut se répéter plusieurs fois par an. Ces accès fluxionnaires sont en général monoarticulaires. Dans les familles alsaciennes, ils

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : netter@medecine.uhp-nancy.fr (P. Netter).

1169-8330/$ - see front matter © 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
doi:10.1016/j.rhum.2006.11.009

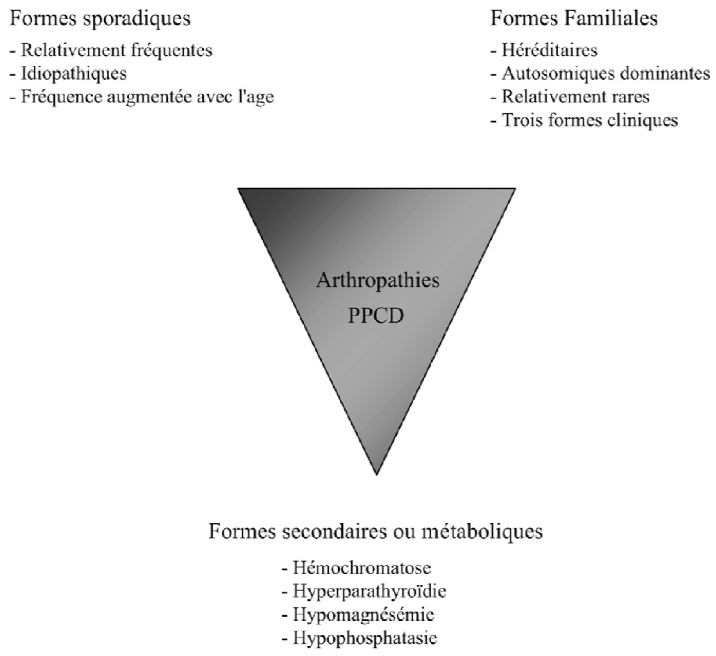


Fig. 1. Les diverses formes de chondrocalcinoses articulaires.

sont plus souvent localisés au genou (68 %), à l'épaule (55 %) ou au poignet (55 %). Les atteintes de la cheville ou de la hanche sont plus rares.

Il faut noter que les accès rachidiens (48 %) sont assez fréquents avec des épisodes de lumbalgies ou de cervicalgies aiguës [6,8].

Les premières crises débutent entre 30 et 40 ans, les accès inflammatoires se répètent avec une atteinte qui devient polyarticulaire et des atteintes articulaires chroniques compliquées de déformations et d'ankylose.

Il faut noter que cette forme est observée également dans les familles canadiennes, suédoises, mexicano-américaines, argentines et hollandaises [5].

- une deuxième forme *plus invalidante* de chondrocalcinose est observée dans les familles tchèques, chiliennes, argentines et espagnoles.
- une troisième forme est à *début plus tardif* avec atteinte oligoarticulaire dans les familles espagnoles.

D'un point de vue radiologique, la CCA se manifeste par une opacification stratifiée ou granuleuse, de tonalité calcique, des cartilages de revêtement épiphysaire, des fibrocartilages et de certains tendons, ligaments, aponévroses et synoviales (Fig. 2) [9].

Dans les formes familiales, les calcifications sont souvent symétriques, étendues à des articulations moins souvent atteintes dans les formes sporadiques (sacro-iliaque, acromioclaviculaire, et tibio-astragalienne notamment) [7]. Des atteintes de l'articulation péronéotibiale peuvent également être observées. Il existe certains aspects très caractéristiques des CCA : opacification du bourrelet glénoïdien et du bourrelet cotyloïdien, calcification du ligament triangulaire du carpe, calcifications allongées du tendon d'Achille et de l'aponévrose plantaire, bande verticale opaque de la symphyse pubienne, incrustation calcique des disques intervertébraux [7,9]…

3. Caractéristiques biologiques

Le diagnostic de chondrocalcinose articulaire se base sur la mise en évidence de microcristaux de PPCD dans le liquide synovial par observation microscopique en lumière polarisée. De plus, une observation en microscopie électronique à balayage couplée à une diffraction aux rayons X a permis une identification formelle de ces microcristaux dans la famille alsacienne et a démontré qu'ils sont uniquement constitués de PPCD dans leur forme triclinique [10].

Le système cristallin triclinique a pour élément de base un parallélépipède à base losangique (trois axes de longueur inégale et formant entre eux des angles différents de 90°) et se distingue ainsi du système cristallin monoclinique, dont l'élément de base est un prisme oblique à base losangique (trois axes de longueur inégale, dont deux forment un angle différent de 90°, le troisième leur étant perpendiculaire).

4. Génétique des chondrocalcinoses articulaires familiales

Dans la plupart des formes familiales, une transmission autosomique dominante a été démontrée avec un degré de pénétrance important. Les premières études génétiques ont

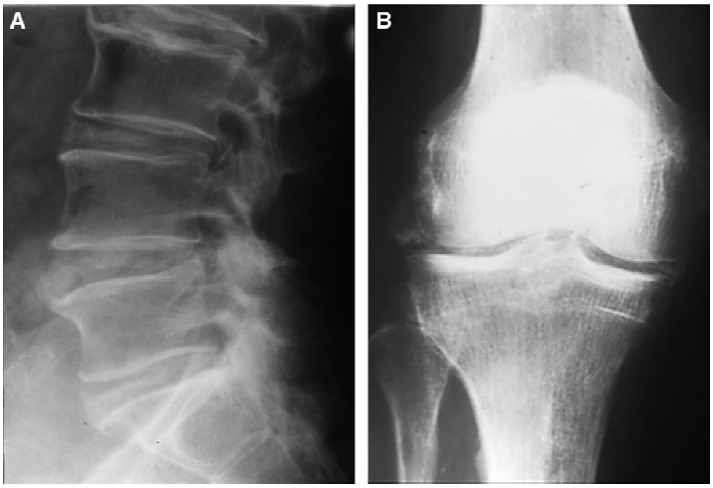


Fig. 2. Chondrocalcinose articulaire familiale : radiographies du rachis lombaire de profil (A) et du genou de face (B).

concerné une éventuelle relation avec l'haplotype HLA, rapportée dans des formes tchèques et tunisiennes, mais qui n'a pas été démontrée dans les autres familles atteintes de chondrocalcinose [11]. Récemment, une CCA à transmission autosomique dominante à faible degré de pénétrance et sans relation avec l'haplotype HLA a été mise en évidence au sein d'une autre famille tunisienne [12].

Grâce aux progrès de la génétique moléculaire, deux formes de chondrocalcinose familiale primitive ont été identifiées : les formes liées au bras long du chromosome 8 (8q), associées à une arthrose sévère précoce (CCAL1), et les formes liées au bras court du chromosome 5 (5p), concernant en particulier les formes alsaciennes, argentines et anglaises (CCAL2) [13, 14]. Toutes ces formes familiales sont différentes des familles chiliennes, qui se caractérisent par leur consanguinité due à l'isolement insulaire, ainsi qu'une arthrose sévère et précoce avec dysplasie spondyloépiphysaire et chondrocalcinose diffuse, associées à une mutation hétérozygote du gène du procollagène de type II (COL2A1) [15].

Plusieurs analyses de liaison génétique on été réalisées entre les locus CCAL1, CCAL2 et COL2A1 pour tenter de mettre en évidence une corrélation entre certains gènes et l'apparition des chondrocalcinoses familiales.

Une étude ayant porté sur une famille américaine a permis d'exclure une liaison entre le locus COL2A1 et les chondrocalcinoses familiales, tout en mettant en évidence une liaison génétique de la pathologie avec le locus CCAL1 [16]. Il a malheureusement été impossible de mettre en évidence un gène candidat au sein de ce locus, du fait de sa taille importante (25 millions de paires de bases [17]). Il faut signaler que la liaison entre CCAL1 et les chondrocalcinoses familiales n'a été retrouvée qu'au sein de cette famille.

L'équipe de Ho [18] a démontré à l'aide de souris *ank⁻/ank⁻* qu'un gène, le gène *ank*, était localisé au niveau d'une région très similaire au chromosome 5p chez l'Homme. Des mutations de ce gène sont associées à des dépôts pathologiques articulaires d'hydroxyapatite. La même équipe a démontré que le gène *ankh* (homologue humain du gène *ank*) était situé sur le chromosome 5p, au même niveau qu'un marqueur du locus CCAL2. Les travaux de Pendleton [19] et Williams [20] mirent respectivement en évidence au sein des familles alsaciennes, anglaises et argentines l'implication d'anomalies du gène *ankh* dans la CCA familiale.

L'implication du gène *ank* dans une arthropathie microcristalline, ainsi que la localisation du gène *ankh* au sein du locus CCAL2, ont entraîné de nombreuses études sur la régulation et le rôle de ce gène, ainsi que son produit : la protéine ANKH.

5. Physiopathologie

5.1. Dépôts de PPCD

Les dépôts périarticulaires de PPCD et leur présence au sein du liquide synovial, caractéristiques des chondrocalcinoses, sont étroitement liés au métabolisme du pyrophosphate inorganique (PPi) du chondrocyte articulaire. Les travaux de Lust démontrèrent dès 1981 que la concentration en PPi intracellulaire doublait au sein de lymphocytes et fibroblastes en culture prélevés chez des patients de la famille alsacienne [21]. Plusieurs acteurs interviennent dans ce métabolisme, tant dans la génération que dans la diminution du PPi (Fig. 3).

L'augmentation de PPi extracellulaire (ePPi) est notamment induite par une protéine membranaire à activité pyrophosphohydrolase : la glycoprotéine PC-1. Cette enzyme hydrolyse la première liaison phosphodiester des nucléotides triphosphates (NTP), générant ainsi leur homologue monophosphate et une molécule de PPi [22]. L'autre protéine impliquée dans l'augmentation d'ePPi est la protéine ANKH, qui agit comme un transporteur de PPi de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule [18].

Du point de vue de la diminution d'ePPi, les principaux acteurs sont les phosphatases alcalines et les transporteurs de phosphate inorganique (Pi). Les phosphatases alcalines TNAP

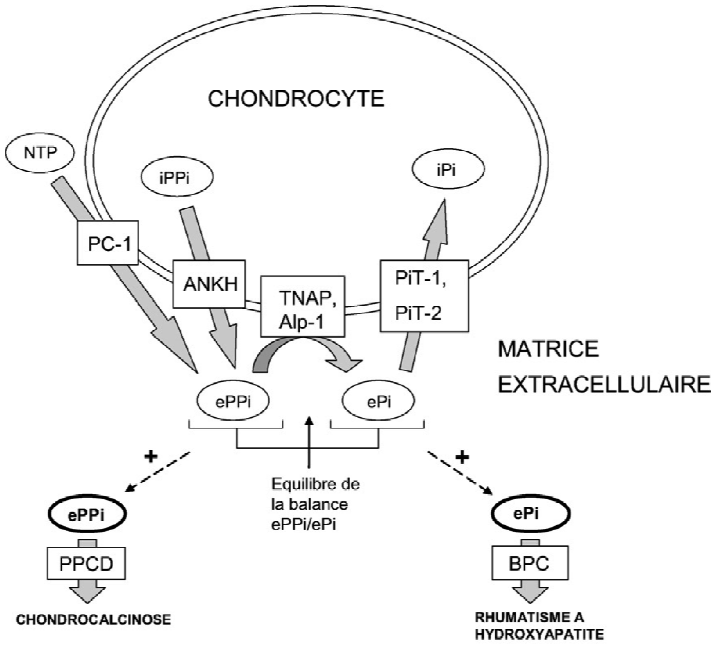


Fig. 3. Métabolisme du pyrophosphate inorganique (PPi) et du phosphate inorganique (Pi) dans le chondrocyte. **BPC** : cristaux basiques de phosphate de calcium ; **PPCD** : cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté ; **ePi** : Pi extracellulaire ; **ePPi** : PPi extracellulaire ; **iPi** : Pi intracellulaire ; **iPPi** : PPi intracellulaire ; **NTP** : nucléotide triphosphate ; **PC-1** : protéine de la membrane plasmique-1 ; **PiT-1,-2** : transporteur de Pi ; **TNAP** : phosphatase alcaline tissu non-spécifique.

(*phosphatase alcaline tissu non-spécifique*) et Alp-1 ont une large gamme de substrats (grande variété de nucléotides, ainsi que le PPi), qu'ils métabolisent en clivant le groupe phosphate terminal, générant ainsi du Pi extracellulaire (ePi) [23]. Les transporteurs Na^+-dépendants PiT-1 et PiT-2 transfèrent le Pi de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule [24].

Ces différentes protéines influent ainsi sur la balance ePPi/ePi, et par conséquent sur les possibilités de formation de cristaux de PPCD, dans les cas d'excès d'ePPi ou de diminution d'ePi. Une déstabilisation de cette balance dans le sens d'une augmentation d'ePi ou d'une diminution d'ePPi peut conduire à la formation de cristaux basiques de phosphate de calcium (BPC).

5.2. Fonction de la protéine ANKH

La structure putative de la protéine ANKH a été établie par Ho et ses collaborateurs à l'aide de l'algorithme de Kyte-Doolittle [18]. Cette protéine de 492 acides aminés aurait une masse moléculaire de 55 kDa et effectuerait dix passages transmembranaires, et chaque région transmembranaire serait longue de 20 acides aminés.

La protéine ANKH intervient dans le métabolisme du PPi en le transportant de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, créant ainsi une augmentation d'ePPi ; de ce fait, ANKH entre directement en jeu dans la formation des cristaux de PPCD (de formulation chimique $Ca_2P_2O_7$, $2H_2O$) (Fig. 4).

La découverte de différentes mutations chez des patients atteints d'une forme familiale de chondrocalcinose a permis d'étudier la corrélation de la pathologie avec d'éventuelles modifications d'ANKH.

Ainsi, quatre mutations ont pu être mises en évidence à compter de 2001 (Fig. 5). Au sein d'une famille anglaise, la substitution d'une cytosine par une thymine en position-11 au niveau de la région 5′ transcrite non traduite de l'ARN prémessager ankh insère un nouveau codon ATG d'initiation de la traduction, ce qui produira une protéine ANK11 plus longue de quatre acides aminés [19,25]. Dans cette famille, la substitution de la cytosine en position-11 par une thymine était également associée à l'apparition de lésions cérébrales pouvant, dans certains cas, conduire à des états de mal convulsif [26].

Au sein des familles alsaciennes, une mutation faux-sens d'une thymine en cytosine en position 143 (dans le second exon) provoque le changement de la méthionine 48 en thréonine [19,27]. Pendleton et ses collaborateurs ont ainsi émis l'hypothèse que ces deux mutations pourraient induire un gain de fonction d'ANKH, et de ce fait augmenterait l'ePPi, ce qui peut provoquer une augmentation des dépôts de PPCD et le développement à long terme d'une chondrocalcinose [19].

Deux autres types de mutations ont été mises en évidence par des études de Williams et al. : au sein d'une famille argentine, une mutation faux-sens d'une cytosine en thymine en position 14 (dans le premier exon), induisant un changement de la proline 5 en leucine [20], et, au sein de deux familles américaines, une mutation faux-sens d'une cytosine en adénine en position 13 (dans le premier exon), induisant un changement de la proline 5 en thréonine [28].

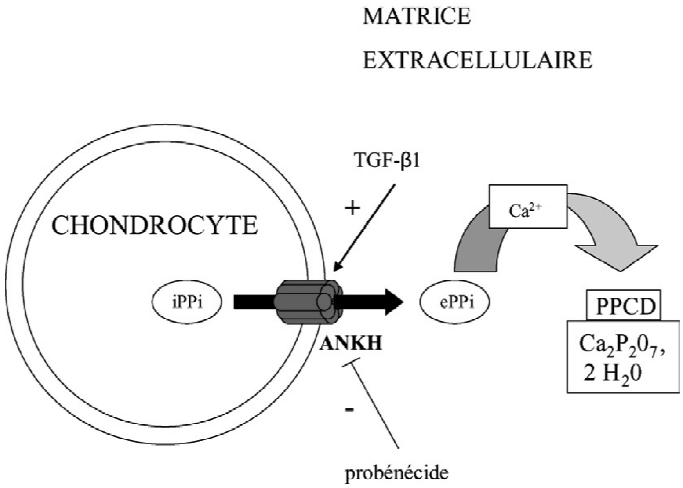


Fig. 4. Rôle de la protéine ANKH dans la formation des cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté (**PPCD**) entraînant les chondrocalcinoses. **ePPi** : pyrophosphate inorganique extracellulaire ; **iPPi** : pyrophosphate inorganique intracellulaire ; **TGF-β1** : facteur de croissance transformant-bêta 1.

Localisation génique	Effet sur le gène	Effet éventuel sur la protéine	Association à un effet physiologique éventuel	Origine des familles	Références Bibliographique
Région 5' transcrite non traduite	-11 C→T	Nouveau codon d'initiation de la traduction (+4 acides aminés)	**Hypothèse d'un gain de fonction** s'exprimant par une augmentation d'ePPi	**Anglaise**	19, 25
1er exon	13 C→A	5 Pro→Thr		**Américaine** (originaires d'Angleterre et de Suisse/Allemagne)	28
1er exon	14 C→T	5 Pro→Leu		**Argentine** (originaire d'Italie)	20
2ème exon	143 T→C	48 Met→Thr		**Alsacienne**	19, 27

Fig. 5. Récapitulatif des différentes mutations identifiées à ce jour au niveau du gène *ankh*. Le tableau regroupe la localisation génique, l'effet au niveau de l'ADN, les éventuels effets sur la protéine et la physiologie de la cellule, ainsi que les familles au sein desquelles ont été identifiées les mutations et les publications dans lesquelles ces dernières ont été reportées.

Les résultats des ces deux études sont en accord avec l'hypothèse que les quatre mutations décrites ci-dessus pourraient provoquer un gain de fonction de la protéine ANKH, favorisant l'apparition de cristaux de PPCD et le développement d'une chondrocalcinose. Un des enjeux majeurs semble donc de réguler le métabolisme du PPi pour prévenir l'apparition des dépôts.

Il est également intéressant de citer les implications du gène *ankh* dans d'autres pathologies. En effet, les travaux de Nürnberg et collaborateurs en 2001 évoquent des mutations hétérozygotes au sein du gène *ankh*, pouvant engendrer entre autre une délétion de la phénylalanine 377 ou une substitution de la glycine 389 en arginine, associées à une dysplasie craniométaphysaire [29].

L'équipe de Tsui a démontré deux ans plus tard l'association de deux sites polymorphes dans la région flanquante 5′ du gène *ankh* avec des cas de spondylarthrite ankylosante au sein des 124 familles touchées par cette pathologie [30].

Enfin, des mutations ponctuelles (substitution d'une adénine en guanine) ont été identifiées au niveau du début du promoteur du gène *ankh* dans des formes sporadiques de chondrocalcinoses, entraînant une surexpression de l'ARN messager et de la protéine ANKH [31].

Les travaux de physiopathologie et de génétique réalisés dans les formes familiales de CCA permettent de mieux comprendre les mécanismes cellulaires de cette pathologie et ouvrent la voie à des approches thérapeutiques nouvelles. Ces formes familiales, bien que relativement rares, sont particulièrement intéressantes pour aider à comprendre la chondrocalcinose qui est relativement fréquente et aider à mettre en évidence de nouvelles approches thérapeutiques.

Remerciements

Soutien financier CPRC et PHRC du CHU de Nancy-Brabois.

Références

[1] Sitaj S, Zitnan D. Calcification multiple du cartilage articulaire (étude clinique et radiologique). In: Ninth International Congress on Rheumatic Diseases. 1957 (Toronto).

[2] Mc Carty DJ, Kohn NN, Faires JS. The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the "pseudogout syndrome". I. Clinical aspects. Ann Intern Med 1962;56:711–33.

[3] Kohn NN, Hughes RE, Mccarty Jr. DJ, Faires JS. The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the "pseudogout syndrome". II. Identification of crystals. Ann Intern Med 1962;56:738–45.

[4] Richette P, Ayoub G, Bardin T, Bouvet S, Orcel P, Badran AM. Hypomagnesemia and chondrocalcinosis in short bowel syndrome. J Rheumatol 2005;32:2434–6.

[5] Reginato AJ, Reginato AM, Fernandez-Dapica MP, Ramachandrula A. Les formes familiales de chondrocalcinose (maladie des dépôts de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydraté ou goutte à pyrophosphate de calcium). Revue générale. Rev Rhum 1995;62:397–412.

[6] Netter P, Loeuille D, Jouzeau JY, Gillet P, Peterschmitt J, Pourel J, et al. Les chondrocalcinoses articulaires familiales : étude d'une famille alsacienne. Bull Acad Natl Med 2001;185:417–26.

[7] Netter P, Loeuille D, Gillet P, Jonveau P, Bordji K, Sabolovic N, et al. Les chondrocalcinoses articulaires : état actuel des recherches concernant les formes familiales. Rev Rhum 1999;66:68S–71S.

[8] Netter P, Bardin T, Bianchi A, Richette P, Loeuille D. Gène *ankh* et chondrocalcinose articulaire familiale. Rev Rhum 2004;71:740–4.

[9] Gaucher A, Faure G, Netter P, Pourel J. Les chondrocalcinoses articulaires familiales. Presse Med 1986;15:250–4.

[10] Faure G, Netter P, Malaman B, Steinmetz J, Gaucher A. Hereditary pyrophosphate arthropathy. Scand J Rheumatol 1981;10:159–60.

[11] Netter P, Faure G, Pourel J, Raffoux C, Janot J, Schooneman F. Chondrocalcinose articulaire familiale diffuse à caractère familial. Presse Med 1975;39:2814.

[12] Béjia I, Rtibi I, Touzi M, Zrour S, Youmes M, Naceur B. La chondrocalcinose articulaire familiale : à propos d'une famille tunisienne. Rev Rhum 2004;71:782–9.

[13] Hughes AE, McGibbon D, Woodward E, Dixey J, Doherty M. Localisation of a gene for chondrocalcinosis to chromosome 5p. Hum Mol Genet 1995;4:1225–8.

[14] Andrew LJ, Brancolini V, de la Pena LS, Devoto M, Caeiro F, Marchegiani R, et al. Refinement of the chromosome 5p locus for familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease. Am J Hum Genet 1999;64:136–45.

[15] Williams CJ, Considine EL, Knowlton RG, Reginato AM, Neumann G, Harrison D, et al. Spondyloepiphyseal dysplasia and precocious osteoarthritis in a family with an arg75-to-cys mutation in the procollagen type II gene (COL2A1). Hum Genet 1993;92:499–505.

[16] Baldwin CT, Farrer LA, Adair R, Dharmavaram R, Jimenez S, Anderson L. Linkage of early-onset osteoarthritis and chondrocalcinosis to human chromosome 8q. Am J Hum Genet 1995;56:692–7.

[17] Zaka R, Williams CJ. Genetics of chondrocalcinosis. Osteoarthritis Cartilage 2005;13:745–50.

[18] Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. Science 2000;289:265–70.

[19] Pendleton A, Johnson MD, Hughes A, Gurley KA, Ho AM, Doherty M, et al. Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis. Am J Hum Genet 2002;71:933–40.

[20] Williams CJ, Zhang Y, Timms A, Bonavita G, Caeiro F, Broxholme J, et al. Autosomal dominant familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease is caused by mutation in the transmembrane protein ANKH. Am J Hum Genet 2002;71:985–91.

[21] Lust G, Faure G, Netter P, Gaucher A, Seegmiller JE. Increased pyrophosphate in fibroblasts and lymphoblasts from patients with hereditary diffuse articular chondrocalcinosis. Science 1981;214:809–10.

[22] Goding JW, Terkeltaub R, Maurice M, Deterre P, Sali A, Belli SI. Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family. Immunol Rev 1998; 161:11–26.

[23] Tenenbaum J, Muniz O, Schumacher HR, Good AE, Howell DS. Comparison of phosphohydrolase activities from articular cartilage in calcium pyrophosphate deposition disease and primary osteoarthritis. Arthritis Rheum 1981;24:492–500.

[24] Kavanaugh MP, Kabat D. Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family. Kidney Int 1996;49:959–63.

[25] Pendleton A, Johnson M, Ho A, Gurley K, Kingsley D, Wright GD, et al. A heterozygous mutation in human *ank* gene in a British family with adult-onset chondrocalcinosis due to calcium pyrophosphate crystal deposition. Arthritis Rheum 2001;9(Suppl):S101.

[26] McKee S, Pendleton A, Dixey J, Doherty M, Hughes A. Autosomal dominant early childhood seizures associated with chondrocalcinosis and a mutation in the *ankh* gene. Epilepsia 2004;45:1258–60.

[27] Johnson M, Ho A, Mc Grath R, Netter P, Loeuille D, Gillet P, et al. Analysis of the *ank* gene reveals a heterozygous missense mutation in a French family with calcium pyrophosphate deposition disease (CPPDD). Arthritis Rheum 2001;9(Suppl):S161.

[28] Williams CJ, Pendleton A, Bonavita G, Reginato AJ, Hughes AE, Peariso S, et al. Mutations in the amino terminus of ANKH in two US families with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease. Arthritis Rheum 2003;48:2627–31.

[29] Nürnberg P, Thiele H, Chandler D, Höhne W, Cunningham ML, Ritter H, et al. Heterozygous mutations in *ankh*, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia. Nat Genet 2001;28:37–41.

[30] Tsui FW, Tsui HW, Cheng EY, Stone M, Payne U, Reveille JD, et al. Novel genetic markers in the 5'-flanking region of ANKH are associated with ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 2003;48:791–7.

[31] Zhang Y, Johnson K, Russell RG, Wordsworth BP, Carr AJ, Terkeltaub RA, et al. Association of sporadic chondrocalcinosis with a -4-base-pair G-to-A transition in the 5'-untranslated region of ANKH that promotes enhanced expression of ANKH protein and excess generation of extracellular inorganic pyrophosphate. Arthritis Rheum 2005;52:1110–7.

II.B.2.b. Les formes sporadiques de CCA

Il s'agit des formes les plus fréquentes de CCA. Plusieurs études ont ainsi démontré une prévalence dans la population générale variant de 7 à 10 % des personnes de plus de 60 ans selon les études (Felson *et al.*, 1989 ; Sanmarti *et al.*, 1993 ; Neame *et al.*, 2003). La caractéristique principale des CCA sporadiques est que leur fréquence d'apparition augmente significativement avec l'âge des patients (Ryan et McCarty, 1997 ; Doherty, 2003). Il apparaît cependant que la fréquence d'apparition de cette pathologie est indépendante du sexe (Neame *et al.*, 2003). Une autre étude réalisée en 2006 a démontré qu'il existait des différences entre les ethnies, puisque la prévalence chez les chinois variait de 1,8 à 2,7%, comparativement aux américains pour lesquels la prévalence variait entre 6,2 et 7,7% (Zhang *et al.*, 2006), les auteurs postulant que la différence observée ne proviendrait peut être pas des différences inter-ethniques, mais plutôt de la quantité de calcium contenue dans l'eau du robinet à Pékin. Celle-ci (plus élevée qu'aux Etats-Unis) induirait une diminution de la parathormone, ce qui diminuerait la prévalence de la CCA en Chine.

Il a également été démontré dans plusieurs études que les CCA sporadiques étaient significativement associées à d'autres mutations que celles retrouvées dans les formes familiales de CCA. L'une d'elle a clairement permis de démontrer que la mutation G en A en -4 dans la région 5' transcrite non traduite (5'UTR) de l'ARNm d'Ank était associée à l'apparition de CCA sporadique dans une population de 128 patients. Une approche de transfection de chondrocytes avec un plasmide portant cette mutation a permis de confirmer in vitro une augmentation d'ePPi supérieure à celle obtenue avec la séquence contrôle ANK (Zhang *et al.*, 2005). Une autre étude, très récente, a étudié l'effet d'une mutation non-sens ΔE490 (arrêt de la traduction à partir du 490ème acide aminé) (Wang *et al.*, 2008). Les cellules ATDC5 ont été transfectées avec un plasmide de surexpression (avec un *myc*-tag) de cette forme mutée d'*AnkΔE490* ou de la forme sauvage d'*Ank*. Or les auteurs démontrent que non seulement, les cellules expriment environ cinq fois plus la protéine mutée ANKΔE490-myc qu'ANK-myc de type sauvage, mais aussi que les activités phosphatase alcaline mesurées sont environ deux fois moins importantes, semblant indiquer que la mutation ΔE490 favorise l'expression d'ANK, tout en diminuant l'activité de la TNAP. Ce double effet provoque donc une augmentation d'ePPi tout en diminuant l'ePi, ce qui est en faveur de la cristallogenèse des microcristaux de PPCD.

Un autre élément essentiel à prendre en considération dans la fréquence d'apparition des CCA sporadiques est l'influence du TGF-β1. Il s'agit d'un facteur de croissance ayant été

décrit comme augmentant la production d'ePPi par les chondrocytes en culture (Rosenthal *et al.*, 1993). De plus, il a été démontré que l'amplitude de réponse des chondrocytes au TGF-β1 augmente avec l'âge des patients desquels ils proviennent (Guerne *et al.*, 1995), et que le TGF-β1 stimule la production d'ePPi par les chondrocytes articulaires de manière plus importante chez les patients âgés comparativement aux personnes plus jeunes (Rosen *et al.*, 1997). Ces effets ont été fortement corrélés à la prévalence des CCA sporadiques, qui augmente avec l'âge des patients (Ryan et McCarty, 1997). De précédentes études ont permis de démontrer que l'ARNm d'Ank était plus élevé dans des chondrocytes humains stimulés avec du TGF-β1 comparativement aux chondrocytes contrôles (Hirose *et al.*, 2002), tout comme cela était le cas pour le cartilage et le tissu osseux murin (Sohn *et al.*, 2002).

Enfin, il est important de noter que les effets du TGF-β1 peuvent principalement dépendre de deux voies de signalisation cellulaire, la voie dénommée « Smad-dépendante » (Moustakas *et al.*, 2001) et la voie dite « Smad-indépendante » (Moustakas et Heldin, 2005) reposant sur les MAPK et la voie PKC. Dans les deux cas, le TGF-β1 va se lier au TGF receptor II (TGFR II). Cette interaction va permettre le recrutement du TGF receptor I (TGFR I), ce qui va entraîner la phosphorylation de ce dernier sur plusieurs résidus sérines et thréonines du domaine GS (Feng et Derynck, 1997), responsable de la régulation du domaine kinase du TGFR I, qui devient alors actif. C'est à partir de ce moment que les deux voies de signalisation divergent. Pour la voie « Smad dépendante », les protéines Smad associées aux récepteurs (R-Smad), dans le cas du chondrocyte articulaire, il s'agit des Smad 2/3, seront présentées par la protéine Smad-Anchor for Receptor Activation (SARA) au TGFR I. Ce dernier va alors phosphoryler des résidus sérines de Smad 2/3, qui vont alors s'associer à Smad 4, appelée aussi Co-Smad. Le complexe formé par Smad 2/3-Smad 4 va pénétrer dans le noyau ou il pourra agir comme facteur de transcription (Fink *et al.*, 2003). Concernant la voie « Smad indépendante », il a été démontré que le TGFR I était capable d'activer les PKC Ca^{2+}-dépendantes (PKCα/βI) dans le chondrocyte (Sylvia *et al.*, 1994). Plusieurs travaux ont par ailleurs mis en évidence la capacité de PKCα/βI à activer la voie Ras-Raf-MEK (MAPK/ERK kinase) 1/2-ERK 1/2 (Axmann *et al.*, 1998 ; Hirota *et al.*, 2000). En outre, le TGF-β1 peut directement activer la voie des MAPK dans les chondrocytes (Yonekura *et al.*, 1999). Enfin, il a été démontré que la protein kinase A (PKA) pouvait être directement activée par le TGFR I (Sylvia *et al.*, 2000). Un schéma de synthèse des différentes voies de signalisation activables par le TGF-β1 est proposé en figure 13.

Il n'avait pas été démontré avant les travaux réalisés dans ce manuscrit de thèse, quelles pouvaient être les voies de signalisation responsables de l'effet inducteur du TGF-β1

sur l'ARNm d'Ank, ni quelle pouvait être la contribution réelle d'ANK dans la production d'ePPi comparativement à PC-1, l'autre protéine intervenant dans la synthèse d'ePPi.

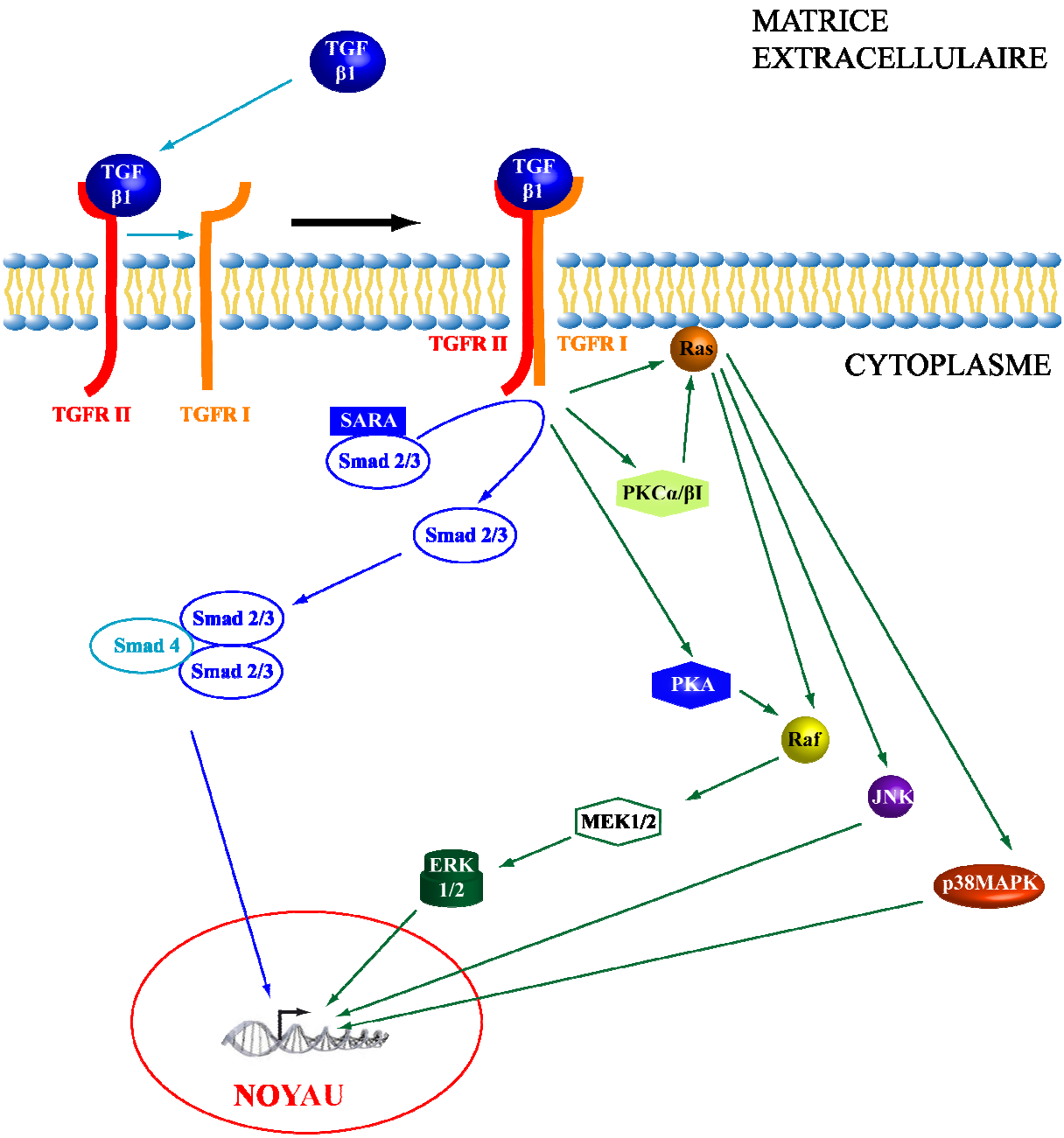


Figure 13: Principales voies de signalisation Smad-dépendantes et Smad-indépendantes activées par le TGF-β1 dans le chondrocyte

II.B.2.c. Les formes secondaires de CCA

Les formes secondaires de CCA sont également appelées formes métaboliques. En effet, la CCA se développe suite à d'autres affections telles que les hypomagnésémies, les hyperparathyroïdies, les hémochromatoses ou encore les hypophosphatasies. Les trois pathologies ayant un lien de causalité établi avec la CCA sont les hypomagnésémies, l'hyperparathyroïdie et l'hémochromatose génétique (Jones *et al.*, 1992).

Les CCA associées à des hypomagnésémies l'ont souvent été à des néphropathies d'origine génétique, telles que le syndrome de Gitelman (Cobeta-Garcia *et al.*, 1998 ; Calo *et al.*, 2000) ou le syndrome de Bartter (Salvarani *et al.*, 1989). Une étude cas-témoin réalisée sur 72 patients a établi une corrélation très forte entre la présence d'une hypomagnésémie sévère, persistante malgré une supplémentation en magnésium, et le diagnostic de CCA (Richette *et al.*, 2007). Une association entre trois cas d'hypomagnésémie indépendants de la génétique, dus au retrait chirurgical d'une partie de l'intestin grêle qui entraîne des problèmes d'absorption des nutriments (Richette *et al.*, 2005), soulignant ainsi un peu plus l'implication du magnésium dans le développement des CCA. L'hypothèse du mécanisme moléculaire reliant l'hypomagnésémie et la CCA repose essentiellement sur le fait que le magnésium soit un cofacteur de la TNAP (qui clive le PPi en deux molécules de Pi, un inhibiteur naturel de la cristallogenèse des cristaux de PPCD), et qu'il soit également connu pour augmenter la solubilité des cristaux de PPCD. Ainsi une hypomagnésémie favoriserait une forte concentration d'ePPi dans l'articulation, tout en empêchant une dissolution naturelle des microcristaux de PPCD (Calo *et al.*, 2000).

Les CCA associées à des hyperparathyroïdies primaires ont une prévalence moyenne de 21% (Bardin et Kuntz, 1988). Ces associations semblent dépendantes du sexe et de l'âge des patients, la prévalence de la CCA augmentant si le patient est une femme, âgée qui plus est (Rynes et Merzig, 1978 ; Huaux *et al.*, 1986). L'hypercalcémie chronique accompagnant l'hyperparathyroïdie primaire n'a jamais pu être corrélée de manière significative avec la prévalence de la CCA (Pritchard et Jessop, 1977 ; McGill *et al.*, 1984), cependant au vu de la composition chimique des microcristaux (BPC et PPCD), il est raisonnable de penser que la concentration en calcium extracellulaire pourrait avoir un rôle essentiel sur la balance PPi/Pi, dont la dérégulation favorise l'apparition des microcristaux. Par ailleurs, une étude portant sur les hypercalcémies hypocalciuriques familiales a permis d'établir une corrélation solide entre une CCA et une hypercalcémie, dans un contexte génétique certes particulier (Volpe *et al.*, 2009). Il semble donc intéressant d'étudier les effets d'une élévation de la concentration de

calcium libre sur l'expression des principales protéines responsables de la génération d'ePPi, autrement dit ANK et PC-1. En effet, il est possible que le calcium puisse avoir un effet inducteur sur l'expression de ces acteurs, ce qui tendrait à favoriser la production d'ePPi qui pourrait alors précipiter très facilement avec le calcium présent en forte concentration. Par ailleurs, le TGF-β1 ayant été décrit comme un important stimulateur de la génération d'ePPi, il est possible que le calcium puisse jouer un rôle sur les effets de ce facteur de croissance.

Les CCA associées à des hémochromatoses génétiques sont principalement dues à une hyperabsorption du fer au niveau du duodénum et du jéjunum proximal. A long terme, une augmentation du niveau de transferrine sérique, provoquant une accumulation progressive du fer dans les tissus. La prévalence de la CCA est d'environ 20%, avec une étude rapportant même une prévalence moyenne de 38 % chez les patients homozygotes C282Y (et de 21 % chez les hétérozygotes) pour le gène *Hfe1* (Pawlotsky *et al.*, 1999). Sur le plan biologique, le mécanisme moléculaire impliqué semble dépendre des propriétés inhibitrices du fer sur l'activité de la TNAP. Une surcharge en fer favoriserait ainsi le développement des CCA en augmentant les niveaux d'ePPi intra-articulaires, et donc la formation des cristaux de PPCD (Wright et Doherty, 1997).

L'association des CCA avec les hypophosphatasies reste à ce jour encore à démontrer. En effet, les cas cliniques sont peu nombreux, mais l'âge des sujets, plutôt jeunes, semble être un argument de poids pour la puissance de la corrélation entre l'hypophosphatasie et la CCA (Chuck *et al.*, 1989 ; Jones *et al.*, 1992 ; Wendling *et al.*, 2001)}

III. Contribution du gène *Ank* dans la régulation du phénotype cellulaire.

Au vu de la position centrale d'ANK dans la balance PPi/Pi, qui a une influence importante sur de nombreuses fonctions métaboliques cellulaires, il semble intéressant d'étudier la contribution du gène *Ank* dans la régulation du phénotype cellulaire. Plusieurs études ont démontré sans ambigüité le rôle d'ANK dans la mise en place du phénotype des érythrocytes, dans la régulation du phénotype ostéoblastique et également dans la modulation du phénotype chondrocytaire.

III.A. Influence d'*Ank* sur le phénotype des érythrocytes

Une vaste étude menée par Wang et collaborateurs a porté sur la fonction d'*Ank* dans l'érythropoïèse (Wang *et al.*, 2007).

Les auteurs ont tout d'abord caractérisé la microcytose caractéristique des globules rouges des souris *ank/ank*, à travers trois constantes globulaires caractéristiques d'un hémogramme. Les globules rouges des souris porteuses de la mutation disposaient d'en moyenne un volume globulaire moyen 20% moins important que celui des souris de type sauvage. Par ailleurs, bien que la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (rapport entre taux d'hémoglobine et nombre de globules rouges) soit également inférieure chez les souris *ank/ank*, aucune différence statistique n'a pu être détectée dans la concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine quantité d'hémoglobine contenue dans un volume donnée d'hématies). Il est intéressant de noter que les souris *ank/ank* possèdent en moyenne plus de globules rouges que les souris de type sauvage, ce qui explique l'absence de différence entre l'hématocrite de ces deux types de souris. Ces résultats ont permis aux auteurs de suggérer que l'expression de la forme mutée d'ANK était associée à une production de globules rouges de moins bonne qualité.

L'étude du profil d'expression protéique au cours de l'érythropoïèse a permis aux auteurs de démontrer qu'ANK était exprimée dans les précurseurs érythropoïetiques, mais pas dans les érythrocytes matures. Ces expériences ont été réalisées à l'aide de la lignée cellulaire K562, qui possède le même potentiel que les cellules souches myéloïdes à s'engager soit vers la différenciation érythrocytaire, soit vers la différenciation mégacaryocytaire. Les auteurs ont réalisé des transfections stables de ces cellules avec un plasmide de surexpression d'ANK (K562-ANK), et ont ensuite évalué l'expression de plusieurs marqueurs protéiques, tels que la cadhérine E et l'endogline (marqueurs de cellules érythroïdes) et la spectrine (marqueur tardif de différenciation érythrocytaire). Les cellules surexprimant ANK expriment également de manière plus importante la cadhérine E et l'endogline en comparaison avec les témoins, et n'expriment pas du tout la spectrine, suggérant qu'une forte expression d'ANK est associée à un phénotype de cellule érythrocytaire immature.

L'activation de la voie de signalisation autocrine induite par la liaison de l'érythropoïétine (EPO) au récepteur à l'EPO (EPO-R) est également une bonne indication concernant l'état de différenciation des cellules érythrocytaires. En effet, l'interaction EPO/EPO-R oriente le phénotype des cellules souches myéloïdes vers un phénotype érythrocytaire. Wang et collaborateurs ont ainsi comparé le niveau d'expression du transcrit

de l'EPO entre les K562 et les K562-ANK, et constaté que cette expression était deux fois plus élevée dans les K562-ANK (transfection stable d'un plasmide de surexpression d'ANK). Par ailleurs, l'interaction de l'EPO avec l'EPO-R est connue pour entraîner l'association de ce récepteur avec la Janus Kinase-2 (JAK-2), et induire de cette façon l'activation des protéines Signal Transducers and Activators of Transcirption (STAT). Des expériences de western blot ont permis de constater que les formes phosphorylées (et donc activées) l'EPO-R et de JAK-2 étaient retrouvées en quantités plus importantes dans les lysats de K562-ANK que dans ceux des contrôles. Enfin, les auteurs ont également pu mettre en évidence une plus forte phosphorylation de STAT5B dans les K562-ANK comparativement aux témoins. Toutes ces expériences permettent de mettre en évidence une activation très forte de la voie autocrine EPO/EPO-R au sein des K562 surexprimant ANK, permettant de corréler le niveau d'expression d'ANK avec l'état d'activation de la voie EPO/EPO-R.

Pour compléter leur étude, les auteurs ont proposé l'hypothèse que la microcytose des globules rouges observée chez les souris *ank/ank* pouvait provenir d'un déficit en synthèse d'EPO. Ainsi, la mesure du niveau d'EPO dans le sérum a permis de démontrer que les souris porteuses de la mutation avaient un sérum contenant moins d'EPO en comparaison aux souris de type sauvage. Wang et collaborateur ont ainsi pu corréler la microcytose avec le niveau d'EPO, lui-même tributaire du niveau d'expression d'ANK.

L'expression d'ANK semble donc essentielle dans la maturation des cellules souches myéloïdes vers des érythrocytes matures. Cependant, ANK n'étant pas détectée dans le protéome des érythrocytes matures, les dernières étapes de la différenciation des érythrocytes immatures vers les érythrocytes matures doivent comporter des mécanismes d'inhibition de l'expression du gène.

III.B. Influence d'*Ank* sur le phénotype des ostéoblastes

L'équipe d'Addison et collaborateurs a établi une corrélation entre le phénotype ostéoblastique et le niveau d'ePPi (Addison *et al.*, 2007). Or les deux principales protéines générant l'ePPi sont l'enzyme PC-1 et ANK, ce qui suggère un lien entre le transporteur de PPi et le phénotype ostéoblastique. Les auteurs démontrent que la stimulation de la lignée MC3T3-E1 avec l'ePPi à une concentration de 0,5 mM induit l'expression de l'ostéopontine, responsable de l'inhibition de la minéralisation du tissu osseux. Ce résultat semble signifier qu'un niveau élevé d'ePPi est défavorable au maintien du phénotype ostéoblastique mature. L'utilisation de lévamisole, inhibiteur de la TNAP et donc de l'hydrolyse de l'ePPi en ePi, a

également permis de mettre en évidence que seul l'ePPi était responsable de l'augmentation d'expression de l'ostéopontine, et non pas l'ePi pouvant provenir de l'hydrolyse de l'ePPi. Les auteurs ont également démontré *via* l'utilisation de Foscarnet que cet effet était indépendant de l'internalisation de l'ePi par les PiT. Par ailleurs, l'utilisation des trois inhibiteurs chimiques de la voie des MAPK, U0126 (inhibiteur de la phosphorylation de MEK 1/2 (et donc d'ERK 1/2)), SB202190 (inhibiteur de p38 MAPK) et SP600125 (inhibiteur de JNK), a permis de démontrer que seules les voies ERK 1/2 et p38 MAPK étaient impliquées dans le mécanisme d'induction de l'ostéopontine par l'ePPi. Enfin, le dernier argument en faveur du rôle de l'ePPi comme antagoniste du phénotype ostéoblastique est sa capacité à diminuer d'approximativement 50% l'activité de la TNAP avec une constante de dissociation Ki de 1,97 mM, diminuant de ce fait la minéralisation de la MEC des cellules osseuses, ce qui est défavorable au maintien de leur phénotype.

Une autre étude très récente menée par le groupe de Thorsten Kirsch a quand à elle permis de directement étudier le rapport entre le gène *Ank* et le phénotype des ostéoblastes (Kirsch *et al.*, 2009).

Les auteurs ont en effet utilisé la lignée cellulaire ostéoblastique MC3T3-E1 pour leur démonstration, cultivée dans un milieu contenant de l'ascorbate et du β-glycerophosphate, connus pour favoriser la synthèse et la minéralisation de la MEC. Les auteurs ont ainsi mis en évidence une très forte expression d'*Ank* pendant les trois jours suivant l'ajout de ce milieu de différenciation. L'expression d'ANK commençait alors à décroître pendant 17 jours, jusqu'à l'apparition significative d'une minéralisation de la MEC. La transfection des MC3T3-E1 avec une séquence de small interference RNA (siRNA) dirigée contre *Ank*, avant de placer les cellules dans le milieu de différenciation, a permis de démontrer que les MC3T3-E1 contrôles (transfectées avec la séquence de siRNA « scramble ») exprimaient de façon plus importante l'expression de l'ARNm des marqueurs de différenciation osseuse tels que la TNAP, le collagène de type I et l'ostéocalcine, comparativement aux cellules transfectées avec le siRNA dirigé contre *Ank*. Ce résultat suggère le rôle d'*Ank* dans la mise en place du phénotype ostéoblastique. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'expression d'*Osterix*, gène contrôlant le passage des précurseurs ostéoblastiques vers le phénotype d'ostéoblaste immature, était également diminuée dans les cellules transfectées avec le siRNA dirigé contre *Ank*.

Un autre point essentiel de l'étude est que l'invalidation transitoire d'*Ank* provoque l'augmentation de l'expression de RUNX-2, facteur de transcription impliqué dans le maintien du phénotype ostéoblastique. Bien que ce résultat semble contradictoire, les auteurs

signalent que la surexpression de *Runx-2* dans les ostéoblastes immatures conduit à un phénotype pathologique du tissu osseux (ostéopénie), suggérant que le niveau d'expression de *Runx-2* doive diminuer afin d'assurer la mise en place du phénotype ostéoblastique sain. Cette hypothèse corroborerait donc l'importance du rôle d'*Ank* dans la mise en place du phénotype ostéoblastique.

L'utilisation d'acide phosphoformique (Foscarnet), inhibiteur du transport de Pi par les PiT, a permis d'étudier l'influence de la concentration en ePi sur le différenciation ostéoblastique des MC3T3-E1. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence une diminution de l'activité TNAP par l'accumulation d'ePi après stimulation des cellules avec le Foscarnet. L'hypothèse résultant de cette observation est que ce n'est pas l'ePPi qui est en cause dans la modulation du phénotype ostéoblastique, mais plutôt l'ePi provenant de l'hydrolyse du PPi par la TNAP, qui aurait une action sur le génome des cellules *via* son internalisation par les PiT. Les auteurs n'ont cependant pas tenté de complémenter le milieu extracellulaire avec de l'ePPi exogène, ce qui aurait peut-être pu apporter un premier élément de réponse concernant leur hypothèse.

Une autre expérience de comparaison du processus de différenciation des ostéoblastes a été réalisée à partir des cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC) provenant des souris *ank/ank* en comparaison avec les cellules provenant des souris de type sauvage. L'induction du processus de différenciation des ostéoblastes, évaluée par la coloration de Von Kossa par les auteurs, est rendue possible par addition d'ascorbate de phosphate (ascorbate-2-phosphate) dans le milieu de culture. Il a été mis en évidence qu'après 35 jours de culture, les cellules provenant des souris porteuses de la mutation *ank* exhibaient nettement moins la coloration noirâtre caractéristique des sels de calciums que les cellules des souris de type sauvage. Ces résultats étaient également en faveur d'un rôle déterminant d'*Ank* dans la mise en place du phénotype ostéoblastique.

Il se dégage donc de ces deux différentes études qu'un certain niveau d'ePPi, assuré en partie par ANK, semble essentiel dans les stades précoces du processus de différenciation des ostéoblastes, notamment lors de la transition des précurseurs ostéoblastiques vers les ostéoblastes immatures. Cependant, il apparaît également qu'une surexpression d'ANK ou un gain de fonction de cette protéine (résultant tous deux en un excès d'ePPi) semble délétère au maintien du phénotype ostéoblastique.

III.C. Influence d'*Ank* sur le phénotype des chondrocytes

Une étude très élégante menée par le groupe de Robert Terkeltaub a porté entre autres sur la fonction d'*Ank* dans la chondrogenèse (Johnson *et al.*, 2005). Les auteurs ont mis en évidence un tel phénomène lors de l'étude des calcifications artérielles. En effet, les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) possèdent un potentiel de transdifférenciation vers un phénotype chondrocytaire (chondrocyte hypertrophique). Lors de leurs travaux, il a été démontré par RT-PCR la présence de collagène de type II au sein du tissu aortique des souris *ank/ank*, mais pas chez les souris de type sauvage. Par ailleurs, la présence de chondrocytes hypertrophiques a pu être détectée au sein des aortes des souris porteuses de la mutation *ank*, notamment par la mise en évidence de marqueurs caractéristiques tels que l'ostéocalcine ou encore le facteur de transcription Cbfa 1, qui n'ont pas pu être détectés au sein des aortes des souris de type sauvage. Ces résultats suggèrent qu'un défaut de fonctionnement d'ANK, et donc un niveau diminué d'ePPi, sont très favorables à la différenciation cellulaire vers un phénotype de chondrocyte hypertrophique.

De récents travaux de la même équipe de recherche ont aboutit à des conclusions similaires (Johnson *et al.*, 2008). Les auteurs ont basé leurs expériences sur l'utilisation de BMSC des souris *ank/ank*, ainsi que des cellules souches mésenchymateuses (MSC) provenant de la sélection des BMSC dans leurs expériences. Les analyses réalisées dans cette étude ont permis la mise en évidence d'un plus grand nombre de cellules multipotentes (environ 70%) parmi la population des BMSC des souris porteuses de la mutation *ank* comparativement aux souris de type sauvage. Par ailleurs, après deux semaines de culture de ces cellules dans un milieu non-inducteur de la chondrogenèse, seules les BMSC porteuses de la mutation avaient développé des nodules de condensation, caractéristiques d'une différenciation chondrogénique accélérée, marqués positivement au bleu alcian. Il est intéressant de noter qu'en plaçant les BMSC *ank/ank* dans le milieu de culture destiné aux MSC (très favorable à la chondrogenèse) pendant 14 jours, les auteurs ont observé une augmentation de la synthèse de protéoglycanes sulfatés, ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'agrécane et du collagène de type II comparativement aux BMSC de type sauvage. Des résultats très similaires ont été obtenus avec les MSC. Ces résultats sont en faveur du fait que l'expression d'une protéine ANK déficiente, et donc un niveau d'ePPi moins élevé, favoriserait la chondrogenèse des BMSC et des MSC.

Il a été également été démontré que la chondrogenèse et la maturation du chondrocyte étaient des phénomènes fortement dépendants de la signalisation des protéines Wingless and

Integration site (Wnt) (Church et Francis-West, 2002). Il a par exemple été mis en évidence que les protéines Wnt-1,-4 et -7a inhibent la différenciation des MSC en chondrocytes (Church *et al.*, 2002 ; Enomoto-Iwamoto *et al.*, 2002). Il existe 20 membres de la famille Wnt chez les vertébrés. Ces glycoprotéines secrétées exercent leur action en se liant aux récepteurs à 7 passages transmembranaires de la famille Frizzled (Frz), ce qui peut entraîner l'activation de deux voies de signalisation distinctes très bien caractérisées : la voie « canonique » et la voie « non-canonique ». Il a longtemps été conventionnel de séparer les Wnt en fonction des voies de signalisation qu'elles étaient capables d'activer. La communauté scientifique tend plutôt à l'heure actuelle à ne prendre en compte que les mécanismes intracellulaires, puisqu'il a clairement été mis en évidence qu'une même protéine Wnt pouvait induire l'une ou l'autre des voies de signalisation (van Amerongen *et al.*, 2008).

D'une part, la liaison des Wnt à ces récepteurs induit une transduction du signal intracellulaire dépendante de la voie dite « canonique » reposant sur la translocation nucléaire de la β-caténine (Schneider *et al.*, 1996). La liaison Wnt-Frz implique très souvent les co-récepteurs lipoprotein-related receptor (LRP) 5/6 (Tamai *et al.*, 2000). En situation basale, les Frz ne sont pas stimulés, et la β-caténine est maintenue dans un état phosphorylé par le complexe Axine, Adenomatous Polyposis Coli (APC) et la Glycogen Synthase Kinase 3β (GSK-3). Ceci constitue un signal de dégradation de la β-caténine par le protéasome, ce qui maintien le niveau cytoplasmique de cette protéine très bas (Zeng *et al.*, 1997). Or la liaison Wnt-Frz provoque la phosphorylation de la protéine Dishevelled (DSH) (Chen *et al.*, 2003), qui associée à la kinase PAR-1 (Sun *et al.*, 2001) induit la dissociation du complexe Axine-APC-GSK-3, empêchant ainsi la phosphorylation de la β-caténine, entraînant donc une accumulation de cette dernière dans le cytoplasme. Cette accumulation finit par entraîner la diffusion de la β-caténine dans le noyau, ou elle pourra se lier aux facteurs de transcription de la famille T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1 (TCF/LEF) (Molenaar *et al.*, 1996). Une étude a permis de démontrer que la surexpression de β-caténine dans les bourgeons de membres dans l'embryon de poulet accélère la différenciation terminale des chondrocytes de la zone de prolifération en chondrocytes hypertrophiques (Ryu *et al.*, 2002).

D'autre part, la stimulation des récepteurs Frz par les Wnt peut activer la voie dite « non-canonique », passant d'abord par la phosphorylation de DSH, qui va induire indépendamment de PAR-1 (Sun *et al.*, 2001) l'activation de JNK (Boutros *et al.*, 1998), par un mécanisme indépendant des petites protéines G (Cdc42 et Rac1), et ne nécessitant qu'un seul domaine de DSH (Li *et al.*, 1999). En outre, il a été mis en évidence que la stimulation de

Frz par les Wnt pouvait entraîner une mobilisation de calcium intracellulaire dépendante de l'inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP_3), qui va provoquer au final une activation des PKC Ca^{2+}-dépendantes et de la Ca^{2+}/Calmodulin-dependent kinase II (CamKII) (Sheldahl *et al.*, 1999).

Un schéma de l'activation de la signalisation par les Wnt est proposé en figure 14.

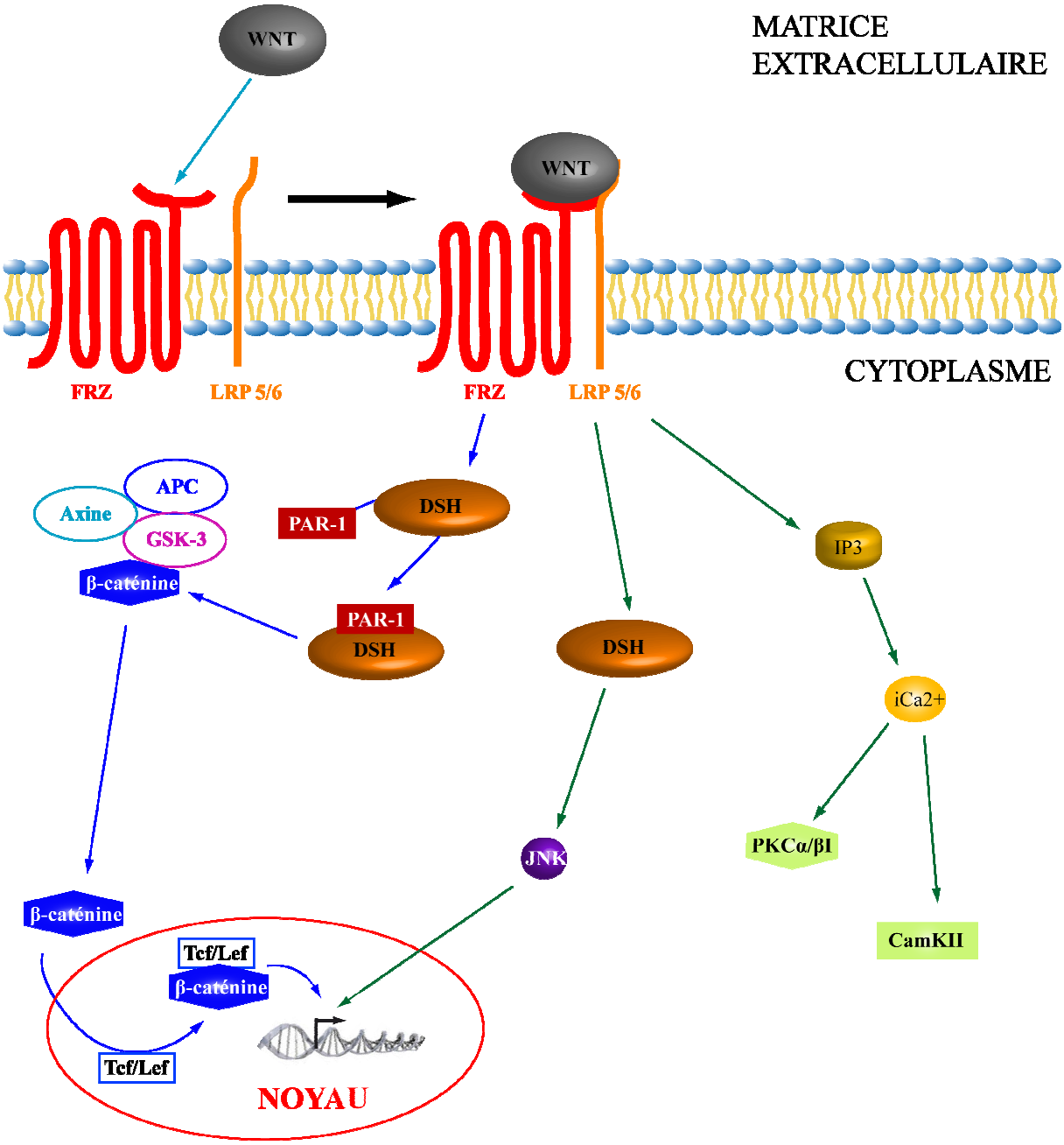


Figure 14: Activation de la voie « canonique » et « non-canonique » par les protéines Wnt

Il est intéressant de noter qu'il existe de nombreuses autres voies de signalisation activées par les Wnt, pouvant emprunter d'autres récepteurs membranaires tels que Ror2 ou Ryk, qui sont cependant nettement moins caractérisés (van Amerongen *et al.*, 2008).

Au cours de ces dernières années, l'activation de la signalisation des Wnt dans le chondrocyte articulaire a été reliée aux phénomènes de dédifférenciation (perte du phénotype). En effet, il a été démontré que Wnt-5a était capable de bloquer la différenciation du chondrocyte articulaire au cours du développement (Topol *et al.*, 2003), mais également que Wnt-7a était capable d'induire la dédifférenciation des chondrocytes *via* la stimulation de l'activité transcriptionelle de la β-caténine (Hwang *et al.*, 2004). Enfin, il a été démontré que l'IL-1β était capable d'induire la dédifférenciation des chondrocytes articulaires *via* son effet positif sur la production de Wnt-5a et Wnt-7a (Ryu et Chun, 2006). Or cette cytokine pro-inflammatoire a également été caractérisée comme diminuant la production d'ePPi par le chondrocyte articulaire (Lotz *et al.*, 1995), mais également comme principal acteur intervenant dans le catabolisme et l'inhibition de la synthèse de la MEC au cours de l'arthrose (Goldring *et al.*, 1994 ; Martel-Pelletier *et al.*, 1999). A l'heure actuelle, l'arthrose est également caractérisée par une perte du phénotype du chondrocyte articulaire (Aigner *et al.*, 2007).

Au vu de ces constats, il semble intéressant d'étudier le lien entre le gène *Ank*, le niveau d'ePPi, et le maintien du phénotype du chondrocyte, en étroite relation avec la signalisation des Wnt.

CHAPITRE 2 : RESULTATS

I. Contribution du gène *Ank* dans la balance PPi/Pi du chondrocyte articulaire stimulé par le TGF-β1

I.A. Article 2 : "Inorganic pyrophosphate generation by TGF-β1 is mainly dependent on ANK induction by Ras/Raf-1/ERK pathways in chondrocyte."

I.A.1. Objectifs du travail

La recherche de facteurs responsables d'une production anormalement élevée d'ePPi par le chondrocyte articulaire a constitué l'une des premières étapes dans les études visant à élucider les mécanismes de biogenèse des cristaux de PPCD, responsables de l'apparition des CCA. Des travaux ont ainsi clairement pu mettre en évidence l'implication du TGF-β1 dans la génération d'ePPi par le chondrocyte articulaire (Rosenthal *et al.*, 1991). Pendant de très nombreuses années avant la découverte du gène *Ank*, la production d'ePPi par les chondrocytes stimulés par le TGF-β1 était essentiellement décrite comme dépendante de l'ecto-nucléotidase PC-1. Des travaux avaient toutefois démontré que le probénécide était capable d'inhiber cette génération d'ePPi dépendante du TGF-β1 (Rosenthal et Ryan, 1994). Cette étude, couplée à la découverte du gène Ank (Ho *et al.*, 2000) et à l'induction de son expression par le TGF-β1 (Hirose *et al.*, 2002 ; Sohn *et al.*, 2002) permet de soulever la question de la contribution d'ANK dans la génération d'ePPi par les chondrocytes stimulés avec le TGF-β1. Par ailleurs, la littérature n'avait pas encore décrits quels étaient les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank*, qui peuvent être « Smad dépendants » (Moustakas *et al.*, 2001) ou « Smad indépendants » (Moustakas et Heldin, 2005). Nous avons voulu au travers cette étude, en utilisant la technologie de l'ARN interférence, évaluer la contribution d'ANK dans la quantité d'ePPi générée suite à une stimulation de chondrocytes articulaires avec 10 ng/ml de TGF-β1. L'utilisation d'inhibiteurs chimiques sélectifs des voies de signalisation activées par le TGF-β1, ainsi que de dominants négatifs nous a permis d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank*.

I.A.2. Article

Cet article a été publié dans la revue Arthritis Research & Therapy en Novembre 2007.

Research article

Open Access

Inorganic pyrophosphate generation by transforming growth factor-beta-1 is mainly dependent on ANK induction by Ras/Raf-1/extracellular signal-regulated kinase pathways in chondrocytes

Frederic Cailotto, Arnaud Bianchi, Sylvie Sebillaud, Narayanan Venkatesan, David Moulin, Jean-Yves Jouzeau and Patrick Netter

UMR 7561 CNRS-Nancy-Université, Laboratoire de Physiopathologie et Pharmacologie Articulaires (LPPA) and Faculté de Médecine, Avenue de la forêt de Haye, BP184, 54505 Vandœuvre-Lès-Nancy, France

Corresponding author: Arnaud Bianchi, arnaud.bianchi@medecine.uhp-nancy.fr

Received: 21 Sep 2007 Revisions requested: 22 Oct 2007 Revisions received: 12 Nov 2007 Accepted: 22 Nov 2007 Published: 22 Nov 2007

Arthritis Research & Therapy 2007, **9**:R122 (doi:10.1186/ar2330)
This article is online at: http://arthritis-research.com/content/9/6/R122
© 2007 Cailotto *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

ANK is a multipass transmembrane protein transporter thought to play a role in the export of intracellular inorganic pyrophosphate and so to contribute to the pathophysiology of chondrocalcinosis. As transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1) was shown to favor calcium pyrophosphate dihydrate deposition, we investigated the contribution of ANK to the production of extracellular inorganic pyrophosphate (ePPi) by chondrocytes and the signaling pathways involved in the regulation of *Ank* expression by TGF-β1. Chondrocytes were exposed to 10 ng/mL of TGF-β1, and *Ank* expression was measured by quantitative polymerase chain reaction and Western blot. ePPi was quantified in cell supernatants. RNA silencing was used to define the respective roles of *Ank* and *PC-1* in TGF-β1-induced ePPi generation. Finally, selective kinase inhibitors and dominant-negative/overexpression plasmid strategies were used to explore the contribution of several signaling pathways to *Ank* induction by TGF-β1. TGF-β1 strongly increased *Ank* expression at the mRNA and protein levels, as well as ePPi production. Using small interfering RNA technology, we showed that *Ank* contributed approximately 60% and *PC-1* nearly 20% to TGF-β1-induced ePPi generation. Induction of *Ank* by TGF-β1 required activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway but not of p38-mitogen-activated protein kinase or of protein kinase A. In line with the general protein kinase C (PKC) inhibitor calphostin C, Gö6976 (a Ca^{2+}-dependent PKC inhibitor) diminished TGF-β1-induced *Ank* expression by 60%, whereas a 10% inhibition was observed with rottlerin (a PKCδ inhibitor). These data suggest a regulatory role for calcium in TGF-β1-induced *Ank* expression. Finally, we demonstrated that the stimulatory effect of TGF-β1 on *Ank* expression was inhibited by the suppression of the Ras/Raf-1 pathway, while being enhanced by their constitutive activation. Transient overexpression of Smad 7, an inhibitory Smad, failed to affect the inducing effect of TGF-β1 on Ank mRNA level. These data show that TGF-β1 increases ePPi levels, mainly by the induction of the *Ank* gene, which requires activation of Ras, Raf-1, ERK, and Ca^{2+}-dependent PKC pathways in chondrocytes.

Introduction

Chondrocalcinosis is a frequent human disease characterized by the deposition of calcium-containing crystals, mostly calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD), within joints. CPPD crystals contribute to cartilage destruction by stimulating mitogenesis of synovial cells as well as synthesis and secretion of proteases, prostanoids, and proinflammatory cytokines that are implicated in cartilage matrix degradation [1]. Several forms of chondrocalcinosis have been described, including idiopathic ones, the frequency of which increases with aging,

APase = alkaline phosphatase; CPPD = calcium pyrophosphate dihydrate; Ct = threshold cycle; DMEM = Dulbecco's modified Eagle's medium; ePPi = extracellular inorganic pyrophosphate; ERK = extracellular signal-regulated kinase; FCS = fetal calf serum; iPPi = intracellular inorganic pyrophosphate; MAPK = mitogen-activated protein kinase; MEK-1 = mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1; NPPase = nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase; PBS = phosphate-buffered saline; PCR = polymerase chain reaction; PKA = protein kinase A; PKC = protein kinase C; *p*-NP = *para*-nitrophenol; *p*-NPP = *para*-nitrophenyl phosphate; *p*-NPTMP = *para*-nitrophenylthymidine 5'-monophosphate; PPi = inorganic pyrophosphate; siRNA = small interfering RNA; TBS = Tris-buffered saline; TGF-β1 = transforming growth factor-beta-1; TNAP = tissue-nonspecific alkaline phosphatase.

and familial forms. Some forms of familial chondrocalcinosis, typically inherited in an autosomal dominant manner, were reported to be linked to human chromosomes 8q (CCAL1) or 5p (CCAL2) [2]. Complementary genetic studies demonstrated the linkage between familial forms and the *Ank* gene, located on the CCAL 2 locus. More recently, mutations in the 5' untranslated region of Ank mRNA were also correlated with sporadic forms of chondrocalcinosis [3]. Mutations in the *Ank* gene were reported additionally in autosomal dominant craniometaphyseal dysplasia and ankylosing spondylitis [4,5], supporting a key role for the *Ank* gene in the field of mineralizing arthropathy.

It is generally recognized that a local buildup of excess extracellular inorganic pyrophosphate (ePPi), the anionic component of CPPD crystals, supports CPPD formation [6]. Intracellular inorganic pyrophosphate (iPPi) is a by-product of many synthetic intracellular reactions [7], but there is evidence that it is not able to diffuse across healthy cell membranes. As a consequence, ePPi generation by chondrocytes results from its *de novo* synthesis of ePPi by ecto-enzymes and/or from the contribution of a transport system allowing iPPi to reach the extracellular milieu where CPPD deposition takes place. Among ecto-enzymes, the ecto-nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase, also known as PC-1 (or NPP1), which is abundant in cell membrane [8], hydrolyzes extracellular nucleoside triphosphates into their monophosphate esters and ePPi [9]. On the other hand, the ANK protein was recently postulated to play a key role in the transport of iPPi across the cell membrane. ANK is a multipass transmembrane protein thought to serve either as an anion channel or as a regulator of such a channel [10]. Progressive ankylosis in (*ank/ank*) mice is an autosomal recessive form of joint destruction characterized by pathological mineralization in the articular surfaces and synovium [11]. This 'loss of function' mutation in the *Ank* gene increased iPPi concentration while reducing ePPi concentration in (*ank/ank*) mouse fibroblasts [10], and these alterations were reversed by overexpression of wild-type *Ank*. This correcting effect of *Ank* was blocked by probenecid, a general inhibitor of organic anion transport [10], which was also shown to inhibit transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1)-induced inorganic pyrophosphate (PPi) elaboration by chondrocytes [12]. These data indicate an important role for ANK in the regulation of PPi export.

Finally, accumulation of ePPi in the extracellular milieu could also result from its reduced degradation in the pericellular matrix. Therefore, one must keep in mind that alkaline phosphatase (APase), also known as tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), which is very abundant in chondrocytes adjacent to subchondral bone [13], can hydrolize ePPi into two molecules of extracellular inorganic phosphate. CPPD deposition is therefore highly dependent on the interplay among PC-1, ANK, and TNAP, which tightly regulate the balance between ePPi production and ePPi degradation.

TGF-β1 was shown to be the major growth factor that elevated the production of ePPi by normal chondrocytes [6]. Moreover, it was demonstrated that chondrocyte responsiveness to TGF-β1 increased with aging [14] and that TGF-β1 stimulated ePPi production by articular chondrocytes significantly more in old patients than in younger subjects [15]. These effects were closely related to the occurrence of sporadic chondrocalcinosis [16]. Previous studies showed that Ank mRNA level was higher in human chondrocytes exposed to TGF-β1 than in controls [17], as was also the case for murine cartilage and bone [18]. TGF-β1 was shown to induce two major signaling pathways, referred to as TGF-β1 Smad-dependent [19] or Smad-independent [20] signaling, in many cell types. However, intracellular pathways involved in the regulation of the *Ank* gene are not well documented in chondrocytes, and the contribution of ANK relative to other ePPi-regulating proteins remains unclear. Therefore, the identification of the signaling pathway implicated in *Ank* regulation and subsequent ePPi production by TGF-β1 warrants interest and could lead to insights in the therapy of sporadic chondrocalcinosis.

The present work aimed to investigate the molecular mechanisms underlying the induction of the *Ank* gene by TGF-β1 and to evaluate the relative contribution of ANK to ePPi production in chondrocytes. To that end, we characterized the kinetics of expression of *Ank*, *PC-1*, and *TNAP* in response to TGF-β1. Then, using small interfering RNA (siRNA), we evaluated the respective contributions of *Ank* and *PC-1* in ePPi production. Finally, using selective kinase inhibitors and a dominant-negative/overexpression plasmid strategy, we distinguished the Smad from the non-Smad signaling events downstream of TGF-β1.

Materials and methods

Chondrocyte isolation and culture

Normal articular cartilage was obtained from 6-week-old male Wistar rats (130 to 150 g) killed under dissociative anesthesia (ketamine [Rhône-Mérieux, Lyon, France] and acepromazine [Sanofi Santé Animale, Libourne, France]) in accordance with local ethics committee and national animal care guidelines. Articular cartilage pieces were collected aseptically by joint surgery and were dissected from femoral head caps, and chondrocytes were obtained by sequential digestion with pronase and collagenase B (Roche Diagnostics, Meylan, France) as described previously [21]. Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and cultured to confluence in 75-cm^2 flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12 supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 μg/mL), amphotericin B (0.5 μg/mL), and heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (10%) (Invitrogen Corporation, Cergy Pontoise, France). All experiments reported here were performed with first-passage chondrocytes plated at 4×10^5 cells per well in six-well plates.

Chemicals

All chemical reagents, including *para*-nitrophenylthymidine 5'-monophosphate (*p*-NPTMP), *para*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP), and *para*-nitrophenol (*p*-NP), were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) unless otherwise indicated. Chemical kinase inhibitors were purchased from Calbiochem (now part of EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA): RcAMP (a protein kinase A [PKA] inhibitor), calphostin C (a general inhibitor of protein kinase C [PKC]), rottlerin (an inhibitor of PKCδ) or Gö6976 (an inhibitor of Ca^{2+}-dependent PKCα and PKCβI isoenzymes), SB203580 (a p38-mitogen-activated protein kinase [MAPK] inhibitor), or PD98059 (a MAPK extracellular signal-regulated kinase [ERK] kinase 1 [MEK-1] inhibitor).

Study design

First, we controlled the cell phenotype by measuring the expression level of specific chondrocyte markers (type I, II, and X collagens as well as aggrecan) by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). Second, we studied the kinetics of expression of *Ank*, *PC-1*, and *TNAP* in response to TGF-β1 (PeproTech France, Neuilly-sur-Seine, France) at the mRNA and protein levels. To that end, chondrocytes were incubated for 1, 3, 6, 12, 24, or 48 hours in the presence or absence of 10 ng/mL of TGF-β1 (prepared from a stock solution at 10 μg/mL in 2 mM citric acid containing 2 mg/mL bovine serum albumin) in DMEM/F-12 containing a final concentration of 1% FCS. Third, to investigate the respective contributions of *Ank* and *PC-1* in ePPi production, we compared the response with TGF-β1 in chondrocytes transfected with 50 nM of siRNA for each gene. Fourth, to investigate signaling pathways implicated in *Ank* induction by TGF-β1, we performed the kinetics of activation (10 to 180 minutes) of PKC, MAPK, and Smad in cells stimulated with 10 ng/mL of TGF-β1. The contribution of each signaling pathway was assessed by pretreating chondrocytes for 1 hour with the following inhibitors before exposure to 10 ng/mL of TGF-β1 (12 hours): 10 μM of RcAMP (PKA), 1 μM of calphostin C, 5 μM of rottlerin or 5 μM of Gö6976 (PKC), 10 μM of SB203580 (p38-MAPK), or 10 μM of PD98059 (MEK-1). These final concentrations were chosen after preliminary experiments that demonstrated that inhibitors were active (Western blot assessing the phosphorylation of the concerned signaling pathway; data not shown) and not cytotoxic in the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (data not shown). For these experiments, all inhibitors (MAPK, PKA, and PKC) were dissolved in dimethyl sulfoxide (0.1% final concentration). In the last set of experiments, *Ank* expression was studied in chondrocytes electroporated (Nucleofector®; amaxa AG, Cologne, Germany) with Ras, Raf-1 (wild-type, constitutively active, or dominant-negative forms) (Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France) or wild-type Smad 7 (Addgene plasmid 11733 [22]) overexpressing plasmids before stimulation or not with 10 ng/mL of TGF-β1.

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction analysis

Total RNA from cultured chondrocytes was isolated by the acidified guanidinium isothiocyanate method, using TRIZOL® reagent (Sigma-Aldrich). Two micrograms of total RNA was reverse-transcribed for 90 minutes at 37°C in a 20-μL reaction mixture containing 2.5 mM dNTPs, 5 μM random hexamer primers, 1.5 mM $MgCl_2$, and 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Sigma-Aldrich).

Real-time quantitative polymerase chain reaction

To quantify aggrecan, Ank, L27, PC-1, TNAP, type IA2, II, or X collagens, and S29 mRNA expression, a real-time quantitative PCR was performed using Lightcycler® (Roche Diagnostics) technology. PCR was performed with SYBR green master mix system (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France). The gene-specific primer pairs are described in Table 1. Melting curve was performed to determine the melting temperature of each PCR product, as a control of its specificity, and after amplification, the product size was checked on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μg/mL). Analyses depended upon a threshold cycle (Ct) that corresponded to the first clearly detectable increase in fluorescence secondary to SYBR green incorporation into double-stranded DNA. Briefly, the Ct was converted into picograms of DNA using calibration curves made of serial dilutions of known amounts of corresponding purified PCR products. Each run included positive standards and negative reaction controls. The mRNA levels of the gene of interest and of the housekeeping gene *S29* were determined in parallel for each sample, and results were expressed as the ratio of mRNA level of each gene of interest over the *S29* gene.

Western blot analysis

Rat chondrocytes stimulated or not with TGF-β1 were harvested and lysed in 1× Laemmli buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-β mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue, and 125 mM Tris HCl [pH 6.8]). Protein samples were run on SDS-polyacrylamide gels (10%) and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon; Sigma-Aldrich) as previously described [23]. After 1 hour in blocking buffer (Amersham Biosciences, now part of GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. ANK protein level was determined using rabbit antiserum Ab3 (1:5,000), kindly provided by David Kingsley, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA. PC-1 protein level was evaluated using antiserum (1:500) (designed by Eurogentec S.A. [Seraing, Belgium] using a keyhole limpet hemocyanin-coupled peptide of the following sequence: NH_2-Glu-Arg-Asp-Gly-Glu-Gln-Ala-Gly-Gln-Gly-Pro-Arg-His-Gly-Pro-Cys-COOH) and a polyclonal antibody against β-actin (1:4,000) (Sigma-Aldrich). In signaling pathway experiments, incubation was carried out with anti-phospho-ERK 1/2, anti-phospho-p38-MAPK, anti-phospho-pan-PKC, and anti-phospho-Smad

Table 1

Gene-specific primer pairs used in real-time quantitative polymerase chain reaction

Gene	Sense	Antisense	Amplicon length (base pair)	GenBank accession number
Aggrecan	5'-ACA CCC CTA CCC TTG CTT CT-3'	5'-AAA GTG TCC AAG GCA TCC AC-3'	124	NM_022190
Ank	5'-CAA GAG AGA CAG GGC CAA AG-3'	5'-AAG GCA GCG AGA TAC AGG AA-3'	173	NM_053714
L27	5'-TCC TGG CTG GAC GCT ACT C-3'	5'-CCA CAG AGT ACC TTG TGG GC-3'	227	NM_022514
PC-1	5'-TAT GCC CAA GAA AGG AAT GG-3'	5'-GCA GCT GGT AAG CAC AAT GA-3'	165	NM_053535
S29	5'-AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTC TAC TG-3'	5'-AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA-3'	67	NM_012876
TNAP	5'-GAA CGT CAA TTA ACG GCT GA-3'	5'-CAG ATG GGT GGG AAG AGG T-3'	50	NM_013059
Type IA2 collagen	5'-TTG ACC CTA ACC AAG GAT GC-3'	5'-CAC CCC TTC TGC GTT GTA TT-3'	197	NM_053356
Type II collagen	5'-TCC CTC TGG TTC TGA TGG TC-3'	5'-CTC TGT CTC CAG ATG CAC CA-3'	161	NM_012929
Type X collagen	5'-ATA TCC TGG GGA TCC AGG TC-3'	5'-TGG GTC ACC CTT AGA TCC AG-3'	241	AJ131848

TNAP, tissue-nonspecific alkaline phosphatase.

3/1 (each at 1:500) (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) or β-actin (1:4,000). After three washings with Tris-buffered saline (TBS)-Tween, the blot was incubated with an anti-rabbit immunoglobulin G conjugated with horseradish peroxidase (Cell Signaling Technology, Inc.) diluted at 1:2,000 in blocking buffer for 1 hour at room temperature. After four washings with TBS-Tween, protein bands were detected by chemiluminescence with the Phototope Detection system (Cell Signaling Technology, Inc.) according to the manufacturer's recommendations. The band intensities were quantified by densitometry with a computerized image processing system (Geldoc 2000®; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase and alkaline phosphatase activity

Rat chondrocytes stimulated or not with TGF-β1 were harvested and lysed in a buffer containing 1% triton X-100, 1.6 mM $MgCl_2$, and 0.2 M Tris Base (pH 8.1). Total protein extract (quantified by bicinchonic acid assay) was incubated for 15 minutes with 1 μmol of *p*-NPTMP for nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase (NPPase) activity or for 2.5 hours with 5 μmol of *p*-NPP for APase activity; these enzymatic activities both generate *p*-NP. At the end of incubation, the reaction was stopped by adding exactly 10 μmol of EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and 200 μmol of NaOH and the absorbance was read at 410 nm. The standard concentrations, ranging from 0 to 0.2 mM *p*-NP, were included in each assay. Results were expressed as units per milligram of total cell proteins, which were quantified by bicinchonic acid assay [24].

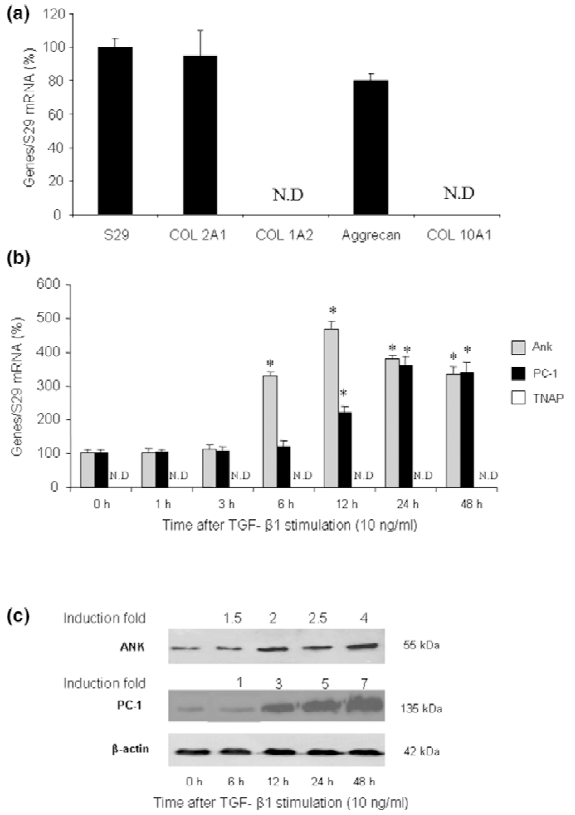
Radiometric assay for extracellular inorganic pyrophosphate

ePPi levels were measured using the differential adsorption of UDP-(6-^{3}H) glucose (GE Healthcare), and its reaction product 6-phospho-(6-^{3}H) gluconate on activated charcoal, as previously described [25]. The standard concentrations, ranging from 10 to 400 pmol of PPi, were included in each assay. After adsorption of the reaction mixture on charcoal, and centrifugation at 14,000 rpm for 10 minutes, 100 μL of the supernatant was removed carefully and counted for radioactivity in 5 mL of Bio-Safe II (Research Products International Corp, Mt. Prospect, IL, USA). Results were expressed as picomole of ePPi per microgram of total cell proteins.

Silencing experiments with small interfering RNA

siRNA sequences (designed by Eurogentec S.A.) were Ank sense 5'-CUGGCCAACACGAACAACA-3' and antisense 5'-UGUUGUUCGUGUUGGCCAG-3' and PC-1 sense 5'-GAGGAUGUUUACUCUAUGA-3' and antisense 5'-UCAUAGAGUAAACAUCCUC-3' and were used at final concentrations of 50 nM. Transfections were carried out with one or the other siRNA using X-treme reagent (Roche Diagnostics). Briefly, siRNA and X-treme reagent were diluted separately in serum-free medium, and then diluted X-treme reagent was added to siRNA. After a short incubation at room temperature, cells were washed with PBS and incubated for 4 hours with siRNA-X-treme mix. After this time, medium containing 2% FCS was added to this mix. Stimulations with TGF-β1 (10 ng/mL) were performed the following day. L27 mRNA expression was used as a negative control to check for the specificity of siRNA effects.

Figure 1



Effect of transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1) on proteins regulating inorganic pyrophosphate metabolism. **(a)** Phenotypic characterization of chondrocytes. Total RNA was extracted from untreated rat chondrocytes and subjected to real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis. The relative abundance of gene mRNAs was normalized to that of S29 mRNA. Results are presented in histograms as mean percentages (± standard deviation [SD]) over S29 value. **(b)** Effect of TGF-β1 on Ank, PC-1, and TNAP mRNA levels. Total RNA was extracted from rat chondrocytes exposed to 10 ng/mL of TGF-β1 from 1 to 48 hours and subjected to real-time PCR analysis. The relative abundance of gene mRNAs was normalized to that of S29 mRNA. Results are expressed as mean percentages (± SD) over control values. Statistically significant differences from the control are indicated as $^*p < 0.05$. **(c)** Effect of TGF-β1 on ANK or PC-1 protein levels. Total proteins were extracted from rat chondrocytes exposed to 10 ng/mL of TGF-β1 from 6 to 48 hours and subjected to Western blotting using polyclonal anti-ANK and anti-PC-1 antibody. The protein band intensities were quantified by densitometry from enhanced chemiluminescence immunoblots. The relative abundance of these proteins was normalized to that of β-actin protein and expressed as induction folds over control value. N.D., not detected; TNAP, tissue-nonspecific alkaline phosphatase.

Plasmid electroporation

Chondrocytes were electroporated with plasmids encoding for Ras, Raf-1 (wild-type, constitutively active, or dominant-negative forms) or wild-type Smad 7 (overexpressing plasmid) using Human Chondrocyte Nucleofector® Kit (amaxa AG) according to the manufacturer's protocol. Briefly, trypsinized chondrocytes (1×10^6 cells) were gently mixed with 6 μg of either plasmid and then were electroporated using Nucleofector® program U-28. Immediately after transfection, cells were split equally into three wells containing 20% FCS-DMEM/F-12 culture medium and were left to recover for 24 hours. Cells were then stimulated or not with 10 ng/mL of TGF-β1 for 12 hours before mRNA (Ank, aggrecan) or 15 minutes before protein (ERK 1/2) extraction. Plasmid pmaxGFP™ (amaxa AG), encoding a green fluorescent protein, was used to determine the transfection efficiency.

Statistical analysis

Results were expressed as the mean ± standard deviation of at least three independent assays. Comparisons were made by analysis of variance, followed by Fisher *t post hoc* test using Statview™ 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Effect of TGF-β1 on the kinetics of proteins regulating inorganic pyrophosphate metabolism in chondrocytes

Our preliminary experiments confirmed that chondrocytes strongly expressed the cartilage-specific markers aggrecan and type II collagen, whereas the expression of type IA2 and X collagens was not detected (Figure 1a). This confirmed the mature phenotype of the articular chondrocytes used throughout the study, all the more so considering that experiments were carried out with first-passage cells.

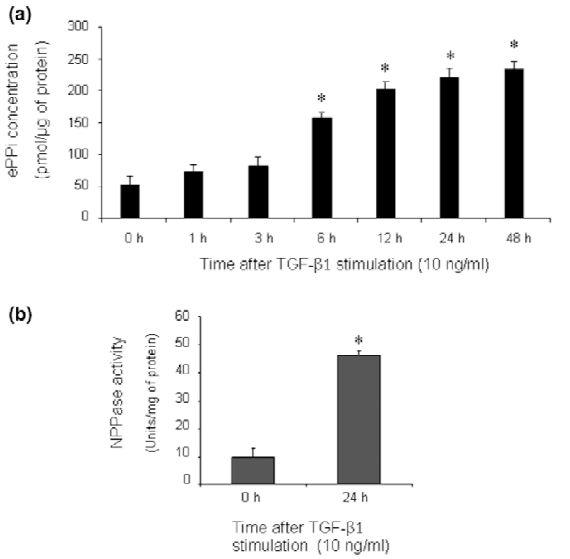
Then, we examined the time course of Ank, PC-1, and TNAP mRNA expression in TGF-β1-stimulated chondrocytes (Figure 1b). Ank was upregulated from 6 hours and reached a peak value of 4.5-fold at 12 hours after TGF-β1 exposure. In these conditions, PC-1 was induced approximately 2-fold after 12 hours and reached a maximal induction of approximately 3.5-fold after 24 hours of stimulation with TGF-β1. In contrast, we failed to detect any expression of TNAP in resting chondrocytes or after stimulation with TGF-β1.

Western blotting indicated that ANK protein was induced from 6 hours after TGF-β1 challenge, whereas PC-1 was upregulated after 12 hours (Figure 1c). Taken together, these data demonstrated that Ank was induced by TGF-β1 more rapidly than PC-1 in chondrocytes.

Effect of TGF-β1 on extracellular inorganic pyrophosphate

As shown in Figure 2a, ePPi level increased by 3-fold after 6 hours of stimulation with TGF-β1 and reached a plateau from 24 hours (5-fold). In these experimental conditions, TGF-β1 stimulated NPPase activity by 5-fold at 24 hours (Figure 2b). However, we failed to detect any APase activity in our experimental conditions, which is consistent with the lack of expression of type X collagen. These data suggested that TGF-β1

Figure 2



Effect of transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1) on extracellular inorganic pyrophosphate (ePPi) and nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase (NPPase) activity. **(a)** Kinetics of ePPi levels in culture supernatant of rat chondrocytes stimulated with TGF-β1 (10 ng/mL). ePPi was assayed radiometrically and normalized to the amount of total cell proteins ($n = 6$). Data are expressed as mean (± standard deviation [SD]) in picomoles per microgram of protein. **(b)** NPPase activity in cultured rat chondrocytes stimulated with 10 ng/mL of TGF-β1. Enzyme activity was normalized to the amount of total cell proteins ($n = 3$). Results are expressed as mean (± SD) in micromoles of paranitrophenol per minute per milligram of protein. Statistically significant differences from the control are indicated as $^*p < 0.05$.

increased ePPi levels by activating ecto-enzymes and not by reducing TNAP activity, which remained undetectable.

Respective contributions of *Ank* and *PC-1* to TGF-β1-induced increase in extracellular inorganic pyrophosphate levels in chondrocytes

The siRNA technology was used to investigate the respective contributions of *Ank* and *PC-1* on TGF-β1-induced production of ePPi. Control experiments showed that siRNAs were efficient, as they reduced mRNA level by more than 80% in basal conditions (Figure 3a,b) and diminished the stimulating effect of TGF-β1 below control level (Figure 3a,b) at the time of maximal gene expression. No effect was observed on L27 mRNA level in either condition (Figure 3a,b), confirming that the concentration of 50 nM of siRNA was gene-specific for chondrocytes. When ePPi levels were measured in culture supernatant of chondrocytes transfected with siRNA, inhibition of *PC-1* was ineffective on basal ePPi level and accounted for only a 16% decrease in ePPi level in TGF-β1-stimulated cells (Figure 3c). In contrast, transfection with Ank siRNA reduced the basal ePPi level by 33% and reduced the ePPi level by 60% in TGF-β1-stimulated cells (Figure 3c). These data demonstrated that *Ank* played a major role compared with *PC-1* in the regulation of ePPi level in resting and TGF-β1-stimulated chondrocytes.

Identification of TGF-β1-induced signaling pathways contributing to the regulation of *Ank* gene

As shown in Figure 4a, Western blotting revealed that TGF-β1 induced the phosphorylation of p38-MAPK and PKC as early as 10 minutes after stimulation. A major activation of ERK 1/2 was also observed from 10 to 15 minutes after TGF-β1 challenge, whereas a strong phosphorylation of Smad 3 was noted at 30 and 60 minutes. In our experimental conditions, the corresponding non-phosphorylated proteins remained unchanged (data not shown).

When chondrocytes were stimulated by TGF-β1 in the presence of SB203580, a selective p38-MAPK inhibitor, the increase in Ank mRNA level was not affected (Figure 4b). In contrast, PD98059, a selective MEK-1 inhibitor, reduced the stimulatory effect of TGF-β1 by 60% (Figure 4b), supporting a contribution of this MAPK to the induction of the *Ank* gene. RcAMP, a selective PKA inhibitor, was also ineffective in these experimental conditions (Figure 4b). These data showed that TGF-β1 induced multiple signaling pathways in chondrocytes but that neither p38-MAPK nor PKA contributed to its stimulating effect on the *Ank* gene.

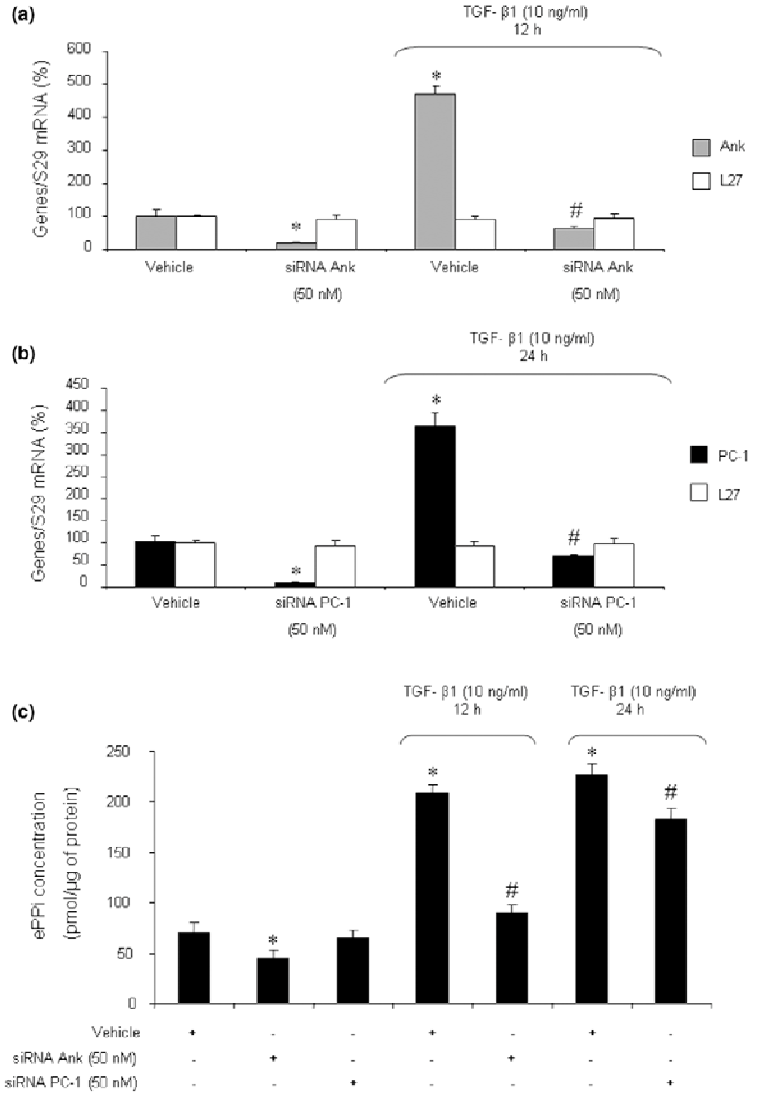
Contribution of protein kinase C pathway to TGF-β1-induced *Ank* expression

As shown in Figure 5a, the stimulatory effect of TGF-β1 on *Ank* expression was suppressed almost completely by calphostin, a general PKC inhibitor. In these conditions, rottlerin, a specific inhibitor of PKCδ, decreased *Ank* induction by 10% whereas Gö6976, a specific inhibitor of Ca^{2+}-dependent PKCs (PKCα and PKCβI), had a 60% inhibitory effect (Figure 5a). A subsequent dose-ranging study showed that inhibition of TGF-β1-induced expression of *Ank* by Gö6976 was clearly dose-dependent and reached the control level at 10 µM (Figure 5b). Taken together, these data supported a major role for PKCα and PKCβI isoenzymes in TGF-β1-stimulated expression of *Ank*.

Contribution of Ras and Raf-1 pathways to TGF-β1-induced *Ank* expression

The experiments evaluating transfection efficiency did not show any significant difference among the wild-type, the constitutively active, or the dominant-negative forms of Ras and Raf-1 (data not shown). When chondrocytes were transfected to overexpress constitutively active Ras (Figure 6a) or Raf-1 (Figure 6b), the basal expression of *Ank* was increased by 2-fold and 1.5-fold, respectively. In these conditions, the induction of *Ank* by TGF-β1 was increased by 3-fold (Figure 6a) and 4.3-fold, respectively (Figure 6b), which remained similar to cells transfected either with an empty vector or with wild-type Ras or Raf-1 (Figure 6a,b). Transfection with dominant-nega-

Figure 3

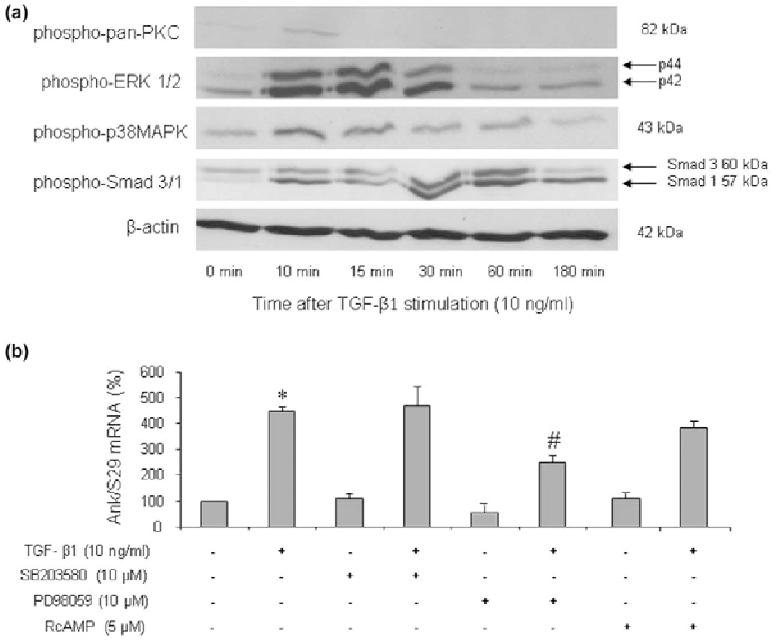


Respective contributions of *Ank* and *PC-1* to transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1)-induced increase in extracellular inorganic pyrophosphate (ePPi) production. Effect of small interfering RNA (siRNA) on Ank **(a)** and PC-1 **(b)** mRNA levels. Rat chondrocytes were transfected with siRNA 24 hours before TGF-β1 stimulation. Total RNA was extracted from rat chondrocytes exposed to 10 ng/mL of TGF-β1 for 12 hours (Ank) **(a)** or 24 hours (PC-1) **(b)** and then subjected to real-time polymerase chain reaction analysis. The level of Ank, PC-1, and L27 mRNAs was normalized to that of S29 mRNA and expressed as mean percentages (± SD) over control values. **(c)** Effect of Ank or PC-1 siRNA on ePPi levels. Shown are levels of ePPi in culture supernatant of rat chondrocytes transfected with siRNA and then stimulated for 12 or 24 hours with 10 ng/mL of TGF-β1. ePPi levels were normalized to the amount of total cell proteins ($n = 6$) and are expressed as mean (± SD) in picomoles per microgram of protein. Statistically significant differences from the control are indicated as $*p < 0.05$ and from TGF-β1-treated cells as $\#p < 0.05$.

tive forms of Ras (Figure 6a) or Raf-1 (Figure 6b) reduced both basal (by 75% and 45%, respectively) and TGF-β1-induced (by 3-fold and 2-fold, respectively) *Ank* expression. These data supported a major role for the Ras/Raf-1 pathway in TGF-β1-induced expression of *Ank*.

Western blot analysis of ERK 1/2 phosphoproteins showed an activation of ERK 1/2 pathway by TGF-β1 in cells transfected with wild-type Ras (Figure 6c). More importantly, the phosphorylation of ERK 1/2 was suppressed almost completely in cells electroporated with a dominant-negative form of Ras, whereas

Figure 4



Identification of several signaling pathways in transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1)-induced expression of the *Ank* gene. **(a)** Kinetics of signaling events induced by TGF-β1. Total proteins were extracted from rat chondrocytes exposed to 10 ng/mL of TGF-β1 for 10 to 180 minutes and subjected to Western blotting using anti-phospho-ERK 1/2, anti-phospho-p38-MAPK, anti-phospho-pan-PKC, or anti-phospho-Smad 3/1. The relative abundance of these proteins was normalized to that of β-actin protein. **(b)** Effect of specific signaling inhibitors on TGF-β1-induced expression of Ank mRNA. Total RNA was extracted from rat chondrocytes stimulated with 10 ng/mL of TGF-β1 in the presence of 10 μM RcAMP (PKA inhibitor) or 10 μM SB203580 (a selective p38-MAPK inhibitor) or 10 μM PD98059 (a MEK-1 inhibitor) added 1 hour before TGF-β1. The mRNA level of Ank obtained from real-time polymerase chain reaction analysis was normalized to that of S29 mRNA and is expressed as mean percentages (± standard deviation) over control values from three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as $^*p < 0.05$ and from TGF-β1-treated cells as $\#p < 0.05$. ERK, extracellular signal-regulated kinase; MEK-1, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1; p38-MAPK, p38-mitogen-activated protein kinase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C.

overexpression of constitutively active Ras raised both basal and TGF-β1-induced levels of ERK 1/2 phosphorylation (Figure 6c). These results, similar to those obtained with equivalent Raf-1 constructs, demonstrated that activation of ERK 1/2 by TGF-β1 involved the Ras/Raf-1 pathway in chondrocytes.

Induction of *Ank* expression by TGF-β1 is a Smad-independent event

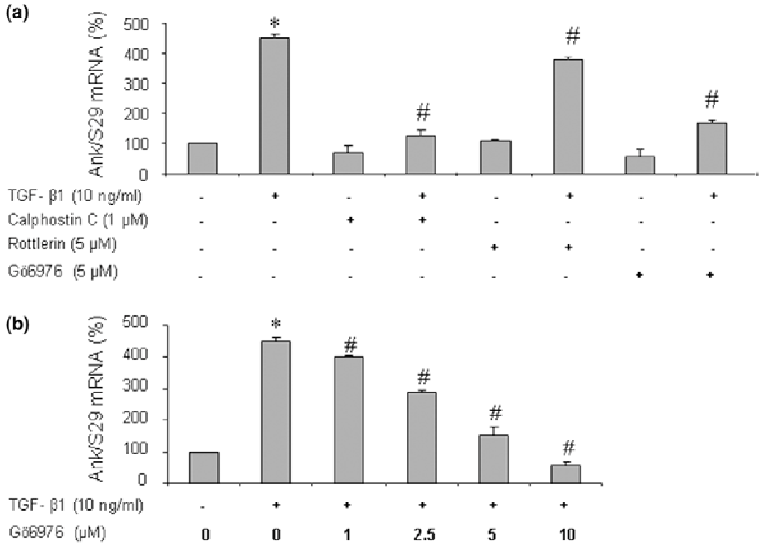
In chondrocytes transfected to overexpress wild-type Smad 7, an inhibitory Smad, control experiments showed that the basal expression of aggrecan, chosen as a specific Smad-dependent gene in chondrocytes, was reduced marginally (Figure 7a). In contrast, the stimulating effect of TGF-β1 on aggrecan was abolished, thus demonstrating the efficiency of the construct (Figure 7a). However, neither the basal expression of *Ank* nor its induction by TGF-β1 was affected by overexpression of Smad 7 in chondrocytes (Figure 7b). These data demonstrated that the Smad pathway did not play a major role in the induction of the *Ank* gene by TGF-β1.

Discussion

Previous studies demonstrated a major contribution of ANK in the regulation of ePPi levels. ANK is a transporter able to export iPPi from the cells and is known to be upregulated in osteoarthritis [17,26]. Moreover, chondrocytes and cartilage extracts from patients with CPPD disease express high levels of Ank mRNA [17]. Besides, chondrocytes treated with TGF-β1 generated more ePPi than normal chondrocytes [15], and chondrocyte sensitivity to TGF-β1 increased with aging [14]. These data led us to suppose that *Ank* could be a major target of TGF-β1 in chondrocytes, likely contributing to its pathophysiological relevance to CPPD deposition.

In our experimental conditions, TGF-β1 increased both Ank mRNA and ANK protein levels, this induction beginning as early as 6 hours. PC-1 mRNA was also induced by TGF-β1 but in a more delayed fashion, whereas expression of TNAP could not be detected. Our data confirmed that TGF-β1 stimulated ePPi production [15] and demonstrated that this was concomitant with the increased expression of *PC-1* and *Ank*. Moreo-

Figure 5

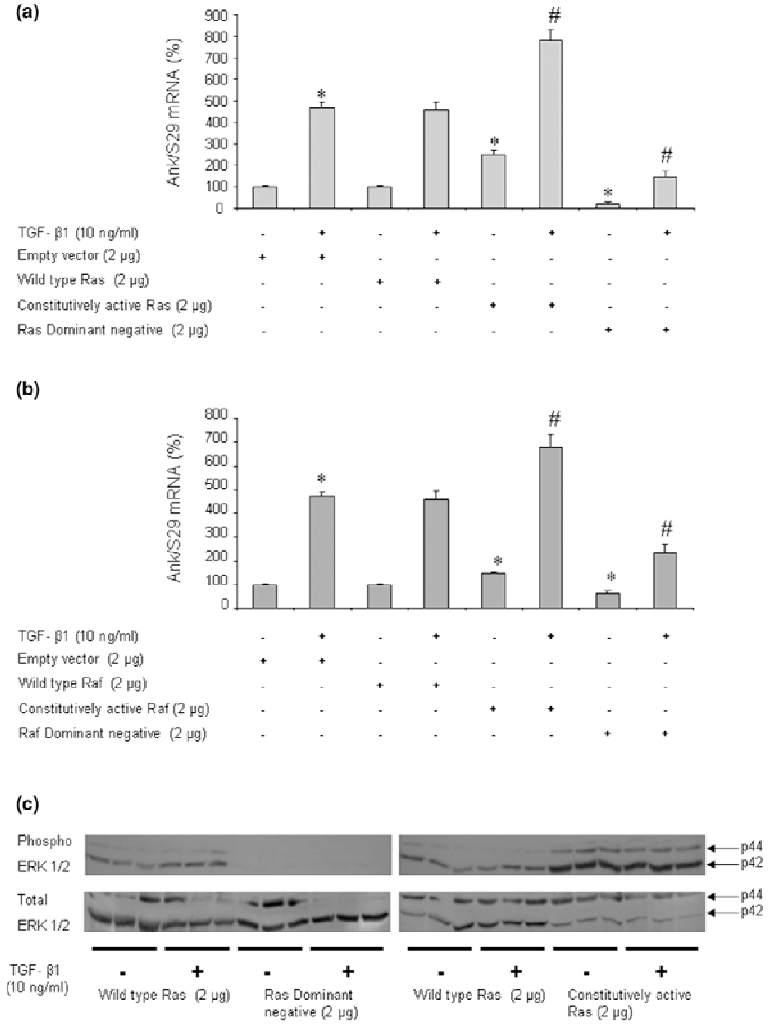


Contribution of protein kinase C (PKC) pathway to transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1)-induced expression of the *Ank* gene. **(a)** Effect of PKC inhibitors on *Ank* expression. Total RNA was extracted from rat chondrocytes stimulated with 10 ng/mL of TGF-β1 in the presence of 10 μM of calphostin C (general PKC inhibitor) or 5 μM of rottlerin (PKCδ inhibitor) or 5 μM of Gö6976 (PKC α/β1 inhibitor) added 1 hour before TGF-β1. **(b)** Dose-response study of PKC-dependent induction of *Ank* by TGF-β1. Total RNA was extracted from rat chondrocytes stimulated with 10 ng/mL of TGF-β1 in the presence of 0, 1, 2.5, 5, or 10 μM of Gö6976 added 1 hour before TGF-β1. The mRNA level of Ank obtained from real-time polymerase chain reaction analysis was normalized to that of S29 mRNA and is expressed as mean percentages (± standard deviation) over control values from three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as $*p < 0.05$ and from TGF-β1-treated cells as $\#p < 0.05$.

ver, similar experiments performed on cartilage explants showed an identical pattern of response, thus validating our monolayer culture system of chondrocytes (F. Cailotto, A. Bianchi, S. Sebillaud, N. Venkatesan, D. Moulin, J-Y. Jouzeau, P. Netter, unpublished data). Based on the higher levels of TGF-β1 found in the synovial fluid of osteoarthritis patients having developed CPPD deposition [27], our findings are in favor of a pathophysiological contribution of TGF-β1-induced dysregulation of *Ank* and *PC-1* in sporadic chondrocalcinosis.

To date, no data are available on the relative contributions of ANK and PC-1 to TGF-β1-induced changes in ePPi production. Therefore, we developed an siRNA technology to clarify the respective roles of ANK and PC-1 since both genes differed rather in their kinetics of expression than in their extent of induction in response to TGF-β1. We demonstrated that, for a comparable knockdown of target genes by siRNA, *Ank* contributed 4-fold more than *PC-1* to TGF-β1-induced increase in ePPi level. The minor effect of PC-1 siRNA on ePPi level could possibly be explained by a stronger basal expression of PC-1 (and, consequently, a residual enzymatic activity even after siRNA transfection) compared with ANK in our cell culture system. However, our data were not biased by the kinetics of induction of each gene since the consequence of their knockdown was studied at the time of their maximal expression in response to TGF-β1. Moreover, we also observed that Ank siRNA diminished TGF-β1-induced ePPi production by 65% at 24 hours (data not shown), confirming that the contribution of *Ank* was still the most significant at the time of maximal expression of PC-1 mRNA. Our results could be partly explained by the fact that ANK is a multipass transmembrane protein thought to serve either as an anion channel or as a regulator of such a channel [10]. As a consequence, an increase or a decrease of protein level could have a profound and rapid impact on PPi transport across the membrane. PC-1 has been shown to be strongly induced by TGF-β1, as well as NPPase activity in chondrocytes [28], and our data confirmed these observations. However, the contribution of PC-1 to ePPi generation could be estimated to be between 35% to 50% in osteoblasts [29], suggesting that PC-1 is an important contributor but not the major contributor of ePPi generation, which is consistent with our findings in chondrocytes. One important consideration is that, even though knockdown with siRNA was very efficient at the mRNA level, neither the repression of *Ank* nor that of *PC-1* was sufficient to diminish ePPi levels below control level in TGF-β1-stimulated cells. This sug-

Figure 6

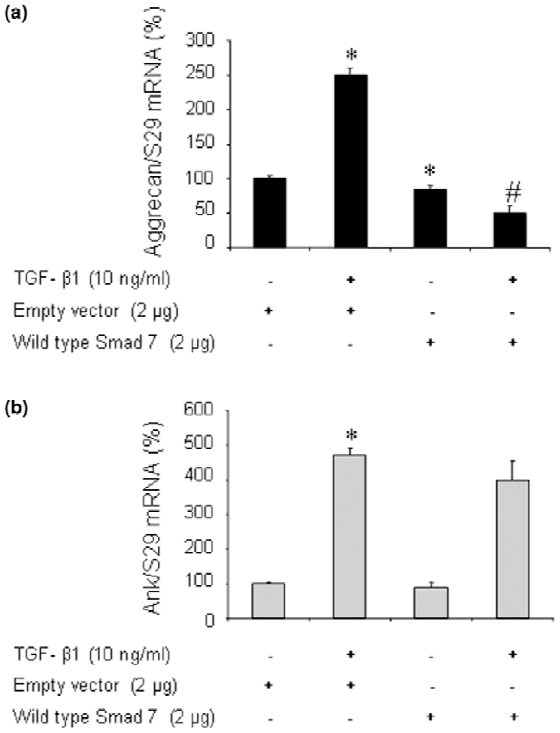


Effect of Ras/Raf-1 modulation on transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1)-induced expression of the *Ank* gene. Rat chondrocytes were electroporated with empty vector, wild-type, constitutively active, or dominant-negative plasmids for Ras (a) or Raf-1 (b) (2 μg/well of six-well plate) before stimulation with 10 ng/mL of TGF-β1 for 12 hours. Total RNA was extracted and subjected to real-time polymerase chain reaction analysis. The mRNA level of Ank was normalized to that of S29 mRNA and is expressed as mean percentages (± standard deviation) over control values from three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as *$p < 0.05$ and from TGF-β1-treated cells as #$p < 0.05$. (c) Effect of TGF-β1 on extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 phosphorylation in electroporated cells with wild-type, constitutively active, or dominant-negative plasmids for Ras (2 μg/well of six-well plate). Total proteins were extracted from rat chondrocytes exposed to 10 ng/mL of TGF-β1 for 15 minutes and subjected to Western blotting using anti-phospho- and anti-total-ERK 1/2 antibodies. The relative abundance of these proteins was normalized to that of β-actin protein.

gests that, although *Ank* seemed to play a major role, the generation of ePPi could require a coordinated contribution of *Ank* and *PC-1*, as suggested by others [26].

When we studied the regulation of *Ank* expression by TGF-β1, we demonstrated firstly that ERK 1/2 and p38-MAPKs were activated in our cell culture system. These results agree well with their contribution to the inducing effect of TGF-β1 on aggrecan [30] or TIMP-3 [31] expression in chondrogenic cells. Complementary experiments with specific kinase inhibitors showed that inhibition of MEK-1 by PD98059 reduced the stimulating effect of TGF-β1 by 2-fold. In contrast, the lack of efficiency of SB203580 demonstrated that p38-MAPK was not involved in TGF-β1-induced expression of *Ank*. Our results

Figure 7



Effect of Smad 7 overexpression on transforming growth factor-beta-1 (TGF-β1)-induced responses in rat chondrocytes. Rat chondrocytes were electroporated with either empty vector or wild-type Smad 7 overexpressing plasmid (2 μg/well of six-well plate) and then treated for 12 hours with 10 ng/mL of TGF-β1. Total RNA was extracted and subjected to real-time polymerase chain reaction analysis. The mRNA level of aggrecan **(a)** and Ank **(b)** was normalized to that of S29 mRNA and is expressed as mean percentages (± standard deviation) over control values from three independent experiments. Statistically significant differences from the control are indicated as $*p < 0.05$ and from TGF-β1-treated cells as $\#p < 0.05$.

are in accordance with other studies reporting that the contribution of the p38-MAPK pathway to the TGF-β1 effect in cartilage was influenced greatly by the species [32] and cell culture system [33].

To investigate further the contribution of the MEK-1 pathway, we modulated the expression of Ras and Raf-1 proteins, which are known to trigger MEK-1 activation in chondrocytes [34]. Our results showed that Ras and, to a lesser extent, Raf-1 were implicated in TGF-β1-induced expression of *Ank* in chondrocytes, a finding consistent with data demonstrating the activation of Ras and Raf-1 by TGF-β1 in several cell systems [35,36].

Furthermore, we demonstrated that the activation of ERK 1/2 by TGF-β1 was strongly dependent on the activation of Ras and Raf-1 since transfection with dominant-negative forms of these proteins completely inhibited the stimulating effect of TGF-β1. Moreover, constitutively active forms raised both basal and TGF-β1-induced ERK 1/2 phosphorylation. Taken together, these findings confirmed the linkage between activation of Ras/Raf-1, MEK-1, and ERK pathways [34-36] and highlighted their contribution to the induction of *Ank* by TGF-β1 in chondrocytes.

Ryan and colleagues [37] demonstrated that, in addition to MAPKs, adenylate cyclase activation and generation of cAMP reduced ePPi production in chondrocytes. The PKA pathway was also described to be induced by TGF-β1 in chondrocytes [38,39]. However, using RcAMP as a PKA inhibitor, we failed to demonstrate any contribution of PKA to the induction of *Ank* by TGF-β1.

In chondrocytes, the production of ePPi was also reported to be stimulated by PKC-dependent pathways [37], which are known to be activated by TGF-β1 [40]. We showed that the stimulation of *Ank* expression depended on PKC activation but with a variable effect of the inhibitors depending on their specificity for PKC isoenzymes. Thus, when cells were pretreated with calphostin C (a broad PKC inhibitor), a strong effect on Ank mRNA expression was observed whereas rottlerin (a PKCδ inhibitor) was weakly effective. These findings suggested that PKCδ, alongside the other members of the novel PKC family (PKCε, PKCη, and PKCθ [41]), was not implicated in the regulation of *Ank* expression by TGF-β1. In contrast, we demonstrated that Gö6976 (a Ca^{2+}-dependent PKCα and PKCβI isoenzyme inhibitor) was strongly inhibitory. Since the only difference between novel PKC and conventional PKC (for example, Ca^{2+}-dependent PKCα and PKCβI) activation is the dependence on calcium [41], our findings support a possible regulatory role for calcium in the induction of *Ank* expression by TGF-β1.

Some genes induced by TGF-β1 are partly or totally regulated by Smad proteins. We demonstrated that, in our experimental conditions, TGF-β1 was able to induce the phosphorylation of Smad 3, known to modulate the expression of chondrocyte-specific genes, such as aggrecan [42]. Smad 7 is a natural inhibitor of the Smad pathway, preventing Smad 3 phosphorylation in the cytosol and therefore suppressing Smad signaling [19]. Scharstuhl and colleagues [42] demonstrated that Smad 7 overexpression was able to counteract TGF-β1-induced expression of aggrecan in chondrocytes, as was the case in our experiments. However, we demonstrated that overexpression of wild-type Smad 7 failed to reduce TGF-β1-induced expression of *Ank* in chondrocytes, thus demonstrating that it was a non-Smad signaling event.

Taken as a whole, these observations suggest that, contrary to degenerative joint pathologies [43], targeting the non-Smad TGF-β1 signaling events may lead to insights in the field of

sporadic chondrocalcinosis since the repression of *Ank* would translate into reduced ePPi levels in synovial fluid. Thus, selective conventional PKC inhibitors should be powerful agents, considering that some of them, such as Gö6976 [44,45], are currently in clinical development for cardiovascular diseases and cancer. Moreover, probenecid was shown to inhibit *Ank* function [10] and TGF-β1-induced PPi elaboration by chondrocytes [12]. Therefore, the effect of the combination of probenecid and Gö6976 on CPPD formation could be worthy of study.

Conclusion

To summarize, the present study shows that TGF-β1 increases ePPi levels, with a major contribution of *Ank*, despite its similar inducing effect on *Ank* and *PC-1*. These results are in favor of a main role of *Ank* as an effector of TGF-β1 in CPPD formation. Induction of *Ank* is mediated by the dual activation of Ras, Raf-1, and MEK-1/ERK cascade and Ca^{2+}-dependent PKC but is independent of the Smad signaling pathway. Our data support the strong contribution of *Ank* to the pathogenesis of sporadic chondrocalcinosis, in addition to familial chondrocalcinosis, and identify signaling pathways involved in TGF-β1-induced *Ank* expression which could lead to new therapies for CPPD disease.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FC performed cell culture, RNA extraction, real-time quantitative PCR, ePPi assays, and siRNA assays and was involved in drafting the manuscript. AB carried out the inhibitor experiments, drafted the manuscript, and contributed to the study design. SS performed chondrocyte isolation, cell culture, Western blot analysis, and real-time quantitative PCR. NV participated in revising the manuscript and in the interpretation of data. DM carried out RNA extraction and participated in revising the manuscript. J-YJ and PN contributed to the study design and revised the manuscript for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the CPRC/PHRC, the CHU Nancy, and the Communauté Urbaine du Grand Nancy.

References

1. Liu-Bryan R, Liote F: **Monosodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals, inflammation, and cellular signaling.** *Joint Bone Spine* 2005, **72:**295-302.
2. Pendleton A, Johnson MD, Hughes A, Gurley KA, Ho AM, Doherty M, Dixey J, Gillet P, Loeuille D, McGrath R, *et al.*: **Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis.** *Am J Hum Genet* 2002, **71:**933-940.
3. Zhang Y, Johnson K, Russell RG, Wordsworth BP, Carr AJ, Terkeltaub RA, Brown MA: **Association of sporadic chondrocalcinosis with a – 4-basepair G-to-A transition in the 5'-untranslated region of ANKH that promotes enhanced expression of ANKH protein and excess generation of extracellular inorganic pyrophosphate.** *Arthritis Rheum* 2005, **52:**1110-1117.
4. Timms AE, Zhang Y, Bradbury L, Wordsworth BP, Brown MA: **Investigation of the role of ANKH in ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48:**2898-2902.
5. Reichenberger E, Tiziani V, Watanabe S, Park L, Ueki Y, Santanna C, Baur ST, Shiang R, Grange DK, Beighton P, *et al.*: **Autosomal dominant craniometaphyseal dysplasia is caused by mutations in the transmembrane protein ANK.** *Am J Hum Genet* 2001, **68:**1321-1326.
6. Rosenthal AK, McCarty BA, Cheung HS, Ryan LM: **A comparison of the effect of transforming growth factor beta 1 on pyrophosphate elaboration from various articular tissues.** *Arthritis Rheum* 1993, **36:**539-542.
7. Rachow JW, Ryan LM: **Inorganic pyrophosphate metabolism in arthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 1988, **14:**289-302.
8. Howell DS, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Morales S, Muniz O: **NTP pyrophosphohydrolase in human chondrocalcinotic and osteoarthritic cartilage. II. Further studies on histologic and subcellular distribution.** *Arthritis Rheum* 1984, **27:**193-199.
9. Ryan LM, Wortmann RL, Karas B, Lynch MP, McCarty DJ: **Pyrophosphohydrolase activity and inorganic pyrophosphate content of cultured human skin fibroblasts. Elevated levels in some patients with calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease.** *J Clin Invest* 1986, **77:**1689-1693.
10. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM: **Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis.** *Science* 2000, **289:**265-270.
11. Sweet HO, Green MC: **Progressive ankylosis, a new skeletal mutation in the mouse.** *J Hered* 1981, **72:**87-93.
12. Rosenthal AK, Ryan LM: **Probenecid inhibits transforming growth factor-beta 1 induced pyrophosphate elaboration by chondrocytes.** *J Rheumatol* 1994, **21:**896-900.
13. Xu Y, Pritzker KP, Cruz TF: **Characterization of chondrocyte alkaline phosphatase as a potential mediator in the dissolution of calcium pyrophosphate dihydrate crystals.** *J Rheumatol* 1994, **21:**912-919.
14. Gueme PA, Blanco F, Kaelin A, Desgeorges A, Lotz M: **Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development.** *Arthritis Rheum* 1995, **38:**960-968.
15. Rosen F, McCabe G, Quach J, Solan J, Terkeltaub R, Seegmiller JE, Lotz M: **Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation.** *Arthritis Rheum* 1997, **40:**1275-1281.
16. Ryan LM, McCarty DJ: **Calcium pyrophosphate crystal deposition disease, pseudogout, and articular chondrocalcinosis.** In *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology* 13th edition. Edited by: Koopman W. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997:2103-2126.
17. Hirose J, Ryan LM, Masuda I: **Up-regulated expression of cartilage intermediate-layer protein and ANK in articular hyaline cartilage from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease.** *Arthritis Rheum* 2002, **46:**3218-3229.
18. Sohn P, Crowley M, Slattery E, Serra R: **Developmental and TGF-beta-mediated regulation of Ank mRNA expression in cartilage and bone.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **10:**482-490.
19. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH: **Smad regulation in TGF-beta signal transduction.** *J Cell Sci* 2001, **114:**4359-4369.
20. Moustakas A, Heldin CH: **Non-Smad TGF-beta signals.** *J Cell Sci* 2005, **118:**3573-3584.
21. Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK: **Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. I. Isolation, culture characteristics, and morphology.** *J Cell Biol* 1982, **93:**743-750.
22. Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL, *et al.*: **The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling.** *Cell* 1997, **89:**1165-1173.
23. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, **76:**4350-4354.
24. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150:**76-85.

25. Terkeltaub R, Rosenbach M, Fong F, Goding J: **Causal link between nucleotide pyrophosphohydrolase overactivity and increased intracellular inorganic pyrophosphate generation demonstrated by transfection of cultured fibroblasts and osteoblasts with plasma cell membrane glycoprotein-1. Relevance to calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease.** *Arthritis Rheum* 1994, **37**:934-941.
26. Johnson K, Terkeltaub R: **Upregulated ank expression in osteoarthritis can promote both chondrocyte MMP-13 expression and calcification via chondrocyte extracellular PPi excess.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:321-335.
27. Punzi L, Oliviero F, Ramonda R: **Transforming growth factor-beta levels in synovial fluid of osteoarthritis with or without calcium pyrophosphate dihydrate crystals.** *J Rheumatol* 2003, **30**:420. author reply 420–421
28. Lotz M, Rosen F, McCabe G, Quach J, Blanco F, Dudler J, Solan J, Goding J, Seegmiller JE, Terkeltaub R: **Interleukin 1 beta suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC-1 in human chondrocytes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:10364-10368.
29. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millan JL: **Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:9445-9449.
30. Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y: **Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells.** *J Biol Chem* 2001, **276**:14466-14473.
31. Qureshi HY, Sylvester J, El Mabrouk M, Zafarullah M: **TGF-beta-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene in chondrocytes is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway and Sp1 transcription factor.** *J Cell Physiol* 2005, **203**:345-352.
32. Badger AM, Roshak AK, Cook MN, Newman-Tarr TM, Swift BA, Carlson K, Connor JR, Lee JC, Gowen M, Lark MW, *et al.*: **Differential effects of SB 24 a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, on IL-1 treated bovine and human cartilage/chondrocyte cultures.** *Osteoarthritis Cartilage* 2002, **8**:434-443.
33. Poleni PE, Bianchi A, Etienne S, Koufany M, Sebillaud S, Netter P, Terlain B, Jouzeau JY: **Agonists of peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) alpha, beta/delta or gamma reduce transforming growth factor (TGF)-beta-induced proteoglycans' production in chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 2007, **15**:493-505.
34. Krejci P, Masri B, Fontaine V, Mekikian PB, Weis M, Prats H, Wilcox WR: **Interaction of fibroblast growth factor and C-natriuretic peptide signaling in regulation of chondrocyte proliferation and extracellular matrix homeostasis.** *J Cell Sci* 2005, **118**:5089-5100.
35. Mulder KM, Morris SL: **Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells.** *J Biol Chem* 1992, **267**:5029-5031.
36. Reimann T, Hempel U, Krautwald S, Axmann A, Scheibe R, Seidel D, Wenzel KW: **Transforming growth factor-beta1 induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells.** *FEBS Lett* 1997, **403**:57-60.
37. Ryan LM, Kurup IV, Cheung HS: **Transduction mechanisms of porcine chondrocyte inorganic pyrophosphate elaboration.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:555-560.
38. Rosado E, Schwartz Z, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD: **Transforming growth factor-beta1 regulation of growth zone chondrocytes is mediated by multiple interacting pathways.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1590**:1-15.
39. Li TF, O'Keefe RJ, Chen D: **TGF-beta signaling in chondrocytes.** *Front Biosci* 2005, **10**:681-688.
40. Su S, DiBattista JA, Sun Y, Li WQ, Zafarullah M: **Up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in articular chondrocytes is mediated by serine/threonine and tyrosine kinases.** *J Cell Biochem* 1998, **70**:517-527.
41. Jaken S: **Protein kinase C isozymes and substrates.** *Curr Opin Cell Biol* 1996, **8**:168-173.
42. Scharstuhl A, Diepens R, Lensen J, Vitters E, van Beuningen H, van der Kraan P, van den Berg W: **Adenoviral overexpression of Smad-7 and Smad-6 differentially regulates TGF-beta-mediated chondrocyte proliferation and proteoglycan synthesis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2003, **11**:773-782.
43. Blom AB, van der Kraan PM, van den Berg WB: **Cytokine targeting in osteoarthritis.** *Curr Drug Targets* 2007, **8**:283-292.
44. Goekjian PG, Jirousek MR: **Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development.** *Curr Med Chem* 1999, **6**:877-903.
45. Hanauske AR, Oberschmidt O, Hanauske-Abel H, Lahn MM, Eismann U: **Antitumor activity of enzastaurin (LY317615.HCl) against human cancer cell lines and freshly explanted tumors investigated *in vitro* soft-agar cloning experiments.** *Invest New Drugs* 2007, **25**:205-210.

I.A.3. Conclusions

Caractérisation du phénotype des chondrocytes articulaires utilisés dans nos travaux

L'étude des l'expression de plusieurs marqueurs du phénotype du chondrocyte articulaire laisse apparaître une très forte expression du collagène de type II et de l'agrécane. Par ailleurs, l'expression du collagène de type I signe d'une dédifférenciation du chondrocyte par « repiquage » en culture n'a pu être détecté, tout comme n'a pu l'être l'expression de collagène de type X, caractéristique des chondrocytes hypertrophiques.

Nos chondrocytes peuvent donc être qualifiés de chondrocyte articulaires.

Validation des effets du TGF-β1 sur le métabolisme du PPi

Nous avons pu mettre en évidence une induction de l'expression en ARNm et en protéine d'*Ank* et *PC-1* par le TGF-β1, confirmant les résultats déjà publiés dans la littérature. Nous retrouvons également dans notre modèle une induction de l'activité nucléotide pyrophosphatase phosphodiestérase de PC-1 par le TGF-β1, ainsi qu'une élévation du niveau d'ePPi après stimulation des cellules par ce facteur de croissance. Par ailleurs, nous n'avons pu détecter l'expression de TNAP ni en ARNm, ni en terme d'activité phosphatase alcaline, ce qui est cohérent pour le chondrocyte articulaire (activité TNAP d'ordinaire retrouvée dans les zones de cartilage hypertrophique ou dans le tissu osseux).

La stimulation de nos cellules par le TGF-β1 induit fortement l'expression gènes responsables de la production d'ePPi, ainsi que le niveau d'ePPi généré.

Contribution respective d'ANK et PC-1 dans la génération d'ePPi des chondrocytes stimulés par le TGF-β1

Après avoir validée la spécificité de nos siRNA dirigés contre Ank et PC-1, nous avons mis en évidence que seul le siRNA dirigé contre Ank était capable d'inhiber la production basale d'ePPi (d'environ 33%). Par ailleurs, ce siRNA diminue la production d'ePPi stimulée par le TGF-β1 d'environ 65%, alors que le siRNA dirigé contre PC-1 ne la diminue que de 16%.

Il apparaît donc que la génération d'ePPi induite par le TGF-β1 dépende majoritairement d'ANK.

Voies de signalisation activées par le TGF-β1 dans notre modèle

La stimulation des chondrocytes par le TGF-β1 induit la phosphorylation d'ERK 1/2 et de p38 MAPK, mais également de Smad 3 et des PKC. Nous n'avons pu détecter aucune activation de JNK par le TGF-β1 dans notre modèle.

Les voies « Smad dépendantes » et « Smad indépendantes » sont donc activées au sein de nos chondrocytes stimulés par le TGF-β1.

Voies de signalisation activées par le TGF-β1 impliquées dans l'induction d'*Ank* dans notre modèle

L'utilisation des inhibiteurs chimiques sélectifs des voies de signalisation activées par le TGF-β1 nous a permis de mettre en évidence que seules ERK 1/2 et les PKC Ca^{2+}-dépendantes sont impliquées dans les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression de l'ARNm d'Ank. Nous avons également pu mettre en évidence grâce à la transfection de plasmide de surexpression de dominants négatifs et de formes constitutivement actives, que Ras et Raf-1 étaient activées en amont d'ERK 1/2 dans les effets du TGF-β1 sur Ank, contrairement à la voie Smad dont l'inhibition par la surexpression de Smad 7 n'avait eu aucun effet.

Le TGF-β1 induit donc l'expression d'Ank via la voie Ras/Raf-1/ERK 1/2, tout en dépendant également de l'activation des PKC Ca^{2+}-dépendantes.

Un schéma de synthèse de ces travaux est proposé en Figure 15.

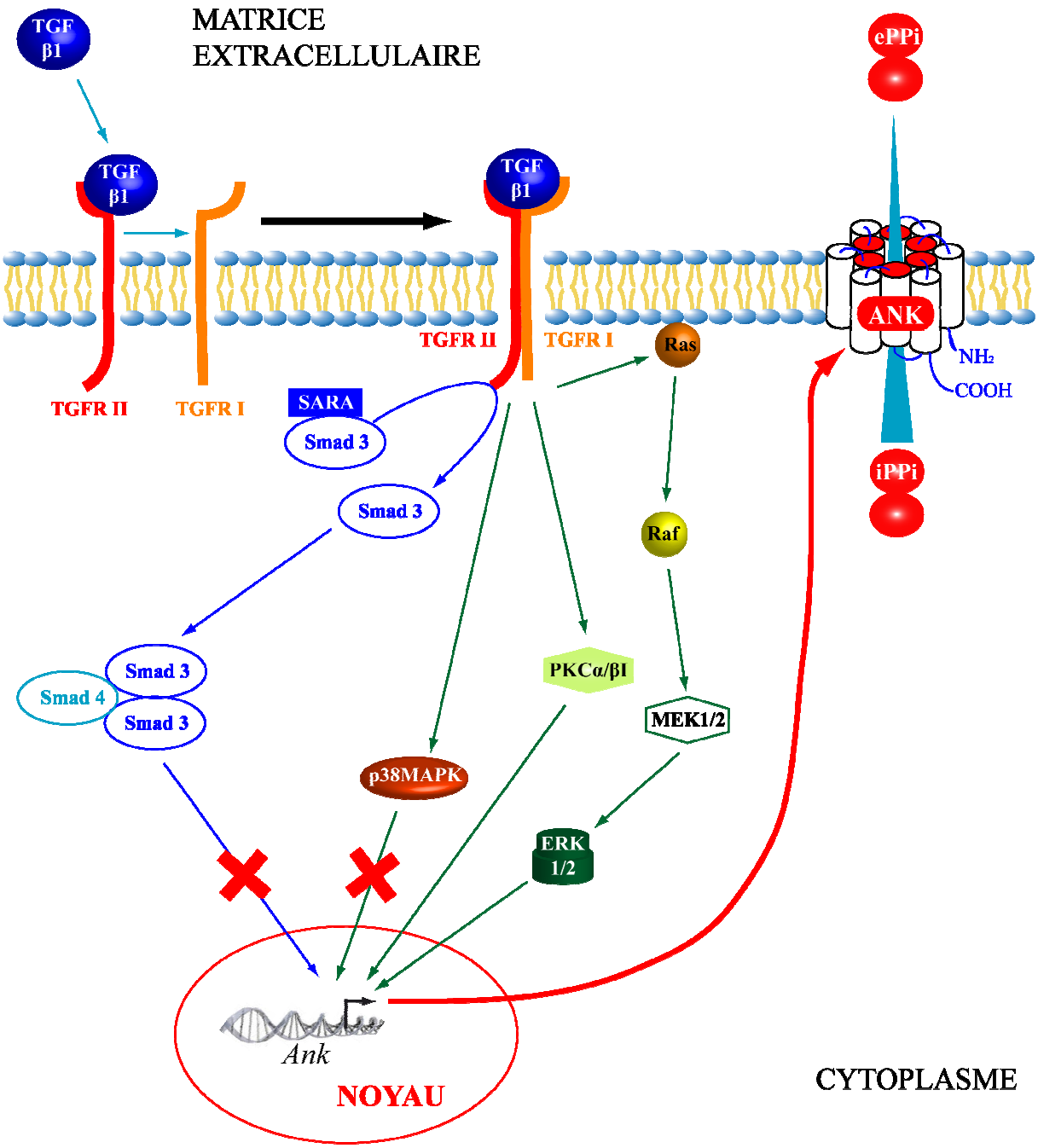


Figure 15: La production d'ePPi par les chondrocytes stimulés avec le TGF-β1 dépend principalement de l'induction d'ANK par la voie Ras/Raf-1/ERK 1/2

I.B. Résultats complémentaires

Impact d'une invalidation conjointe de l'expression d'*Ank* et *PC-1* sur la production d'ePPi par des chondrocytes stimulés avec le TGF-β1

Cette expérience a été mis en place afin d'approfondir une hypothèse émise par le groupe de Robert Terkeltaub selon laquelle ANK et PC-1 agiraient de façon coordonnée et pourraient influer l'un sur l'autre dans la production d'ePPi (Johnson et Terkeltaub, 2004). Pour ce faire, nous avons transfectés les chondrocytes articulaires avec deux séquences siRNA (10 nM), l'une dirigée contre Ank et la deuxième dirigée contre PC-1. Ces cellules ont ensuite été stimulées 24 h avec le TGF-β1 (10 ng/ml) en vue d'évaluer la production d'ePPi par les chondrocytes dans le surnageant de culture. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 16 ci-dessous. Les concentrations en ePPi (moyennes de six expériences indépendantes) sont exprimées en pmol/µg de protéine. Les différences significatives ($p<0,05$) sont : * en comparaison avec le scramble, # en comparaison avec le scramble + TGF-β1 et ¶ en comparaison avec la condition siRNA Ank correspondantes.

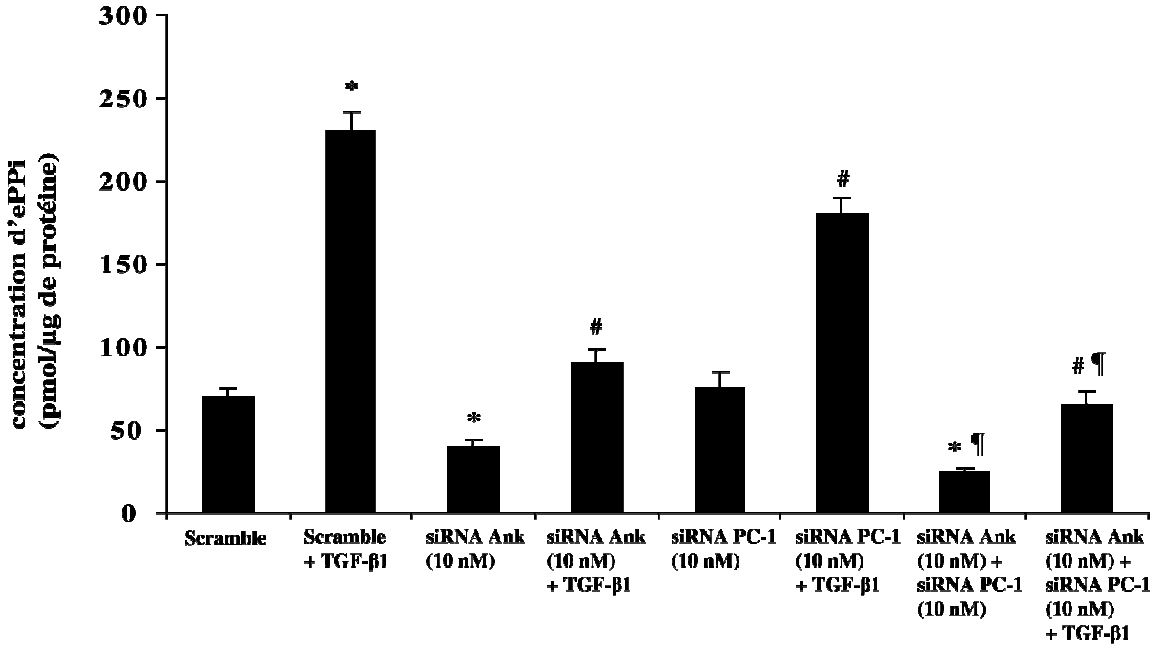


Figure 16 : Impact d'une invalidation individuelle ou conjointe d'Ank et PC-1 sur la génération d'ePPi stimulée par le TGF-β1

Nous avons pu mettre en évidence que l'invalidation simultanée d'*Ank* et *PC-1* entraîne une diminution plus importante de la génération d'ePPi comparativement à la somme des effets de chaque siRNA utilisé séparément. D'une part, la production basale d'ePPi est réduite de 65% dans le cas de la double transfection en comparaison à environ 33 % pour le cumul des effets de l'invalidation séparé d'Ank et PC-1. D'autre part, la génération d'ePPi stimulée par le TGF-β1 est complètement inhibée dans le cadre de l'invalidation conjointe, vis-à-vis d'une inhibition cumulée « théorique » de 65% (siRNA Ank) + 16% (siRNA PC-1).
Il existe ainsi une différence significative entre l'invalidation de chacune des protéines intervenant dans la production d'ePPi et leur invalidation conjointe, ce qui semble en faveur de l'hypothèse avancée par le groupe de Terkeltaub.

Voies de signalisation activées par le TGF-β1 impliquées dans l'induction d'*Ank* dans notre modèle

Au vu des résultats de l'invalidation conjointe d'*Ank* et *PC-1*, il nous a paru intéressant de contrôler si le mécanisme de régulation de l'induction de l'ARNm de PC-1 par le TGF-β1 pouvait avoir des points communs avec celui que nous mettons en évidence pour l'ARNm d'Ank. Pour ce faire, nous avons d'abord placé les chondrocytes articulaires en présence de l'inhibiteurs chimique sélectif PD98059 (10 µM, inhibiteur de MEK 1/2), puis nous les avons stimulés avec le TGF-β1 (10 ng/ml) pendant 24 h. Nous avons également évalué l'impact des dominants négatifs de Ras et Raf-1, ainsi que de la Smad inhibitrice (Smad7) sur des cellules stimulées 24 h avec le TGF-β1 (10 ng/ml). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 17. L'expression de l'ARNm de PC-1 est normalisée sur celle de S29 (gène de ménage) (moyenne de trois expériences indépendantes) et exprimée en pourcentages moyens vis-à-vis des valeurs contrôles. Les différences significatives ($p<0,05$) sont : * en comparaison avec l'absence de TGF-β1, et # en comparaison avec le véhicule/WT/Vecteur vide + TGF-β1.

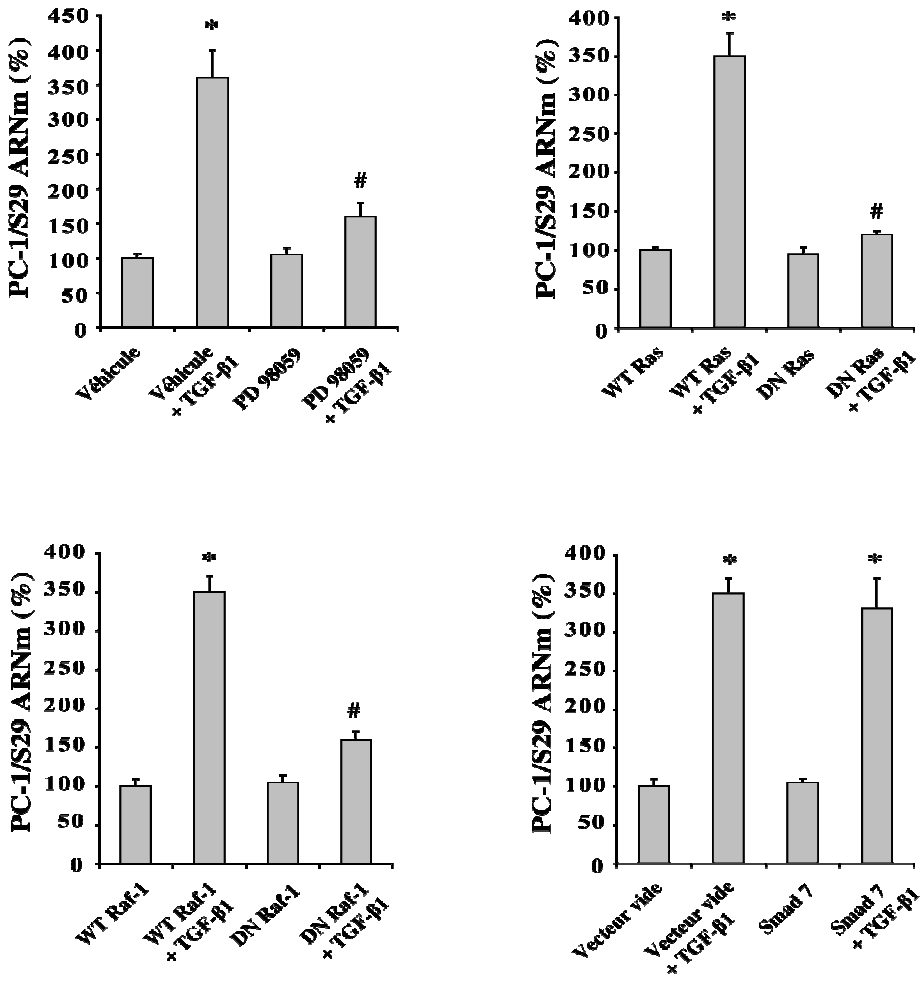


Figure 17 : Etude des voies de signalisation impliquées dans l'expression de l'ARNm de PC-1 en présence ou en absence de TGF-β1

WT: forme sauvage, DN: forme dominant négatif

Nous avons pu mettre en évidence que l'inhibition de la voie MEK 1/2 avec l'inhibiteur chimique sélectif PD 98059 bloque environ 56% de l'effet inducteur du TGF-β1 sur l'expression de l'ARNM de PC-1. De manière similaire, la transfection des chondrocytes avec les plasmides surexprimant un dominant négatif de Ras et Raf-1 s'oppose aux effets de ce facteur de croissance, diminuant son effet de 65% et 55% respectivement. Aucun effet n'est observé avec la transfection du plasmide surexprimant la Smad inhibitrice Smad 7.

Ces résultats indiquent que l'effet inducteur du TGF-β1 sur l'expression de l'ARNm de PC-1 passe par la voie Ras/Raf-1/ERK 1/2, et ceci indépendamment de la voie des Smad, tout comme dans le cas de la stimulation de l'expression de l'ARNm d'Ank. L'utilisation d'un inhibiteur de PKC Ca^{2+}-dépendantes (Gö6976) est prévue pour vérifier si cette voie de signalisation, fortement impliquée dans les effets du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank,* l'est également pour celle de *PC-1*.

II. Contribution du gène *Ank* dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire

II.A. Article 3 : "The inorganic pyrophosphate transporter ANK preserves the differentiated phenotype of articular chondrocyte."

II.A.1. Objectifs du travail

De nombreuses études ont pu établir une corrélation entre le niveau d'expression d'Ank et le phénotype cellulaire de cellules de la lignée ostéo-articulaire (Johnson *et al.*, 2005 ; Johnson *et al.*, 2008 ; Kirsch *et al.*, 2009). Néanmoins, ces travaux n'ont jamais directement défini le rôle de l'ePPi lui-même dans ces phénomènes. La perte des marqueurs caractéristiques du chondrocyte articulaire au cours de l'arthrose est un phénomène bien caractérisé à l'heure actuelle (Aigner *et al.*, 2007), et l'implication de IL-1β dans ces processus a elle-aussi été mise en évidence (Goldring *et al.*, 1994). Or l'influence des Wnt dans la mise en place et l'orientation du phénotype des cellules articulaires est un phénomène très bien caractérisé (Church et Francis-West, 2002), et il se trouve que de récents travaux ont démontré l'implication de Wnt-5a et Wnt-7a dans la perte du phénotype chondrocytaire induite par l'IL-1β (Ryu et Chun, 2006). Enfin, l'IL-1β diminue également de la production d'ePPi par les chondrocytes articulaires (Lotz *et al.*, 1995), et il a clairement été mis en évidence une association fréquente des cristaux de PPCD avec l'arthrose (Cheung, 2005) Tous ces éléments sont en faveur d'une influence d'*Ank* et de l'ePPi que la protéine exporte sur le phénotype du chondrocyte articulaire. Nous avons ainsi voulu savoir quel pouvait être l'effet d'une variation de l'expression d'*Ank* (surexpression et invalidation) et d'ePPi sur les marqueurs caractéristiques du chondrocyte articulaire. Nous nous sommes également intéressé aux effets de ces variations sur l'expression des Wnt, ainsi que sur l'éventuelle l'activation des voies de signalisation « canonique » et « non-canonique » qui pourrait en résulter.

II.A.2. Article

Cet article est en révision dans la revue The Journal of Biological Chemistry.

The inorganic pyrophosphate transporter ANK preserves the differentiated phenotype of articular chondrocyte

F. Cailotto[1], S. Sebillaud, P. Netter, J-Y. Jouzeau and A. Bianchi

UMR 7561 CNRS-Nancy-Université, Laboratoire de Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires (LPPIA). Faculté de Médecine, Avenue de la forêt de Haye, BP184, 54505 Vandœuvre-Lès-Nancy, France.

Authors:

[1]Corresponding author, Frédéric CAILOTTO, MSc: frederic.cailotto@hotmail.fr
Phone: + 33(0)3 83 68 39 50
Fax: + 33(0)3 83 68 39 59
Sylvie SEBILLAUD, BSc: sebillaud@medecine.uhp-nancy.fr
Patrick NETTER, MD, PhD: netter@medecine.uhp-nancy.fr
Jean-Yves JOUZEAU, PharmD, PhD: jouzeau@medecine.uhp-nancy.fr
Arnaud BIANCHI, PhD: arnaud.bianchi@medecine.uhp-nancy.fr

Running title: Maintenance of articular chondrocyte phenotype by ANK

Articular chondrocyte phenotype is altered during osteoarthritis. Wnt proteins and interleukin-1β (IL-1β) are key players of chondrocyte dedifferentiation and the inorganic pyrophosphate (PPi) transporter Ank regulates cell differentiation during endochondral ossification. We investigated whether ANK and PPi contributed to maintenance of chondrocyte phenotype and the implication of Wnt signaling. The dual impact of Ank overexpression on IL-1β-induced dedifferentiation and of Ank RNA silencing on phenotype of mature chondrocytes was studied. Conditioned supernatants were used to assess Wnt signaling with reporter constructs. IL-1β induced Wnt-5a while reducing expression of Ank, Type II collagen and Sox-9. Ank overexpression reduced IL-1β effects on Wnt-5a, Type II collagen and Sox-9 expression, as did PPi supplementation independently of JNK activation. Ank knock-down mimicked IL-1β effects on cartilage specific genes and conditioned supernatants contained Wnt-5a which activated the Wnt canonical pathway. Once again, PPi supplementation compensated for Ank deficiency. Thus, Ank preserves chondrocyte phenotype by controlling PPi levels which regulates Wnt canonical pathway by reducing Wnt-5a expression.

Articular chondrocyte phenotype is mainly characterized by the expression of genes coding for cartilage-specific extracellular matrix (ECM) molecules or their regulators, such as Type II collagen, Sox-9 and Aggrecan, responsible for the maintenance of cartilage anabolism (1,2). There is a dominant influence of the ECM composition on the chondrocytic phenotype since changes in its composition, like depletion in proteoglycan content and destabilization of the supramolecular collagen network, result in chondrocyte proliferation and partial loss of the articular phenotype (3). Moreover, the balance between ECM synthesis and degradation is disturbed during osteoarthritis (OA), which is also characterized by a progressive loss of the chondrocyte phenotype (dedifferentiation) and an enhanced cell apoptosis (4). Several factors,

including the family of Wnt proteins, are thought to play a key role both in the occurrence and the maintenance of these articular hallmarks (5,6).
Since the discovery of Wnt genes (7), 20 members have been described in the Wnt family, that act on the Frizzled receptors, to initiate signaling cascades resulting in the regulation of cell adhesion or the expression of genes of the homeobox family (8,9). Wnt proteins activate cell transduction by two major ways: i) activation of the β-catenin-Tcf pathway, referred as the canonical pathway, ii) signaling *via* the cytoskeleton or the JNK pathway/PKC pathway, referred together as the non-canonical pathways (10-12). Canonical Wnt pathway activation induces nuclear translocation of β-catenin and its dimerization with T-cell factor/Lymphoid enhancer factor (Tcf/Lef), resulting in the displacement of co-repressors, thus activating the transcription of target genes (13).

Wnt proteins and Frizzled receptors are thought to be involved in cartilage destruction, as they are increasingly expressed in OA cartilage (14,15). On the other hand, several exogenous recombinant Wnt proteins (including Wnt-3a, and -7a) suppress Type II collagen reporter gene expression in a chondrogenic cell line based on RCJ3.1(C5.18) cells (16). However, the effect of Wnt proteins may depend on the protein involved. Thus, expression of Wnt-5a blocked the differentiation of articular chondrocytes during development (17), whereas exposure to Wnt-7a caused chondrocyte dedifferentiation by stimulating β-catenin transcriptional activity (18). Moreover, chondrocytes express low basal levels of β-catenin, and overexpression of β-catenin caused dedifferentiation of chondrocytes (19). These observations suggest a major regulatory role of Wnt proteins on chondrocyte phenotype, and a link between the loss of chondrocyte phenotype and the activation of the β-catenin pathway.

Interleukin (IL)-1β produced by chondrocytes, synovial fibroblasts, and inflammatory cells is a major pro-inflammatory cytokine involved in cartilage degradation and inhibition of ECM synthesis in OA (20-22). As a consequence, IL-1β modifies the cell-matrix interactions and induces phenotypic changes in chondrocytes. Recently, a study demonstrated that Wnt-5a and Wnt-7a were up-regulated by IL-1β, and contributed to chondrocyte dedifferentiation by activating the canonical and non-canonical Wnt signaling pathways (23). IL-1β was also described as a potent inhibitor of inorganic pyrophosphate (PPi) generation by chondrocytes (24), and we recently demonstrated that PPi transporter ANK was the main contributor of ePPi production in this cell type (25). Interestingly, ANK dysfunction facilitates the occurrence of calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) deposition, which is often associated with OA (26). Other experiments have shown that Ank mRNA is developmentally regulated in cartilage of mouse embryo (27) whereas an excess of ePPi affected osteoblasts phenotype to control the bone mineralization process (28). These observations support the key role of IL-1β in the loss of chondrocyte phenotype and question the possible contribution of PPi and its transporter ANK to this process.

Our work aimed to investigate the role of *Ank* and ePPi in the OA-like dedifferentiation process of articular chondrocyte induced by IL-1β challenge, and to elucidate the molecular mechanisms underlying this phenomenon. Ank overexpression and RNA silencing suggest that *Ank* and ePPi are implicated in articular chondrocyte phenotype sustain. The dedifferentiation process seems driven by the up-regulation of Wnt-5a at the mRNA and protein levels. This triggers the nuclear translocation of β-catenin, activating the canonical, but not the non-canonical JNK-related Wnt pathway. Addition of exogenous PPi compensates partly the dedifferentiation process induced by Ank knock-down, by decreasing the activation of the Wnt canonical pathway. Finally, exogenous PPi does not affect the activation of the non-canonical Wnt pathway by IL-1β, but reduced its effect on the loss of chondrocytic phenotype.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chondrocyte isolation and culture- Articular cartilage was obtained from 6 weeks-old healthy male Wistar rats (130-150 g) that were killed under dissociative anesthesia [ketamine (Rhône-Mérieux, France) and acepromazine (Sanofi Santé Animale, France)] in accordance with our local ethics committee and the national animal care guidelines. Articular cartilage pieces were aseptically dissected from femoral head caps and chondrocytes were obtained by sequential digestion with pronase and collagenase B (Roche Molecular Biochemicals, France) as described previously (29). Cells were washed twice in PBS and cultured to confluence in 75-cm^2 flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5%

CO_2. Cells were maintained in DME/F-12 supplemented with L-glutamine (2 mM), gentamicin (50 µg/ml), amphotericin B (0.5 µg/ml), and 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen, France). In all the experiments, we used first passaged chondrocytes plated at 4.10^5 cells/well in six-well plates. For nuclear extracts preparation, chondrocytes were seeded at 3.10^6 cells/75-cm^2 flask.

Chemicals- All chemical reagents were obtained from Sigma (France), unless specified.

Study design- Firstly, we studied the changes in chondrocytes phenotype induced by IL-1β challenge (18). For that goal, chondrocytes were stimulated with 10 ng/ml of IL-1β (R&D Systems, France) in DME/F-12 containing 1% FCS. Expression of cartilage specific genes was studied by RT-qPCR at 36 h and ePPi level was assessed in culture supernatants at 72 h.

Secondly, to investigate the contribution of *Ank* to the maintenance of chondrocyte phenotype, we transfected chondrocytes either with a plasmid overexpressing ANK or with siRNA directed against *Ank*. Expression of cartilage specific genes was analyzed by RT-qPCR, and immunocytochemistry was performed for ANK, Type II collagen and Wnt-5a.

Thirdly, the supernatant (referred to as conditioned supernatant) harvested from cells transfected for 72 h with either scramble or Ank siRNA A was used on chondrocytes monolayers to check for its ability to activate the canonical (electroporation of Tcf/Lef reporter plasmids and western blotting of nuclear β-catenin) and non-canonical (western blotting of JNK phosphorylation) Wnt pathways. These experiments were repeated respectively with mock and neutralizing Wnt-5a antibodies to define the contribution of Wnt-5a in these processes.

In another set of experiment, chondrocytes monolayers were stimulated with conditioned supernatant from cells transfected with Ank siRNA in the presence and the absence of 0.1 mM of exogenous PPi, to compensate for the loss of Ank expression. Expression of cartilage specific genes was analyzed by RT-qPCR and the Tcf/Lef canonical pathway was checked with a plasmid reporter assay. PPi was freshly prepared as a mixture of $Na_2H_2P_2O_7$ and $Na_4P_2O_7$ (pH 7.4).

Lastly, the impact of exogenous PPi on the IL-1β-induced activation of JNK was studied by western blotting. Moreover, the regulation of cartilage-specific genes expression induced by the IL-1β challenge was analyzed in the presence and the absence of the JNK inhibitor SP600125 (5 µM), since activation of JNK was shown to inhibit Type II collagen expression in chondrocyte (23).

Extracellular PPi (ePPi) Assay- ePPi levels were measured using the differential adsorption of UDP-(6-^{3}H) glucose (GE Healthcare, France), and its reaction product 6-phospho-(6-^{3}H) gluconate on activated charcoal, as previously described (30). The standard concentrations, ranging from 10 to 400 pmol of PPi, were included in each assay. After adsorption of the reaction mixture on charcoal, and centrifugation at 16000 *g* for 10 min, 100 µl of the supernatant was counted for radioactivity in 5 ml of Bio-Safe II (Research Products International Corp, USA). Results were expressed as pmol of ePPi per microgram of total cell proteins (quantified by bicinchonic acid assay).

RNA extraction and RT-PCR analysis- Total RNA was isolated using RNeasy plus mini kit® (Qiagen, France), which allows the total removal of genomic DNA with an on-column DNase. 500 ng of total RNA were reverse-transcribed for 90 minutes at 37°C in a 20 µl reaction mixture containing 2.5 mM dNTP, 5 µM random hexamer primers, 1.5 mM $MgCl_2$, and 200 U Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen, France). Amplification of generated cDNA was performed in the Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf).

Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR)- To quantify mRNA expression of target genes, a RT-qPCR was performed using the Lightcycler® (Roche) technology. PCR was done with SYBRgreen master mix system (Qiagen). The gene-specific primer pairs are provided in Table 1. Melting curve was performed to determine the melting temperature of the specific PCR products and after amplification the product size was checked on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml). Each run included positive and negative reaction controls. The mRNA level of the gene of interest and of S29, chosen as housekeeping gene, was determined in parallel for each sample. Quantification was determined using a standard curve made for each assayed gene, from a purified PCR product, with concentrations ranging from 10^{-3} to 10^{-9} ng/ml. Results were expressed as the ratio of the mRNA level of each gene of interest over *S29* gene.

RNA silencing experiments- SiRNA sequences (Table 2) were designed by Eurogentec (France). Transfections were carried out with each siRNA

at a final concentration of 10 nM, using INTERFERin (Polyplus-transfection SA, France). SiRNA were diluted in serum-free medium, INTERFERin was then added to the mix for a short incubation at RT. Cells were then washed with PBS and placed in serum-free medium. The siRNA-INTERFERin mix was then added to the culture for 24 h. After this time, cells were stimulated or not with 0.1 mM of PPi for 48 h.

Preparation of conditioned supernatants.- Supernatants from chondrocytes transfected either with scramble or with Ank siRNA A were harvested and clarified by centrifugation at 12000 *g* for 5 min, and then concentrated 50-fold using Microcon (Millipore) centrifugation devices with a 30-kDa molecular mass cut-off. In one set of experiments, harvested supernatants were incubated either with mock or with anti-Wnt-5a antibodies (Santa Cruz Biotechnology), each used at 0.4 µg/ml, at 37°C for 1 h, prior being clarified and concentrated as described above.

Immunocytochemistry- Chondrocytes were seeded at 10^4 cells per chamber in Lab-Tek II Chamber Slide (Nunc GmbH & Co.KG, Germany). Immunocytochemistry was processed using LSAB+ System-HRP kit (DakoCytomation, USA) on cells fixed with a 4% PBS-PFA solution (pH 7.4) for 15 min at 37°C. Cell peroxydases were blocked using a 3% H_2O_2 solution on monolayers for 5 min. After two washings with PBS, chondrocytes were incubated for 30 min with primary antibodies against ANK, Type II collagen (Millipore, France) or Wnt-5a (Santa Cruz Biotechnology, USA) used at 1/100 in PBS-1% BSA. Purified antibody against ANK was designed by Eurogentec, using a keyhole limpet hemocyanin-coupled peptide of the following sequence NH_2-A-E-E-V-T-D-I-V-E-M-R-E-E-N-E-COOH.

After washings with PBS, cells were incubated for 30 min with biotinylated anti-rabbit and anti-mouse IgG. After PBS washings, chondrocytes were incubated for 15 min with streptavidin conjugated to HRP. Cells were then stained using a solution containing DAB as a chromogen and H_2O_2. Counterstaining was done using Harris Hematoxylin. Images were acquired in air medium at RT using DMD108 microimaging device, which is connected to a 3 million pixel charge - coupled device camera (Leica Microsystems GmbH, Germany) and software Leica Acquisition Suite. Magnification was 10X and numerical aperture was 0.25.

Nuclear extracts preparation- To study the translocation of β-catenin in the nucleus, nuclear fractions were isolated from cells stimulated for 48 h with either conditioned supernatants or with 10 mM of LiCl as a positive control for nuclear translocation of β-catenin. Briefly, chondrocytes were harvested and placed in a cold buffer (pH 7.9) containing 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT and one tablet of complete mini protease inhibitor cocktail (Roche). After 15 min of incubation at 4°C, 0.6% Igepal CA-630 was added to the cell suspension, which was then homogenized. Nuclei were pelleted by centrifugation for 5 min at 4°C and 200 *g*. Supernatant, containing the cytosolic fraction was harvested. Nuclei were lysed in a cold buffer containing 20 mM Hepes, 0.4 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 0.25% Igepal CA-630 and one tablet of complete mini protease inhibitor cocktail (Roche). Lysate was then centrifuged 10 min at 4°C and 12000 *g*. Cytosolic and nuclear proteins were quantified by bicinchonic assay and used to assess β-actin and β-catenin respectively by western blot.

Western blot analyses- Concentrated supernatants were placed in final concentration of 1X Laemmli buffer. For JNK analyses, chondrocytes were harvested and lysed in 1X Laemmli buffer. Samples were run on SDS-PAGE (10%) and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane. After 2 h in blocking buffer (TBS-Tween-5% non-fat dry milk), membranes (Immobilon, Waters, France) were washed three times with TBS-Tween and incubated overnight at 4°C with antibodies against either phospho- and total-JNK (Cell signaling technology) used at 1/500, or against Wnt-5a and β-catenin (Affinity BioReagents, USA) used at 1/1000 or against β-actin (Sigma) used at a dilution of 1/4000. After three washings with TBS-Tween, the blot was incubated with anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (Cell Signaling Technology) at a 1/2000 dilution in blocking buffer for 1 h at room temperature. After four washings with TBS-Tween, protein bands were detected by chemiluminescence with the Phototope Detection system according to manufacturer's recommendations (Cell Signaling Technology). The band intensities were quantified by densitometry with a computerized image processing system (Gnome, Syngene).

Plasmid Electroporation- Chondrocytes were electroporated as previously described (25), in

two set of experiments. In the mRNA expression study, cells were transfected with 6 μg of either empty pcDNA3.1 (Invitrogen) used as control, or a plasmid encoding for wild-type Ank (pANK). For that goal, *Ank* coding DNA sequence was cloned from chondrocytes (GenBank accession number NP 446166) in pcDNA3.1. Cells were then stimulated or not with 10 ng/ml of IL-1β for 48 h before RNA extraction. Plasmid pmaxGFP™ (Amaxa biosystems), encoding a GFP was used to determine the transfection efficiency. In the Tcf/Lef reporter plasmid study, 3 μg of either TOPFlash (wild-type Lef-binding site) or FOPFlash (control, mutated Lef-binding site) (Millipore), and 600 ng of pCMV-Renilla (Promega, France) were electroporated in chondrocytes.

Reporter Gene Assay- Luciferase activities were measured using Dual-Luciferase Reporter Assay kit (Promega). Briefly, electroporated cells were stimulated for 48 h with conditioned supernatant. After two washings with PBS, cells were lysed in 1X passive lysis buffer for 15 min. Cell lysate was placed in LAR II (substrate for firefly luciferase) and luminescence was read with a Sirius luminometer (Berthold technologies, France). Afterwards, Stop & Glo reagent was added to the sample (substrate for renilla luciferase) and luminescence was acquired by the same way. Cells stimulated with LiCl (10 mM) for 48 h were used as a positive control for Tcf/Lef signaling. Results were expressed as mean ratio of luciferase activity, firefly/renilla.

Statistical analysis- Results are expressed as the mean ± S.D. of at least three independent assays. Comparisons were made by ANOVA, followed by Fisher's *t post-hoc* test, using the Statview™ 5.0 software (SAS Institute Inc). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Ank overexpression reduces the IL-1β-induced changes in phenotype markers in articular chondrocyte. As shown in Figure 1A, IL-1β reduced Type II collagen and Sox-9 by 6.5-fold and 3-fold respectively. A concomitant 3-fold decrease of Aggrecan mRNA level by IL-1β was also observed. In these experimental conditions, Ank expression was reduced by 4-fold whereas Wnt-5a mRNA level increased by 2.5 fold. No expression of either Type I and X collagens or Wnt-3a was detected in basal conditions whereas Wnt-7a mRNA level remained unaffected in response to IL-1β challenge (Figure 1A). Consistently with its inhibitory effect on Ank expression, we demonstrated that IL-1β reduced ePPi generation by 3-fold in chondrocyte (Figure 1B). These data confirmed the inhibitory effect of IL-1β on the mRNA expression of cartilage-specific markers, but underlined both the parallel inhibition of Ank expression and ePPi generation, and the inverse variation of Wnt-5a.

A control experiment confirmed the efficiency of transfection and the functionality of our plasmid since Ank mRNA level was approximately 50-fold higher in chondrocytes transfected with pANK than with empty vector (data not shown). In chondrocytes electroporated with Ank overexpression plasmid, ePPi production was around 4-fold higher than in cells transfected with empty vector, again demonstrating the activity of our construct (Figure 1B). Moreover, the inhibitory effect of IL-1β on ePPi generation was totally countered in cells transfected with pANK (Figure 1B). In these conditions, the effect of IL-1β on Wnt-5a expression was almost completely suppressed, whereas the mRNA level of Type II collagen and Sox-9 were solely diminished by 50% and 30% respectively (Figure 1C). These data demonstrated that ANK overexpression counteracted greatly the dedifferentiating effect of IL-1β in chondrocytes.

Ank silencing mimics IL-1β effect on phenotype markers in articular chondrocytes. We previously demonstrated that our siRNA reduced the basal expression of Ank by at least 90% in chondrocytes without affecting that of the housekeeping gene (25). As shown in Figure 2A, Ank mRNA expression was strongly reduced in presence of either Ank siRNA. Moreover, cell transfection with either Ank siRNA induced Wnt-5a mRNA expression by at least 2.5-fold compared to chondrocytes transfected with scramble. In contrast, Type II collagen expression was reduced by 50% to 75% and Sox-9 expression by 35% to 40% by *Ank* silencing. Immunocytochemical analysis confirmed that siRNA reduced efficiently the number of chondrocytes staining positively for Ank and Type II collagen, while increasing the number of Wnt-5a positive cells (Figure 2B).

Altogether, these observations indicated that transient Ank knock-down induced Wnt-5a expression, and a partial loss of articular chondrocyte specific markers at the mRNA and protein level.

Supernatant of chondrocytes knocked-down for Ank activate the canonical Wnt pathway in chondrocyte monolayers.

As depicted in Figure 3A, the conditioned supernatant of either Ank siRNA-transfected chondrocytes activated the Tcf/Lef (TOPFlash) reporter plasmid by 2-fold compared to conditioned supernatant obtained from cells transfected with scramble. Control experiment showed that TOPFlash plasmid was activated with 10 mM of LiCl, indicating the functionality of the construct. In addition, the defective FOPFlash construct was activated neither by LiCl, nor by conditioned medium of *Ank* knocked-down chondrocytes. Western blot analyses demonstrated that Wnt-5a was released marginally in conditioned supernatant of cells transfected with scramble but was strongly expressed in these from Ank siRNA-transfected chondrocytes (Figure 3B). When conditioned supernatants were incubated with anti-β-actin (mock) or anti-Wnt-5a antibodies, prior to stimulation of chondrocytes electroporated with the Tcf/Lef reporter plasmid, only the neutralization of Wnt-5a blocked the reporter system activity (Figure 3C). As expected, neither of both antibodies affected the lack of efficiency of conditioned supernatants on the defective FOPFlash reporter plasmid. Control experiment by western blot confirmed that Wnt-5a was efficiently neutralized by anti-Wnt-5a antibody (Figure 3B). Furthermore, western blotting demonstrated that conditioned supernatant of chondrocytes transfected with Ank siRNA increased β-catenin translocation into the nucleus in chondrocyte monolayers without inducing the phosphorylation of JNK (Figure 3D).

Taken together, these data indicated that chondrocytes transfected with Ank siRNA released increased amounts of Wnt-5a in conditioned supernatants, which was able to activate the canonical, but not non-canonical Wnt pathway in chondrocytes.

Exogenous PPi partly compensates the effects of conditioned supernatant from Ank knocked-down chondrocytes.

As shown in Figure 4A, the inhibitory effect of conditioned supernatant of *Ank* knocked-down chondrocytes on Type II collagen mRNA level was reduced twicely in the presence of 0.1 mM of exogenous PPi. The expression of Sox-9 displayed the same profile, with inhibitions of 35% and 17% respectively in the absence or presence of exogenous PPi (Figure 4A). In these experimental conditions, 0.01 mM of PPi remained ineffective (supplementary figure 1), whereas 1 mM of PPi worsened the loss of cartilage-specific markers (supplementary figure 2).

Western blot analyses demonstrated that chondrocytes transfected with Ank siRNA and then stimulated with 0.1 mM exogenous PPi released significantly reduced amounts of Wnt-5a in conditioned supernatants (Figure 4B). Moreover, in chondrocytes electroporated with the functional Tcf/Lef reporter plasmid, the stimulating effect of conditioned supernatant from *Ank* knocked-down cells was reduced by 80% if these cells were pre-treated with 0.1 mM of exogenous PPi (Figure 4C).

These data indicated that exogenous PPi compensated most effects of *Ank* silencing as well for the expression of cartilage specific markers as for the release of Wnt-5a and the subsequent activation of the canonical Wnt signaling pathway.

Exogenous PPi failed to affect the non-canonical Wnt pathway in the Il-1β-induced model of chondrocyte dedifferentiation.

As demonstrated in Figure 5A, IL-1β induced the phosphorylation of JNK with a maximal activation at 15 min. Addition of exogenous PPi did not modify the pattern of JNK activation by IL-1β.

The stimulating effect of IL-1β on Wnt-5a mRNA expression was not affected in the presence of 5μM of the selective JNK inhibitor SP600125 (Figure 5B). However, addition of exogenous PPi diminished the inducing effects of IL-1β on Wnt-5a expression by approximately 80%, in the absence or the presence of SP600125. It is worthy to note that the inhibitory effect of IL-1β on Type II collagen mRNA expression was reduced from 75% towards 66% in the presence of SP600125 (Figure 5B). However, addition of exogenous PPi diminished the dedifferentiating effects of IL-1β on Type II collagen expression towards 50% and around 25% in the presence SP600125. Similar results were observed for Sox-9, whose mRNA expression was reduced by 3-fold by IL-1β, and only by 2-fold in the presence of SP600125 (Figure 5B). Once again, exogenous PPi corrected the IL-1β-induced inhibition of Sox-9 expression by 25% and 50% respectively in the absence or the presence of SP600125.

Altogether, these data demonstrated that the dedifferentiating effect of IL-1β depended only very partially on JNK activation but was

corrected, at least in part, by exogenous PPi independently of this signaling pathway. This suggests a predominant role of Ank inhibition over JNK activation in the IL-1β-induced changes in chondrocyte phenotype.

DISCUSSION

Several studies demonstrated that IL-1β was a potent inhibitor of chondrocyte phenotype, as it down-regulated the expression of some cartilage genes such as those for Type IX (31), XI and II (32) collagens and aggrecan (32). Most of these effects are ascribed to the reduced expression of the transcription factor Sox-9 (33). Indeed, Sox-9 activates chondrocyte-specific enhancer elements in *Col2a1* and *Col11a2* genes (34) and its expression is down-regulated by IL-1β and TNF-α (33). Based on the major role of IL-1β in cartilage degradation, and when considering the fully differentiated phenotype of our articular chondrocytes, we think that our experimental model has relevance to the dedifferentiation process affecting chondrocyte during OA.

We showed here that the inhibitory effect of IL-1β on phenotype markers paralleled the reduced expression of Ank and the enhanced expression of Wnt-5a. More importantly, we demonstrated that overexpression of Ank suppressed the stimulating effect of IL-1β on Wnt-5a while counterbalancing most of its inhibitory potency on Sox-9 and Type II collagen. A previous work showed that Ank expression was up-regulated in osteoarthritic cartilage compared to normal explants (35), which seems controversial with our results. However, besides inflammatory cytokines, OA cartilage expresses high level of TGF-β1 (36) and we demonstrated previously that Ank expression was up-regulated by TGF-β1 in articular chondrocytes (25). It's worth noting that most of the inhibitory effects of IL-1β on cartilage specific-markers were counterbalanced by TGF-β1 (37,38) and this could also be the case for Ank as a part of the balance between maintenance and loss of chondrocytes phenotype. Our data confirmed that IL-1β up-regulated Wnt-5a in chondrocyte (23), but any Wnt-7a induction failed to be detected in our cells. Stimulation of Wnt-7a expression by IL-1β was reported in rabbit chondrocytes (18,23) and contributed to the loss of differentiated phenotype and inhibition of apoptosis (18). Such discrepancy could be related to species differences, either in chondrocyte response to IL-1β (39) or expression of Wnt proteins (40). Expression profile of Wnt proteins could also be affected variably by the disease process, since expression profile analysis revealed an increase in Wnt-7b, but not in Wnt-5a in human OA cartilage (14). Yet, our data showed unambiguously that ANK and the subsequent PPi efflux were key players of the dedifferentiating effect of IL-1β.

Further demonstration that Ank contributed maintaining the chondrocyte phenotype arose from silencing experiments. Indeed, cells knocked-down with different sequences of siRNA against Ank displayed an "IL-1β-induced-like" phenotype, with a loss of cartilage-specific markers and an increase in Wnt-5a expression. A control experiment with non-specific siRNA (scramble sequence of Ank siRNA A) showed that the transfection itself affected the cell phenotype very marginally in comparison with Ank siRNA, therefore validating the data. In addition, the efficiency of this siRNA was demonstrated previously, since it reduced dramatically the TGF-β1-induced increase in *Ank* gene and ePPi exportation in chondrocytes (25). Therefore the changes of cell phenotype were closely related to *Ank* silencing. The *Ank* gene is known to play a role in the control of bone formation, since its lack of function in humans and mice results in thickened craniofacial bones and osteopenic phenotype in the long bones (41). Suppression of *Ank* favoured the chondrocytic differentiation of preosteoblastic cells, and its silencing in the osteoblastic cell line MC3T3-E1 resulted in a reduced differentiation towards a mature osteoblast phenotype (42). Therefore, our data demonstrate that besides its differentiating effect on bone marrow cells, *Ank* contributes to the maintenance of the cell phenotype in mature chondrocytes. Its influence on the cell phenotype may thus depend on the level of differentiation with precursors and mature cells being driven towards opposite ways in term of chondrogenic hallmarks. Alternatively, there should be a need for a critical level of *Ank* expression in articular cells, with deficiency leading to a loss of phenotype and overexpression to a hypertrophic phenotype, as can be seen in OA chondrocytes (3). These data suggest that the subsequent ePPi level, known to support the mineralizing effect of *Ank* during terminal differentiation of growth plate chondrocytes (43) and possibly in OA

chondrocytes (44), may also contribute to the maintenance of chondrocyte phenotype.

As changes in Ank expression affected Wnt-5a at the mRNA and protein level, we next investigated whether the cellular effects depended or not on the canonical Wnt pathway activation. Conditioned supernatant of cells knocked-down for *Ank* activated Tcf/Lef reporter plasmids and increased the nuclear translocation of β-catenin, thus demonstrating the activation of the canonical Wnt pathway. This was consistent with the transcriptional activation of β-catenin being associated with the IL-1β-induced dedifferentiation of chondrocytes (19). Furthermore, the high Wnt-5a content of conditioned supernatants, their inability to activate JNK, and the suppression of reporter plasmids activation by Wnt-5a neutralizing antibody demonstrated that the canonical pathway signaling was mediated by this Wnt protein. Wnt-5a was shown previously to activate the non-canonical Wnt pathway in rabbit chondrocytes (23). However, amongst the Wnt receptors expressed in the rat (45,46), Wnt-5a was described to activate the canonical Wnt pathway through a particular Rfz-2 signaling (47). Activation of the canonical Wnt pathway by reduction of Ank expression further supports its role in the control of chondrocyte phenotype and its possible contribution to OA-related changes. Indeed, transcriptional activity of β-catenin caused phenotype loss of differentiated rabbit chondrocytes (19), whereas conditional activation of β-catenin in mice articular chondrocytes led to premature differentiation and development of OA-like phenotype (48). In addition, the accumulation and the increased nuclear translocation of β-catenin was reported in OA-like chondrocytes in the Hartley guinea pig model of spontaneous OA (49). Altogether, our data demonstrate that down-regulation of Ank altered the chondrocyte hallmarks towards an OA-like phenotype, by a Wnt-5a-dependent activation of the canonical Wnt pathway.

One major finding of our work is that loss of chondrocyte phenotype induced either by IL-1β or RNA silencing of *Ank* depended on ePPi level. Indeed, the reduced expression of Sox-9 and Type II collagen was reversed consistently by addition of PPi in both case. The concentration of ePPi appeared to be critical, since the compensation of *Ank* knock-down was effective at 0.1 mM, but neither at low (0.01 mM) nor at excessive (1 mM) levels. Such PPi level is higher than reported in synovial fluid of patients, even if they suffer from CPPD deposition or OA (50). However, our data are consistent with the ability of extreme PPi levels to associate with further joint narrowing in OA patients, although with different consequences, such as progression of structural changes at a low PPi level, or crystal deposition and bone attrition at a high PPi level (51). Therefore, a controlled export of PPi by ANK may be necessary for the maintenance of articular chondrocyte phenotype, all the more that excessive ePPi levels up-regulate MMP-13, an indicator of chondrocyte hypertrophy (44). That addition of PPi failed to account for the whole dedifferentiating effect of IL-1β was not surprising, since this cytokine is known to activate many signaling pathways in chondrocyte, although with some species specificity (39,52). For example, IL-1β was shown to down-regulate *Sox-9* gene by activating the NF-κB pathway in the murine chondrocytic cell line MC615 (33). In addition, the down-regulation of Type II collagen expression by IL-1β was shown to depend on p38 MAPK activation in human immortalized adult chondrocytes (32). Finally, JNK phosphorylation has been demonstrated in IL-1β-stimulated rabbit chondrocytes and this was linked to the non-canonical Wnt pathway activation (23) and to the suppression of Sox-9 expression (53). We showed that JNK was also activated, but we demonstrated that this IL-1β-induced activation of JNK was independent of the Wnt cascade. Indeed, JNK phosphorylation was maximal after 15 min of IL-1β stimulation, which was too short to account for the production of Wnt-5a, and inhibition of JNK with SP600125 leaved Wnt-5a mRNA level unchanged. On the other hand, addition of PPi reduced the stimulating effect of IL-1β on Wnt-5a expression. Therefore, the reversion of the inhibitory effect of IL-1β by PPi was supported likely by its ability to regulate the Wnt pathway in a JNK-independent manner.

To summarize, we demonstrate here for the first time the contribution of *Ank* and ePPi in the maintenance of articular chondrocyte phenotype. Indeed, as depicted in Figure 6, a defect in Ank expression leads to a decrease in ePPi level and a subsequent increase in Wnt-5a, which in turn activates the canonical Wnt signaling pathway, and thus promotes the disappearance of Sox-9 and Type II collagen (representative of a an articular chondrocyte phenotype). These results suggest that the level of *Ank* expression and PPi

export may be critical to maintain the phenotype of chondrocyte between dedifferentiation and hypertrophy. This is consistent with the frequent occurrence of CPPD deposition disease in OA and may help to understand the variable shift of chondrocyte towards a fibroblastic or a hypertrophic phenotype in the course of OA.

REFERENCES

1. Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., and De Crombrugghe, B. (1997) *Dev Dyn* **209**(4), 377-386
2. Goldring, M. B. (2006) *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**(5), 1003-1025
3. Aigner, T., and McKenna, L. (2002) *Cell Mol Life Sci* **59**(1), 5-18
4. Aigner, T., Soder, S., Gebhard, P. M., McAlinden, A., and Haag, J. (2007) *Nat Clin Pract Rheumatol* **3**(7), 391-399
5. Goldring, M. B., Tsuchimochi, K., and Ijiri, K. (2006) *J Cell Biochem* **97**(1), 33-44
6. Pacifici, M., Koyama, E., Shibukawa, Y., Wu, C., Tamamura, Y., Enomoto-Iwamoto, M., and Iwamoto, M. (2006) *Ann N Y Acad Sci* **1068**, 74-86
7. Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., and Varmus, H. (1991) *Cell* **64**(2), 231
8. Wodarz, A., and Nusse, R. (1998) *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 59-88
9. Yang, Y. (2003) *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**(4), 305-317
10. Huelsken, J., and Birchmeier, W. (2001) *Curr Opin Genet Dev* **11**(5), 547-553
11. Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D., and Moon, R. T. (1999) *Oncogene* **18**(55), 7860-7872
12. Seidensticker, M. J., and Behrens, J. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1495**(2), 168-182
13. Staal, F. J., Noort Mv, M., Strous, G. J., and Clevers, H. C. (2002) *EMBO Rep* **3**(1), 63-68
14. Nakamura, Y., Nawata, M., and Wakitani, S. (2005) *Am J Pathol* **167**(1), 97-105
15. Dell'accio, F., De Bari, C., Eltawil, N. M., Vanhummelen, P., and Pitzalis, C. (2008) *Arthritis Rheum* **58**(5), 1410-1421
16. Bergwitz, C., Wendlandt, T., Kispert, A., and Brabant, G. (2001) *Biochim Biophys Acta* **1538**(2-3), 129-140
17. Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P. J., and Yang, Y. (2003) *J Cell Biol* **162**(5), 899-908
18. Hwang, S. G., Ryu, J. H., Kim, I. C., Jho, E. H., Jung, H. C., Kim, K., Kim, S. J., and Chun, J. S. (2004) *J Biol Chem* **279**(25), 26597-26604
19. Ryu, J. H., Kim, S. J., Kim, S. H., Oh, C. D., Hwang, S. G., Chun, C. H., Oh, S. H., Seong, J. K., Huh, T. L., and Chun, J. S. (2002) *Development* **129**(23), 5541-5550
20. Choy, E. H., and Panayi, G. S. (2001) *N Engl J Med* **344**(12), 907-916
21. Goldring, M. B., Birkhead, J. R., Suen, L. F., Yamin, R., Mizuno, S., Glowacki, J., Arbiser, J. L., and Apperley, J. F. (1994) *J Clin Invest* **94**(6), 2307-2316
22. Martel-Pelletier, J., Alaaeddine, N., and Pelletier, J. P. (1999) *Front Biosci* **4**, D694-703
23. Ryu, J. H., and Chun, J. S. (2006) *J Biol Chem* **281**(31), 22039-22047
24. Lotz, M., Rosen, F., McCabe, G., Quach, J., Blanco, F., Dudler, J., Solan, J., Goding, J., Seegmiller, J. E., and Terkeltaub, R. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(22), 10364-10368
25. Cailotto, F., Bianchi, A., Sebillaud, S., Venkatesan, N., Moulin, D., Jouzeau, J. Y., and Netter, P. (2007) *Arthritis Res Ther* **9**(6), R122
26. Cheung, H. S. (2005) *Front Biosci* **10**, 1336-1340
27. Sohn, P., Crowley, M., Slattery, E., and Serra, R. (2002) *Osteoarthritis Cartilage* **10**(6), 482-490
28. Addison, W. N., Azari, F., Sorensen, E. S., Kaartinen, M. T., and McKee, M. D. (2007) *J Biol Chem* **282**(21), 15872-15883

29. Kuettner, K. E., Pauli, B. U., Gall, G., Memoli, V. A., and Schenk, R. K. (1982) *J Cell Biol* **93**(3), 743-750
30. Terkeltaub, R., Rosenbach, M., Fong, F., and Goding, J. (1994) *Arthritis Rheum* **37**(6), 934-941
31. Goldring, M. B., Birkhead, J., Sandell, L. J., Kimura, T., and Krane, S. M. (1988) *J Clin Invest* **82**(6), 2026-2037
32. Robbins, J. R., Thomas, B., Tan, L., Choy, B., Arbiser, J. L., Berenbaum, F., and Goldring, M. B. (2000) *Arthritis Rheum* **43**(10), 2189-2201
33. Murakami, S., Lefebvre, V., and de Crombrugghe, B. (2000) *J Biol Chem* **275**(5), 3687-3692
34. de Crombrugghe, B., Lefebvre, V., Behringer, R. R., Bi, W., Murakami, S., and Huang, W. (2000) *Matrix Biol* **19**(5), 389-394
35. Hirose, J., Ryan, L. M., and Masuda, I. (2002) *Arthritis Rheum* **46**(12), 3218-3229
36. Pombo-Suarez, M., Castano-Oreja, M. T., Calaza, M., Gomez-Reino, J. J., and Gonzalez, A. (2008) *Ann Rheum Dis*
37. Frazer, A., Bunning, R. A., Thavarajah, M., Seid, J. M., and Russell, R. G. (1994) *Osteoarthritis Cartilage* **2**(4), 235-245
38. Lum, Z. P., Hakala, B. E., Mort, J. S., and Recklies, A. D. (1996) *J Cell Physiol* **166**(2), 351-359
39. Badger, A. M., Roshak, A. K., Cook, M. N., Newman-Tarr, T. M., Swift, B. A., Carlson, K., Connor, J. R., Lee, J. C., Gowen, M., Lark, M. W., and Kumar, S. (2000) *Osteoarthritis Cartilage* **8**(6), 434-443
40. Fougerousse, F., Bullen, P., Herasse, M., Lindsay, S., Richard, I., Wilson, D., Suel, L., Durand, M., Robson, S., Abitbol, M., Beckmann, J. S., and Strachan, T. (2000) *Hum Mol Genet* **9**(2), 165-173
41. Gurley, K. A., Chen, H., Guenther, C., Nguyen, E. T., Rountree, R. B., Schoor, M., and Kingsley, D. M. (2006) *J Bone Miner Res* **21**(8), 1238-1247
42. Kirsch, T., Kim, H. J., and Winkles, J. A. (2009) *Cells Tissues Organs* **189**(1-4), 158-162
43. Wang, W., Xu, J., Du, B., and Kirsch, T. (2005) *Mol Cell Biol* **25**(1), 312-323
44. Johnson, K., and Terkeltaub, R. (2004) *Osteoarthritis Cartilage* **12**(4), 321-335
45. Slusarski, D. C., Corces, V. G., and Moon, R. T. (1997) *Nature* **390**(6658), 410-413
46. Yang-Snyder, J., Miller, J. R., Brown, J. D., Lai, C. J., and Moon, R. T. (1996) *Curr Biol* **6**(10), 1302-1306
47. Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004) *Development* **131**(20), 5103-5115
48. Zhu, M., Tang, D., Wu, Q., Hao, S., Chen, M., Xie, C., Rosier, R. N., O'Keefe, R. J., Zuscik, M., and Chen, D. (2009) *J Bone Miner Res* **24**(1), 12-21
49. Yuasa, T., Otani, T., Koike, T., Iwamoto, M., and Enomoto-Iwamoto, M. (2008) *Lab Invest* **88**(3), 264-274
50. Ryan, L. M., Rachow, J. W., and McCarty, D. J. (1991) *J Rheumatol* **18**(5), 716-720
51. Doherty, M., Belcher, C., Regan, M., Jones, A., and Ledingham, J. (1996) *Ann Rheum Dis* **55**(7), 432-436
52. Tew, S. R., and Hardingham, T. E. (2006) *J Biol Chem* **281**(51), 39471-39479
53. Hwang, S. G., Yu, S. S., Poo, H., and Chun, J. S. (2005) *J Biol Chem* **280**(33), 29780-29787

FOOTNOTES

This work was supported by grants (CPRC/PHRC) from the University hospital of Nancy, the Région Lorraine, the Conseil Général 54, and the Communauté Urbaine du Grand Nancy.
The abbreviations used are: IL-1β: Interleukin-1β; ECM: extracellular matrix ; OA: osteoarthritis; PPi: inorganic pyrophosphate; ePPi: extracellular PPi.

FIGURE LEGENDS

Table 1. Gene-specific primer pairs used in real-time quantitative PCR.

Table 2. siRNA sequences used in transitory knock-down experiments.

Figure 1. Genotypic characterization of IL-1β-stimulated chondrocytes.
A, Influence of IL-1β stimulation on chondrocyte phenotype genes expression. Total RNA was extracted from chondrocytes stimulated with 10 ng/ml of IL-1β for 36 h, and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (reference gene) (n=3). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value. **B,** Influence of IL-1β stimulation on ePPi generation. ePPi was assayed in supernatants of chondrocytes supernatants of chondrocytes electroporated either with empty vector or with Ank overexpressing plasmid (pANK), and stimulated with 10 ng/ml of IL-1β for 72 h, and normalized to cell proteins content (n=6). Data are expressed as mean (± SD) in picomoles per microgram of protein. **C,** Effect of Ank overexpression on chondrocyte phenotype genes expression. Total RNA was extracted from chondrocytes electroporated either with empty vector or with Ank overexpressing plasmid (pANK) and stimulated with 10 ng/ml of IL-1β, then subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (reference gene). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value (n=3).
Statistically significant differences from control/empty vector are indicated as *: $p<0.05$, and from empty vector + IL-1β as #: $p<0.05$.

Figure 2. Influence of Ank knock-down on chondrocyte phenotype.
A, Effect of Ank siRNA A or B on Type II collagen, Wnt-5a, Sox-9 and Ank mRNA expression. Total RNA was extracted from chondrocytes transfected with one or the other Ank siRNA, and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (used as reference gene). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value (n=3). Statistically significant differences from the control (Scramble) are indicated as *: $p<0.05$. **B,** Effect of Ank siRNA A on Ank, Type II collagen and Wnt-5a protein expression. Chondrocytes were fixed with a 4% PBS-PFA, and then incubated with anti-Ank, anti-Type II collagen or anti-Wnt-5a antibodies. Biotinylated anti-rabbit and anti-mouse IgG were then used, followed by incubation with streptavidin conjugated to HRP. Cells were stained using a solution containing DAB chromogen and H_2O_2. Counterstaining was done using Harris Hematoxylin. Magnification is 10X. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Influence of transitory Ank knock-down on ePPi generation. ePPi was assayed in supernatants of chondrocytes supernatants of chondrocytes transfected with one or the other Ank siRNA, and normalized to cell proteins content (n=6). Data are expressed as mean (± SD) in picomoles per microgram of protein. Statistically significant differences from the control (Scramble) are indicated as *: $p<0.05$.

Figure 3. Influence of transitory Ank knock-down on Tcf/Lef pathway activation.
A, Effect of conditioned supernatant on Tcf/Lef pathway activation. Chondrocytes were electroporated either with active (TOPFlash) or with inactive (FOPFlash) Tcf/Lef reporter genes, and with CMV-Renilla reporter gene before stimulation with supernatant from cells transfected with Ank siRNA A for 48 h. Cells were stimulated with LiCl (10 mM) as a positive control. Results are presented in histograms as mean luciferase activity ratio of firefly/renilla (± SD) (n=4). **B,** Western blot analysis of conditioned supernatant. Supernatants were neutralized or not for 1 h at 37°C, using either mock (anti-β-actin) or anti-Wnt-5a antibodies, and subjected to western blotting. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Effect of neutralized supernatant on Tcf/Lef pathway activation. Conditioned supernatants were neutralized as described above. Chondrocytes transfected with reporter genes were stimulated with these supernatants for 48 h. Results are presented in histograms as mean luciferase activity ratio of firefly/renilla (± SD) (n=4). Statistically significant differences from Scramble are indicated as *: $p<0.05$, and from siRNA as #: $p<0.05$. **D,** Effect of conditioned supernatants on the activation of canonical and non-canonical Wnt pathways. Chondrocytes were stimulated with supernatants from cells transfected with either scramble or Ank siRNA for 48 h or the indicated times. Cells stimulated with 10 mM LiCl were used as a positive control for nuclear translocation of β-catenin, and cells stimulated with 10 ng/ml of IL-1β for 15 minutes were used as a positive control for JNK activation. Proteins were extracted and subjected to

western blotting using either anti-β-catenin, or anti-phospho- and anti-total-JNK antibodies. The relative abundance of β-catenin was normalized to that of β-actin protein. Images presented are representative of three independent experiments.

Figure 4. Influence of ePPi on the dedifferentiating effects of supernatants from chondrocytes transfected with Ank siRNA.
A, Effect of Ank siRNA A, in the presence and the absence of 0.1 mM of ePPi, on Type II collagen, Wnt-5a and Sox-9 expression. Total RNA was extracted from chondrocytes transfected with Ank siRNA and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (used as reference gene). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value and are representative of three independent experiments. **B,** Western blot analysis of conditioned supernatant. Supernatants were concentrated and subjected to western blotting. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Chondrocytes were electroporated either with active (TOPFlash) or inactive (FOPFlash) Tcf/Lef reporter genes (1 μg/well of 6-well plate), and with CMV-Renilla reporter gene (200 ng/well of 6-well plate). Cells were then stimulated with conditioned supernatant from siRNA-transfected cells challenged or not with 0.1 mM of ePPi for 48 h. Data are expressed as the mean luciferase activity ratio of firefly/renilla (± SD) (n=3). Statistically significant differences from supernatant produced by cells transfected with scramble are indicated as *: $p<0.05$, and from cells transfected with Ank siRNA as #: $p<0.05$.

Figure 5. Influence of ePPi on the dedifferentiating effects of IL-1β
A, Effect of ePPi on the activation of JNK pathway by IL-1β. Chondrocytes were stimulated with 10 ng/ml of IL-1β, in the presence and the absence of 0.1 mM of ePPi for the indicated times. Proteins were extracted and subjected to western blotting using anti-phospho- and anti-total-JNK antibodies. Images presented are representative of three independent experiments. **B,** Effect of SP600125 and ePPi on the dedifferentiating effects of IL-1β. Total RNA was extracted from chondrocytes challenged for 1 h with SP600125 (5 μM), then stimulated with 10 ng/ml of IL-1β in the presence and absence of 0.1 mM of ePPi. Total RNA was subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (used as reference gene). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value (n=3). Statistically significant differences from vehicle or vehicle + PPi are indicated as *: $p<0.05$, and from cells stimulated with IL-1β or IL-1β + PPi as #: $p<0.05$.

Figure 6. Schematic pathway of the contribution of ePPi and its transporter ANK on the maintenance of the articular phenotype in chondrocyte.

TABLE 1

Gene-specific primer pairs used in real-time quantitative PCR

Gene	Sense	Antisense	Amplicon length (pb)	Genbank accession number
Aggrecan	5'-ACA CCC CTA CCC TTG CTT CT-3'	5'-AAA GTG TCC AAG GCA TCC AC-3'	124	NM_022190
Ank	5'-CAA GAG AGA CAG GGC CAA AG-3'	5'-AAG GCA GCG AGA TAC AGG AA-3'	173	NM_053714
S29	5'-AAG ATG GGT CAC CAG CAG CTC TAC TG-3'	5'-AGA CGC GGC AAG AGC GAG AA-3'	67	NM_012876
Sox-9	5'-CTG AAG AAG GAG AGC GAG GA-3'	5'-GGT CCA GTC ATA GCC CTT CA-3'	84	AB 073720
Type IA2 collagen	5'-TTG ACC CTA ACC AAG GAT GC-3'	5'-CAC CCC TTC TGC GTT GTA TT-3'	197	NM_053356
Type II collagen	5' TCC CTC TGG TTC TGA TGG TC-3'	5' CTC TGT CTC CAG ATG CAC CA-3'	161	NM_012929
Type X collagen	5'-ATA TCC TGG GGA TCC AGG TC-3'	5'-TGG GTC ACC CTT AGA TCC AG-3'	241	AJ131848
Wnt-3a	5'-ACT GCA CCA CTG TCA GCA AC-3'	5' CAT GGA CAA AGG CTG ACT CC-3'	81	NM_001107005
Wnt-5a	5' AAA TAG GCA GCC GAG AGA CA-3'	5' GGC TCA TGG CAT TTA CCA CT-3'	69	AB 244721
Wnt-7a	5'-CAC AAT TCC GAG AGC TAG GC-3'	5'-ACG GCC TCG TTG TAT TTG TC-3'	52	NM_009527

TABLE 2

siRNA sequences used in transitory knock-down experiments

Name	Sense	Antisense
Scramble	5'-CGA UGG GUU CGU GUC GUU U-3'	5'-AAA CGA CAC GAA CCC AUC G-3'
siRNA Ank A	5'-CUG GCC AAC ACG AAC AAC A-3'	5'-UGU UGU UCG UGU UGG CCA G-3'
siRNA Ank B	5'-GGG UAC UAC AUC AUC AAC A-3'	5'-UGU UGA UGA UGU AGU ACC C-3'

FIGURE 1

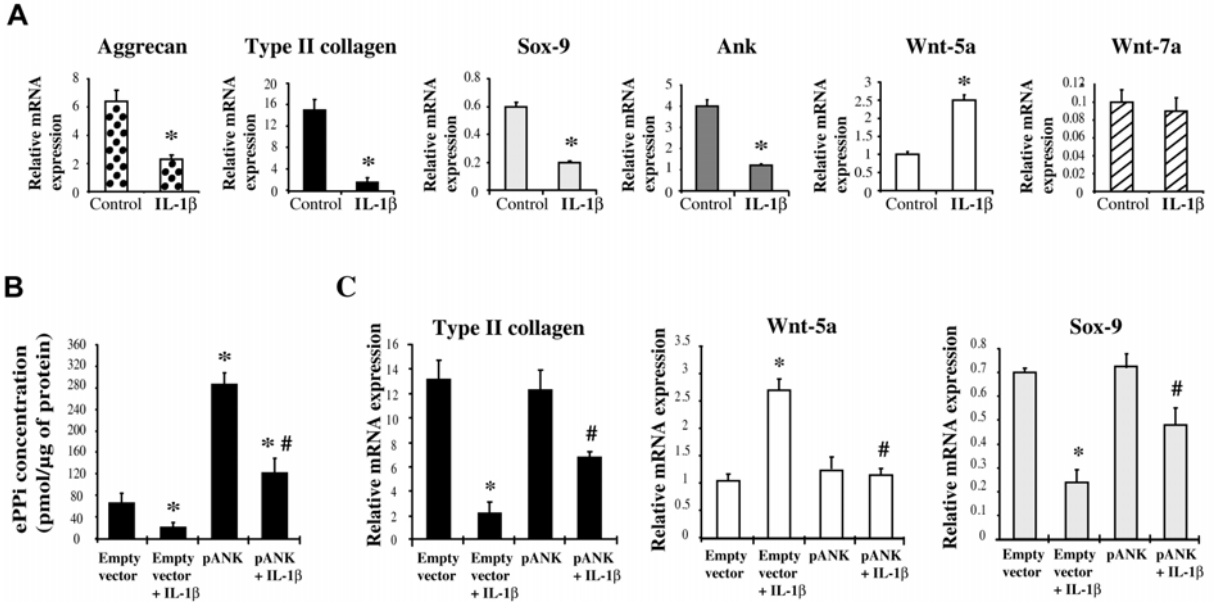

A
Aggrecan
Type II collagen
Sox-9
Ank
Wnt-5a
Wnt-7a
Relative mRNA expression
Control
IL-1β
B
ePPi concentration (pmol/μg of protein)
Empty vector
Empty vector + IL-1β
pANK
pANK + IL-1β
C
Type II collagen
Wnt-5a
Sox-9
Relative mRNA expression

FIGURE 2

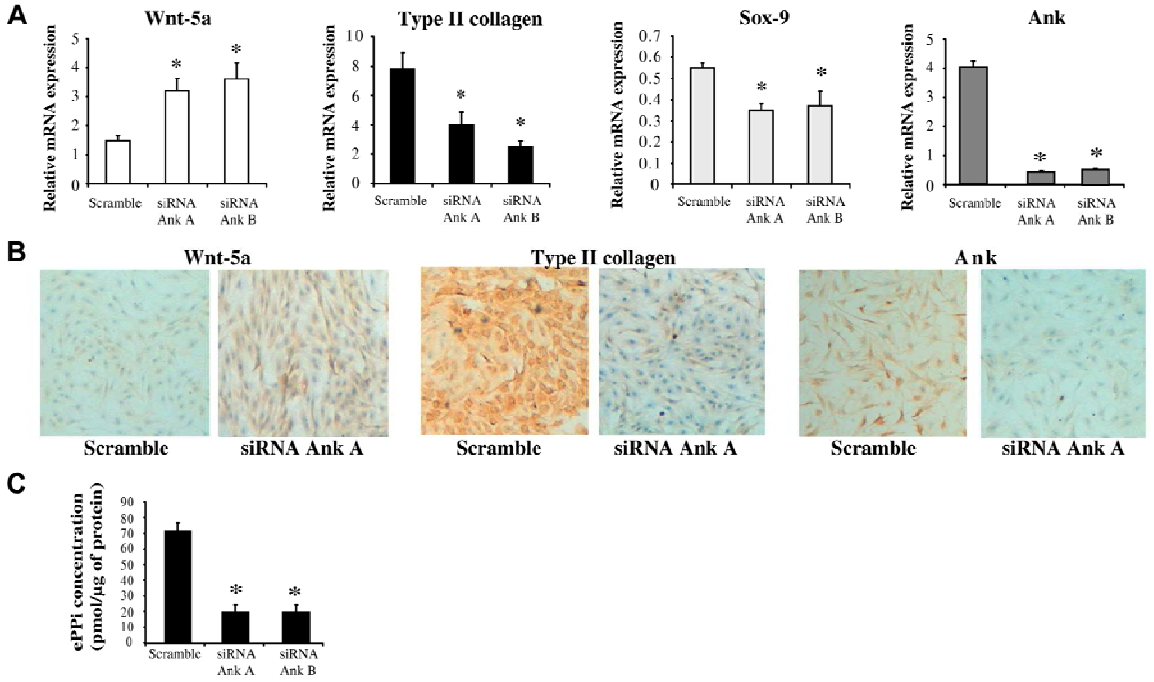

A
Wnt-5a
Type II collagen
Sox-9
Ank
Relative mRNA expression
Scramble
siRNA Ank A
siRNA Ank B
B
Wnt-5a
Type II collagen
Ank
Scramble
siRNA Ank A
C
ePPi concentration (pmol/µg of protein)

FIGURE 3

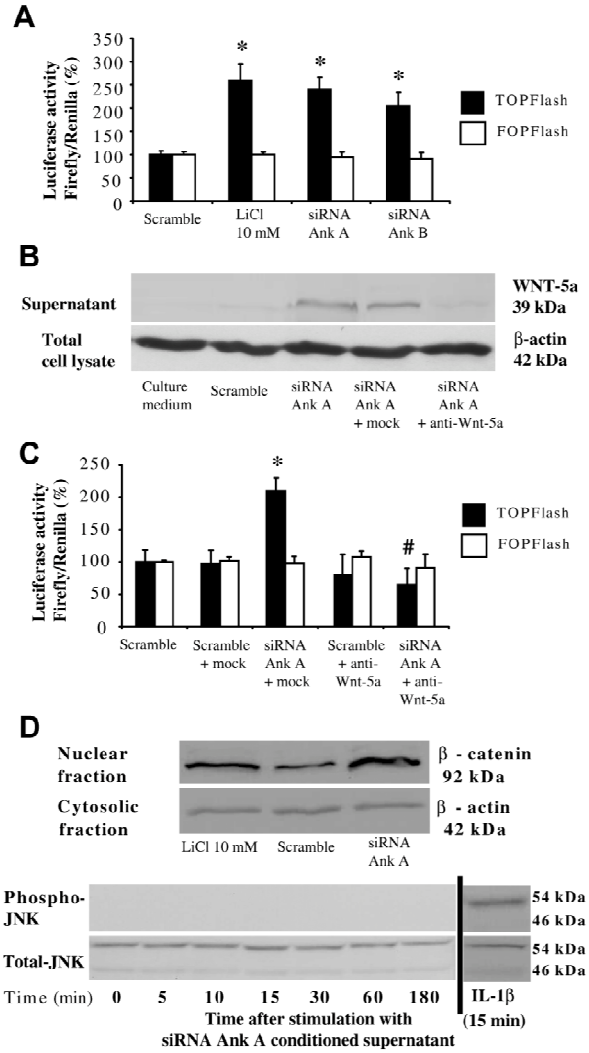

A
Luciferase activity Firefly/Renilla (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
Scramble
LiCl 10 mM
siRNA Ank A
siRNA Ank B
TOPFlash
FOPFlash
B
Supernatant
Total cell lysate
WNT-5a 39 kDa
β-actin 42 kDa
Culture medium
Scramble
siRNA Ank A
siRNA Ank A + mock
siRNA Ank A + anti-Wnt-5a
C
Luciferase activity Firefly/Renilla (%)
250
200
150
100
50
0
Scramble
Scramble + mock
siRNA Ank A + mock
Scramble + anti-Wnt-5a
siRNA Ank A + anti-Wnt-5a
TOPFlash
FOPFlash
D
Nuclear fraction
Cytosolic fraction
β - catenin 92 kDa
β - actin 42 kDa
LiCl 10 mM
Scramble
siRNA Ank A
Phospho-JNK
Total-JNK
54 kDa
46 kDa
54 kDa
46 kDa
Time (min) 0 5 10 15 30 60 180
Time after stimulation with siRNA Ank A conditioned supernatant
IL-1β (15 min)

FIGURE 4

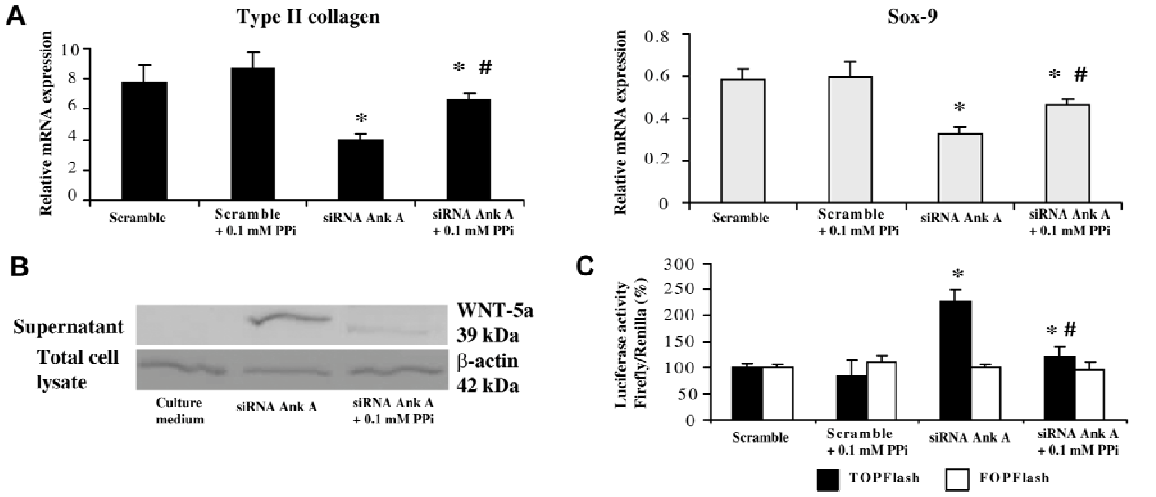

A
Type II collagen
Relative mRNA expression
10
8
6
4
2
0
Scramble
Scramble + 0.1 mM PPi
siRNA Ank A
siRNA Ank A + 0.1 mM PPi
*
* #
Sox-9
Relative mRNA expression
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Scramble
Scramble + 0.1 mM PPi
siRNA Ank A
siRNA Ank A + 0.1 mM PPi
*
* #
B
Supernatant
Total cell lysate
WNT-5a
39 kDa
β-actin
42 kDa
Culture medium
siRNA Ank A
siRNA Ank A + 0.1 mM PPi
C
Luciferase activity Firefly/Renilla (%)
300
250
200
150
100
50
0
Scramble
Scramble + 0.1 mM PPi
siRNA Ank A
siRNA Ank A + 0.1 mM PPi
*
* #
TOPFlash
FOPFlash

FIGURE 5

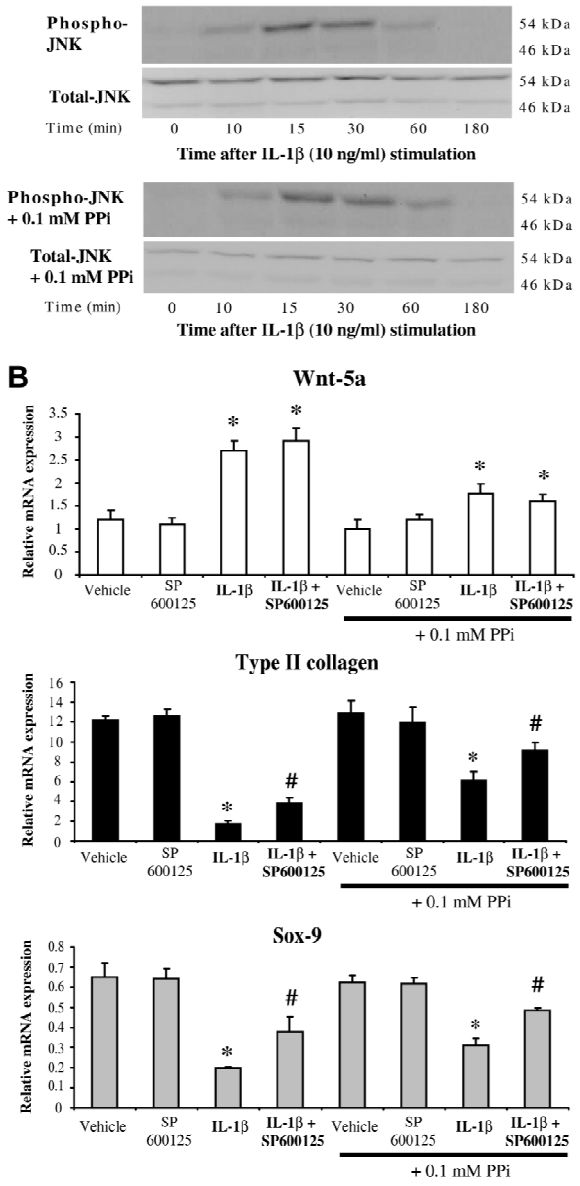
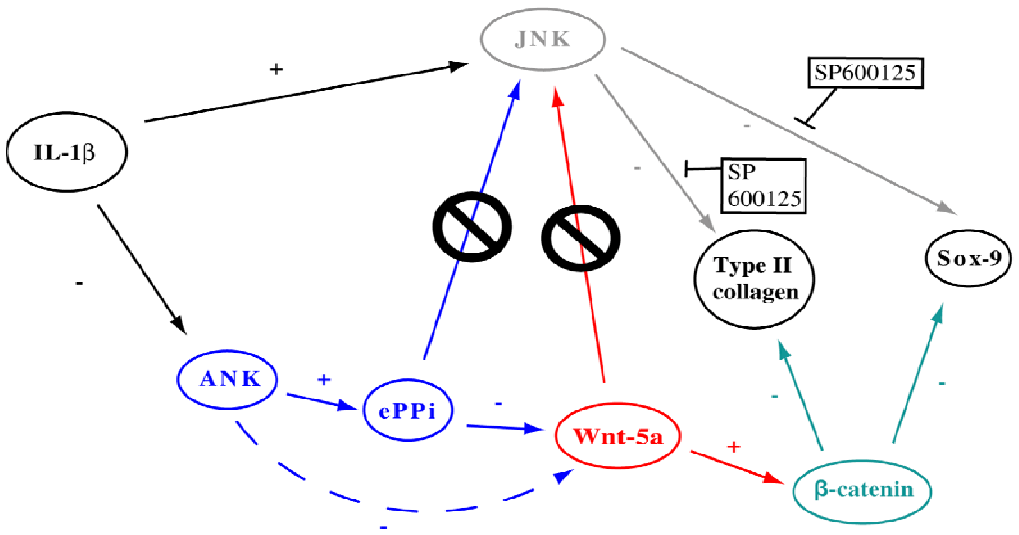
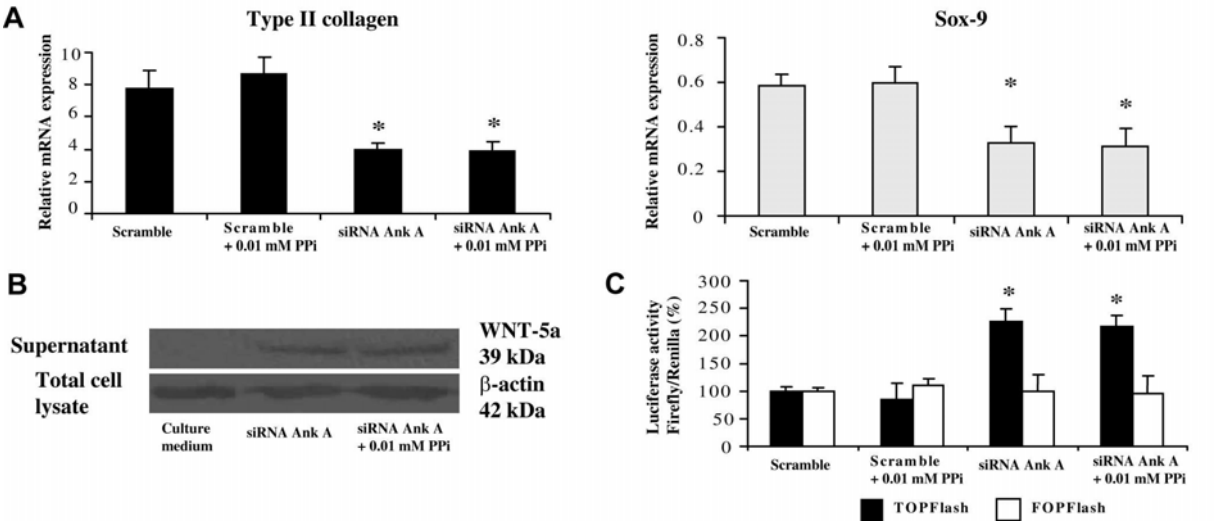

A
Phospho-JNK
Total-JNK
54 kDa
46 kDa
Time (min)
0 10 15 30 60 180
Time after IL-1β (10 ng/ml) stimulation
Phospho-JNK + 0.1 mM PPi
Total-JNK + 0.1 mM PPi
B
Wnt-5a
Relative mRNA expression
Vehicle
SP 600125
IL-1β
IL-1β + SP600125
+ 0.1 mM PPi
Type II collagen
Sox-9

FIGURE 6


JNK
SP600125
IL-1β
SP
600125
Type II
collagen
Sox-9
ANK
cPPi
Wnt-5a
β-catenin
+
-
+
-
-
-
-
+
-
-

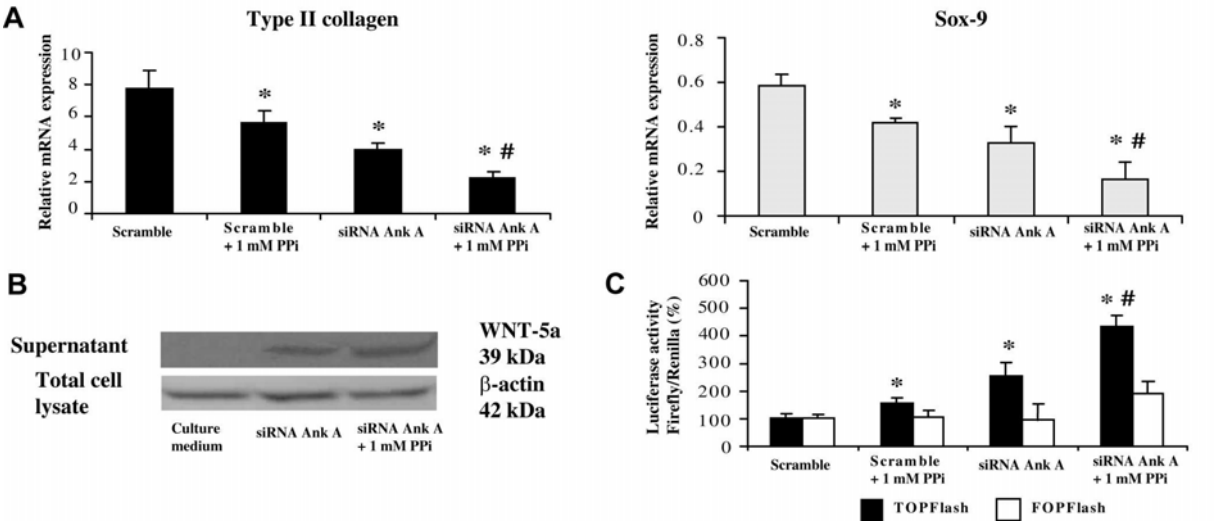
SUPPLEMENTARY FIGURE 1



Supplementary Figure 1. Influence of 0.01 mM ePPi on the dedifferentiating effects of supernatants from chondrocytes transfected with Ank siRNA.

A, Effect of Ank siRNA A, in the presence and the absence of 0.01 mM of ePPi, on Type II collagen, Wnt-5a and Sox-9 expression. Total RNA was extracted from chondrocytes transfected with Ank siRNA and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (used as reference gene). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value and are representative of three independent experiments. **B,** Western blot analysis of conditioned supernatant. Supernatants were concentrated and subjected to western blotting. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Chondrocytes were electroporated either with active (TOPFlash) or inactive (FOPFlash) Tcf/Lef reporter genes (1 µg/well of 6-well plate), and with CMV-Renilla reporter gene (200 ng/well of 6-well plate). Cells were then stimulated with conditioned supernatant from siRNA-transfected cells challenged or not with 0.01 mM of ePPi for 48 h. Data are expressed as the mean luciferase activity ratio of firefly/renilla (± SD) (n=3). Statistically significant differences from supernatant produced by cells transfected with scramble are indicated as *: $p<0.05$, and from cells transfected with Ank siRNA as #: $p<0.05$.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2



Supplementary Figure 2. Influence of 1 mM ePPi on the dedifferentiating effects of supernatants from chondrocytes transfected with Ank siRNA.

A, Effect of Ank siRNA A, in the presence and the absence of 1 mM of ePPi, on Type II collagen, Wnt-5a and Sox-9 expression. Total RNA was extracted from chondrocytes transfected with Ank siRNA and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (used as reference gene). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value and are representative of three independent experiments. **B,** Western blot analysis of conditioned supernatant. Supernatants were concentrated and subjected to western blotting. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Chondrocytes were electroporated either with active (TOPFlash) or inactive (FOPFlash) Tcf/Lef reporter genes (1 µg/well of 6-well plate), and with CMV-Renilla reporter gene (200 ng/well of 6-well plate). Cells were then stimulated with conditioned supernatant from siRNA-transfected cells challenged or not with 1 mM of ePPi for 48 h. Data are expressed as the mean luciferase activity ratio of firefly/renilla (± SD) (n=3). Statistically significant differences from supernatant produced by cells transfected with scramble are indicated as *: $p<0.05$, and from cells transfected with Ank siRNA as #: $p<0.05$.

II.A.3. Conclusions

Effets de la surexpression d'ANK sur le phénotype de chondrocytes articulaires stimulés avec l'IL-β

La stimulation des chondrocytes articulaires avec l'IL-1β entraîne une forte diminution de l'expression des gènes spécifiques du phénotype du chondrocyte articulaire. Par ailleurs, cette cytokine provoque aussi une diminution de l'expression d'*Ank* et de la génération d'ePPi, parallèles à une augmentation de l'expression de l'ARNm de Wnt-5a. La surexpression d'ANK s'oppose en partie à ces effets de l'IL-1β.

Ces résultats sont en faveur d'un rôle d'*Ank* dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire.

Effets d'une invalidation transitoire d'*Ank* sur le phénotype de chondrocytes articulaires

L'utilisation de séquence siRNA dirigées contre Ank engendre une diminution de l'expression du collagène de type II et de Sox-9 en ARNm. Cette baisse est également observée pour l'expression protéique du collagène de type II. En parallèle de ces phénomènes, nous observons une augmentation de l'expression (ARNm et protéine) de Wnt-5a.

L'invalidation d'Ank mime donc la perte des marqueurs du phénotype du chondrocyte articulaire et l'augmentation de l'expression de Wnt-5a engendrés par une stimulation avec l'IL-1β.

Effets des surnageants produits par les chondrocytes dont l'expression d'*Ank* est invalidée

Nous avons utilisé le surnageant produit par des chondrocytes dont l'expression d'Ank a été invalidée par la technologie d'ARN interférence. Ce surnageant est qualifié de surnageant conditionné. Nous avons d'abord pu mettre en évidence que ces surnageants conditionnés contenaient une importante quantité de la protéine Wnt-5a, ce qui nous a menés à examiner quelles voies de signalisation pouvaient être activées par cette protéine.

En stimulant des monocouches de chondrocytes avec ces surnageants conditionnés, nous avons démontré que Wnt-5a induit uniquement la translocation de la β-caténine dans le noyau, ce qui a pour effet d'activer le facteur de transcription Tcf/Lef, mais n'entraîne pas la phosphorylation de JNK (voie « non-canonique » des Wnt)

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que l'invalidation d'*Ank* induit la sécrétion de Wnt-5a, qui active uniquement la voie « canonique » de la signalisation des Wnt dans notre modèle.

Influence du PPi exogène sur les effets des surnageants conditionnés

La stimulation de chondrocytes dont l'expression d'Ank a été invalidée avec du PPi exogène entraine une diminution de la quantité de Wnt-5a libérée dans les surnageants conditionnés. Cela se traduit par une baisse des effets inhibiteurs des surnageants conditionnés sur l'expression de l'ARNm du collagène de type II, Sox-9, mais également par une baisse des leur effet inducteur sur l'expression de Wnt-5a. Enfin, l'addition de PPi exogène s'oppose également aux effets inducteurs de la voie Tcf/Lef des surnageants conditionnés.

Ces effets soulignent l'importance du niveau d'ePPi dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire.

Influence du PPi exogène sur les effets de l'IL-1β

L'IL-1β étant capable d'entraîner la phosphorylation JNK (voie des Wnt « non-canonique »), nous avons voulu savoir si l'ajout de PPi exogène était capable de moduler cette activation. Nous n'avons pas constaté de modification du profil de phosphorylation de JNK en présence de PPi exogène. Par ailleurs, l'inhibiteur chimique sélectif de JNK SP600125 ne s'oppose que partiellement aux effets inhibiteurs de l'IL-1β sur l'expression de l'ARNm du Collagène de type II et de Sox-9, mais également sur l'effet inducteur de la cytokine sur l'expression de l'ARNm de Wnt-5a. Il est intéressant de noter que l'ajout de PPi exogène diminue beaucoup plus efficacement ces effets de L'IL-1β que le SP600125.

Ces résultats suggèrent que les effets de l'IL-1β sur le phénotype du chondrocyte articulaire ne dépendent que partiellement de l'activation de JNK, et dépendent de manière importante de l'expression d'*Ank* et du niveau d'ePPi qui en dépend.

Un schéma de synthèse de ces travaux est proposé en Figure 18.

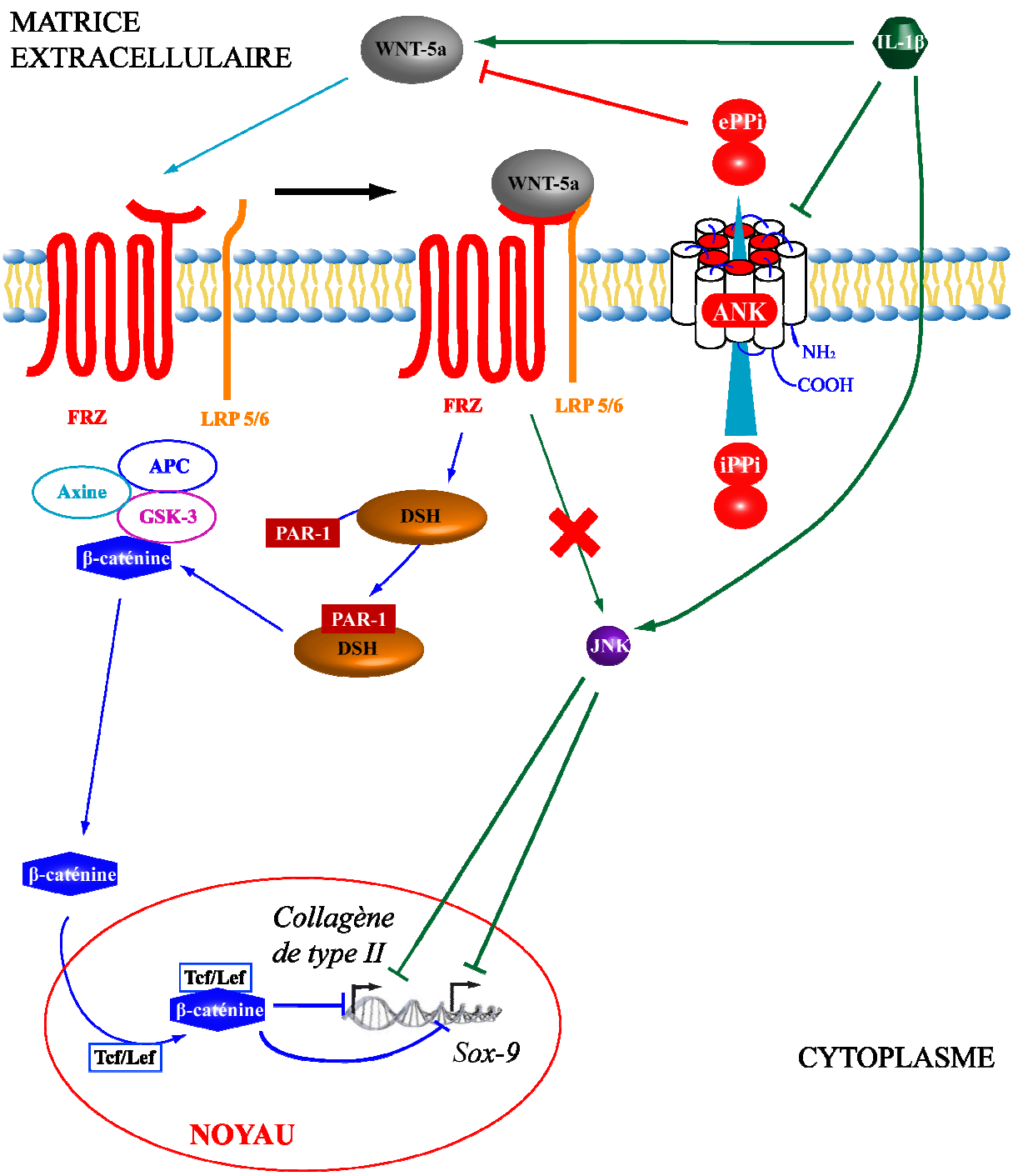


Figure 18: L'ePPi et son transporteur ANK préservent le phénotype du chondrocyte articulaire en exerçant un contrôle négatif sur l'expression de Wnt-5a

→ : activation ⊣ : inhibition

III. Influence de la concentration de calcium sur la production d'ePPi : rôle du gène *Ank* dans un contexte de CCA secondaire.

III.A. Objectifs de travail

Les CCA associées à des hyperparathyroïdies primaires ont une prévalence moyenne de 21% (Bardin et Kuntz, 1988). L'hypercalcémie chronique accompagnant l'hyperparathyroïdie primaire n'a jamais été corrélée avec la prévalence de la CCA (Pritchard et Jessop, 1977 ; McGill *et al.*, 1984), mais au vu de la composition chimique des microcristaux (BPC et PPCD), il semble logique de penser que la concentration en calcium extracellulaire pourrait avoir un rôle capital sur la balance PPi/Pi, dont la dérégulation favorise l'apparition des microcristaux. Par ailleurs, une étude portant sur les hypercalcémies hypocalciuriques familiales a établi une corrélation solide entre une CCA et une hypercalcémie (Volpe *et al.*, 2009). Un point clé concernant le calcium est son mode d'action sur les chondrocytes. Le calcium peut en effet provenir du milieu extracellulaire, notamment *via* de nombreux transporteurs calciques localisés dans la membrane plasmique, tels que les canaux calciques voltage-dépendants (VOC) de type N (Zuscik *et al.*, 1997) ou les VOC de type L (Shao *et al.*, 2005). Il n'a pas été mis en évidence de VOC de type P/Q ou encore de VOC de type T dans le chondrocyte articulaire à ce jour. Un autre mode d'action du calcium extracellulaire est sa liaison au calcium-sensing receptor (CaSR), décrit essentiellement dans les chondrocytes hypertrophiques, comme la lignée cellulaire ATDC5 (Nakatani *et al.*, 2006). Enfin, le calcium peut également provenir d'un relargage (bien caractérisé) à partir des compartiments de stockage intracellulaire, comme le réticulum endoplasmique lisse (REL). Il semble donc intéressant d'étudier les effets d'une modulation de la concentration de calcium libre sur l'expression des principales protéines responsables de la génération d'ePPi, autrement dit ANK et PC-1. Le TGF-β1 a été décrit comme un important stimulateur de la génération d'ePPi (Rosenthal *et al.*, 1993), et il est possible que le calcium puisse jouer un rôle sur les effets de ce facteur de croissance. En ce sens, il a été démontré que le TGF-β1 était capable d'entraîner ses effets cellulaires via le facteur de transcription Specific protein 1 (Sp1), notamment lors de l'induction du Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase (TIMP)-3 (Qureshi *et al.*, 2005). De plus, une étude a clairement établi, à l'aide de l'ionophore calcique ionomycine, une corrélation positive entre la concentration de calcium intracellulaire et l'activité du facteur de transcription Sp1 (Barre *et al.*, 2006), ce qui soulève un lien possible entre le TGF-β1, la concentration de calcium et Sp1. Nous avons par ailleurs réalisé une étude

in silico du promoteur du gène *Ank*, qui a révélé la présence de nombreux sites de liaison à Sp1, comme l'indique la figure 19 (promoteur du gène humain, dont la répartition des éléments de réponse est très similaire au promoteur du gène de rat).

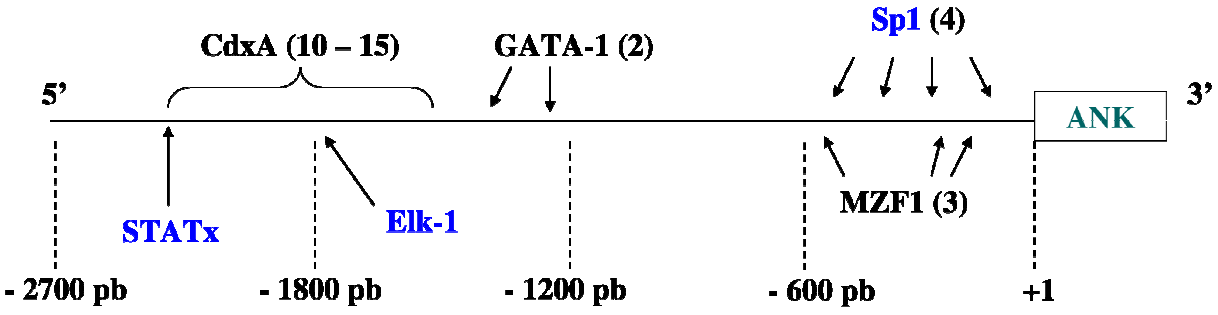
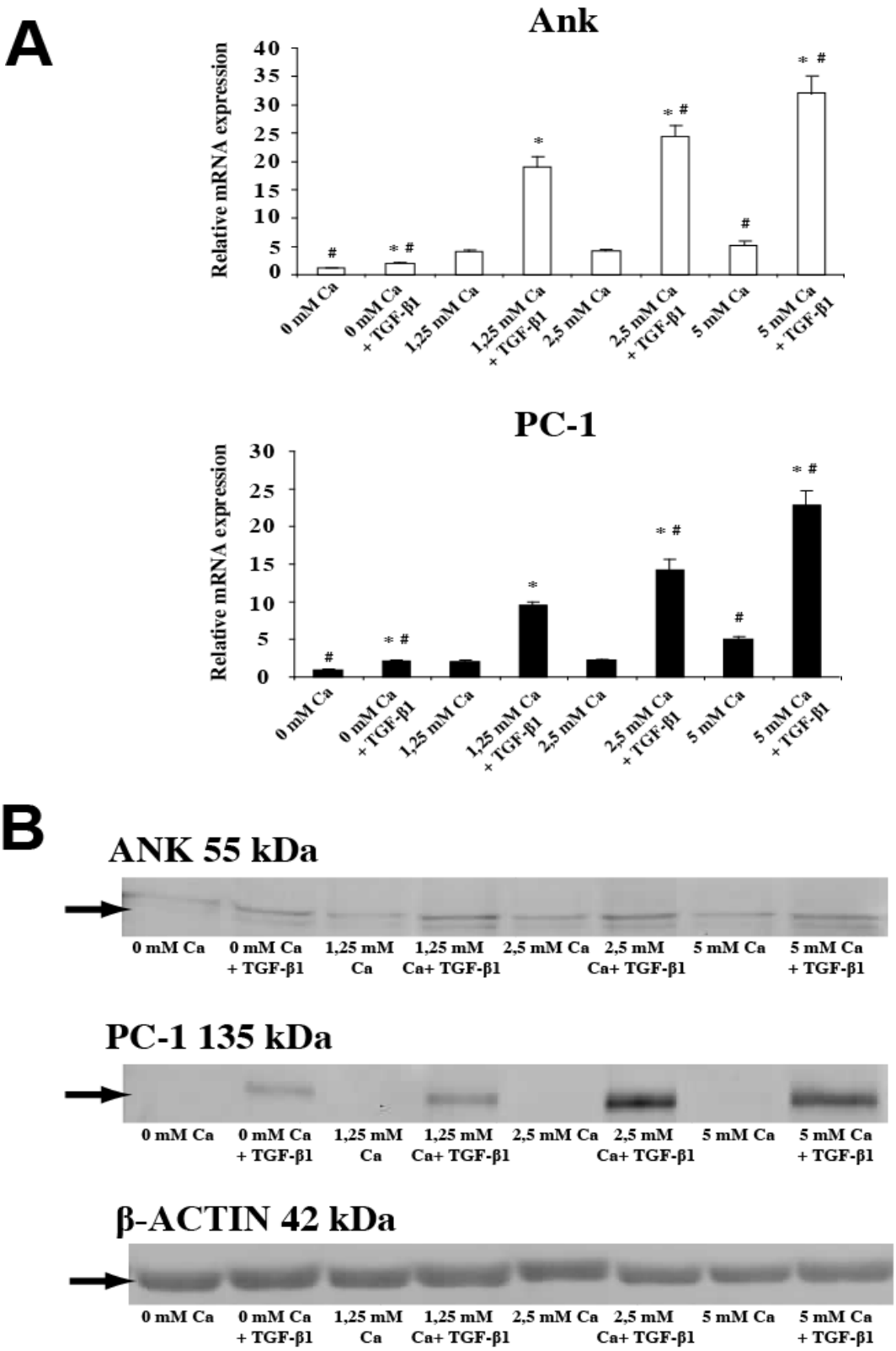


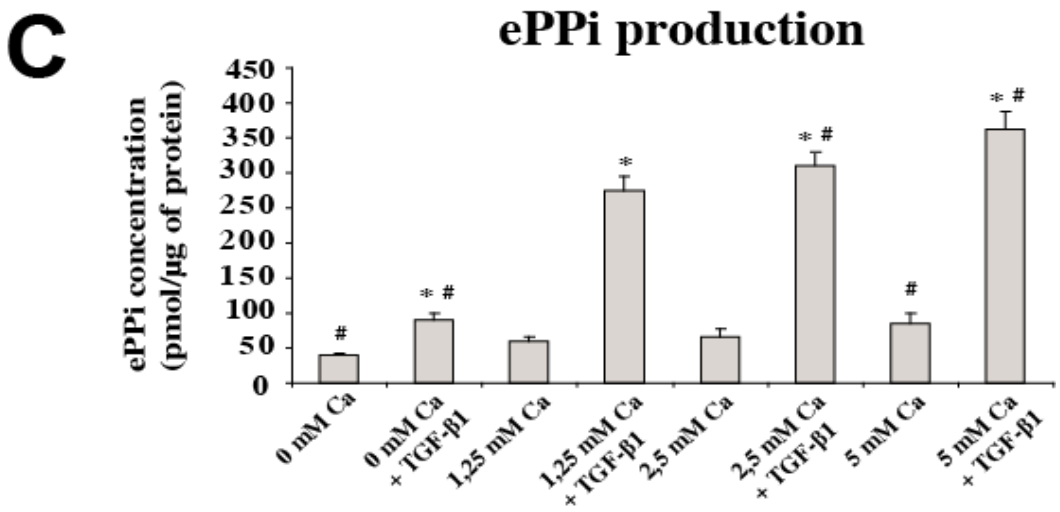
Figure 19: Analyse *in silico* du promoteur du gène *Ank*
(réalisée avec le logiciel TFSearch v1.3)

MZF : myeloid zinc finger

Pour répondre à nos objectifs, nous avons mis en place une stratégie expérimentale selon les étapes suivantes. Tout d'abord, nous avons étudié les effets de concentrations croissantes de calcium extracellulaire (eCa^{2+}) variant de 0 à 5 mM, sur l'expression d'Ank et PC-1 (ARNm et protéine), ainsi que sur la production d'ePPi dans le surnageant de chondrocytes stimulés avec 10 ng/ml de TGF-β1. Nous avons ensuite analysé les effets du chlorure de gadolinium (100 µM de $GdCl_3$, agoniste du CaSR, mais également antagoniste des canaux calciques sensibles aux étirements, bien que cette capacité ne sera pas sollicitée dans notre modèle de culture), ainsi que de plusieurs inhibiteurs de canaux calciques sur les effets inducteurs du TGF-β1. Les inhibiteurs suivant ont été utilisés : le chlorure de nickel (2 mM de $NiCl_2$, pour les VOC de type T et les canaux d'entrée de calcium non-spécifiques), la lercanidipine (10 µM, pour les VOC de type L), l' ω-conotoxine (1 µM, pour les VOC de type N), et l' ω-agatoxine (1 µM, pour les VOC de type P et de type Q). Dans un troisième temps, nous avons évalué les effets de variations de la concentration calcique intracellulaire (iCa^{2+}) sur la réponse des chondrocytes au TGF-β1. L'ionomycine (1 µM, ionophore calcique) a été employée comme inducteur du niveau d'iCa^{2+}, le BAPTA-AM (10 µM) en tant que chélateur de l'iCa^{2+}, la toxine pertussique (200 ng/ml) pour bloquer les canaux calciques dépendants de l'IP_3, et la thapsigargine (1 µM) pour inhiber les pompes sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA). Enfin, pour connaître le degré d'implication éventuelle du facteur de transcription Sp1 sur l'action stimulatrice du TGF-β1, nous avons utilisé l'inhibiteur de Sp1, WP631 (1 µM), et l'ARN interférence dirigé contre ce facteur de transcription (siRNA, 10 nM).

Figure 20 : Influence de la concentration d'eCa^{2+} sur les effets inducteurs du TGF-β1



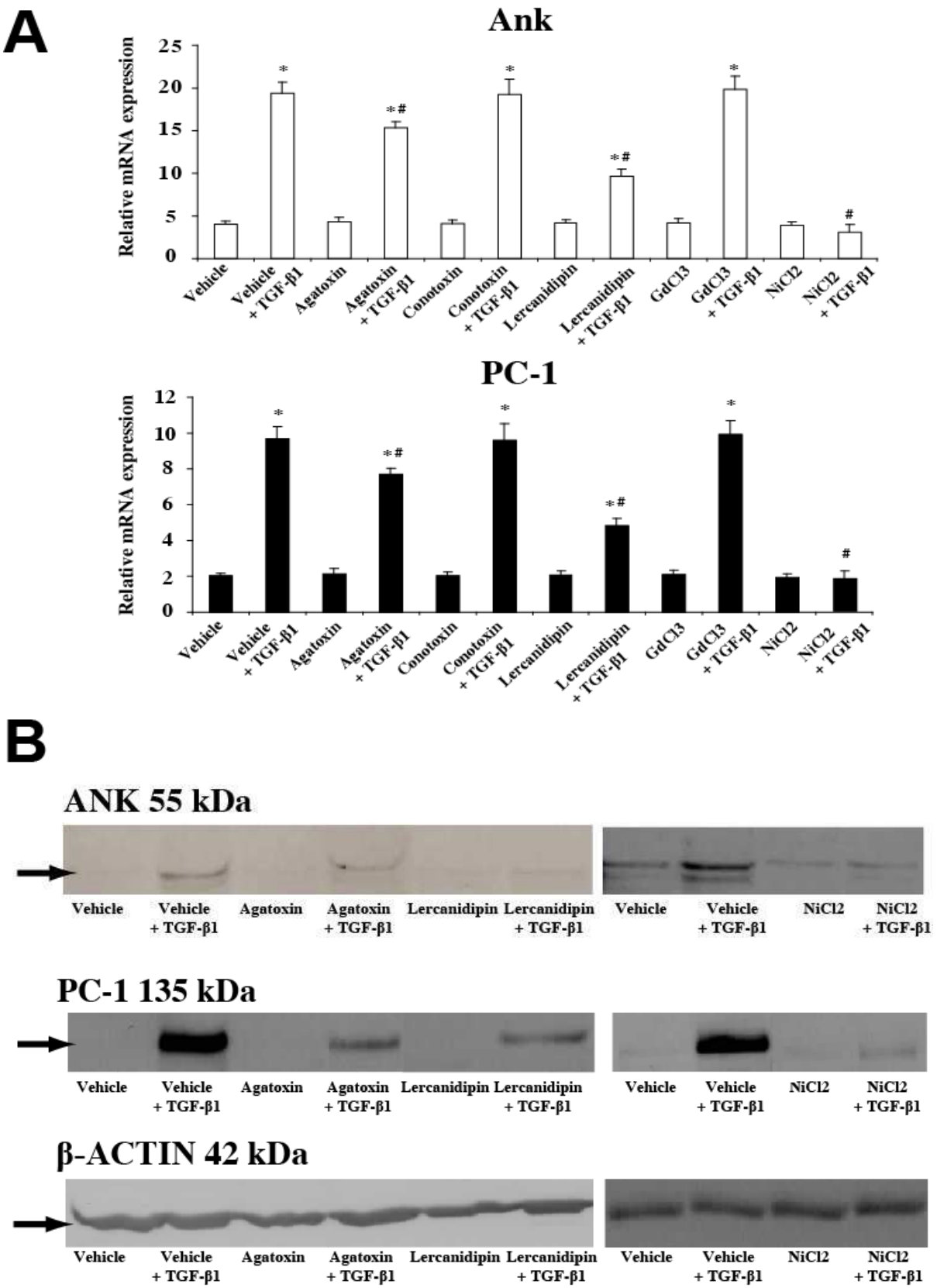


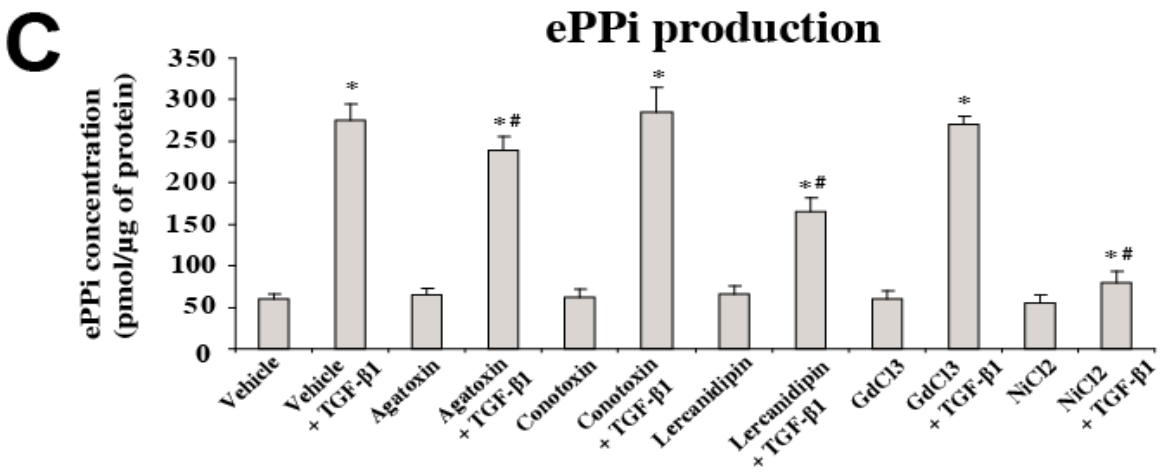
A, Influence of ranging extracellular Ca^{2+} concentrations on the stimulating effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 mRNA expression. Total RNA was extracted from chondrocytes stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 12 h, and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (reference gene) (n=3). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value. **B,** Influence of ranging extracellular Ca^{2+} concentrations on the stimulating effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 protein expression. Total protein were extracted from chondrocytes stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 48 h, and subjected to western blot analysis. The relative abundance of protein of interest was normalized to that of β-actin protein. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Influence of ranging extracellular Ca^{2+} concentrations on the stimulating effects of TGF-β1 on ePPi generation. ePPi was assayed from supernatants of chondrocytes stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 72 h and normalized to total cell proteins. Data (n=6) are expressed as mean ± SD in picomoles per microgram of protein.
Statistically significant differences from cells without TGF-β1 are indicated as *: $p<0.05$, and from the 1,25 mM Ca^{2+} condition as #: $p<0.05$.(ANOVA and Fisher PLSD *post-hoc* test).

Les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression des ARNm d'Ank et PC-1 sont amplifiés au fur et à mesure de l'augmentation des concentrations d'eCa^{2+}. Cet effet est également retrouvé sur l'expression protéique d'ANK et PC-1, ainsi que sur la quantité d'ePPi produite par les cellules.

Ces résultats suggèrent un rôle crucial du calcium dans la régulation de la réponse des chondrocytes au TGF-β1.

Figure 21 : Impact des inhibiteurs de canaux calciques sur les effets inducteurs du TGF-β1



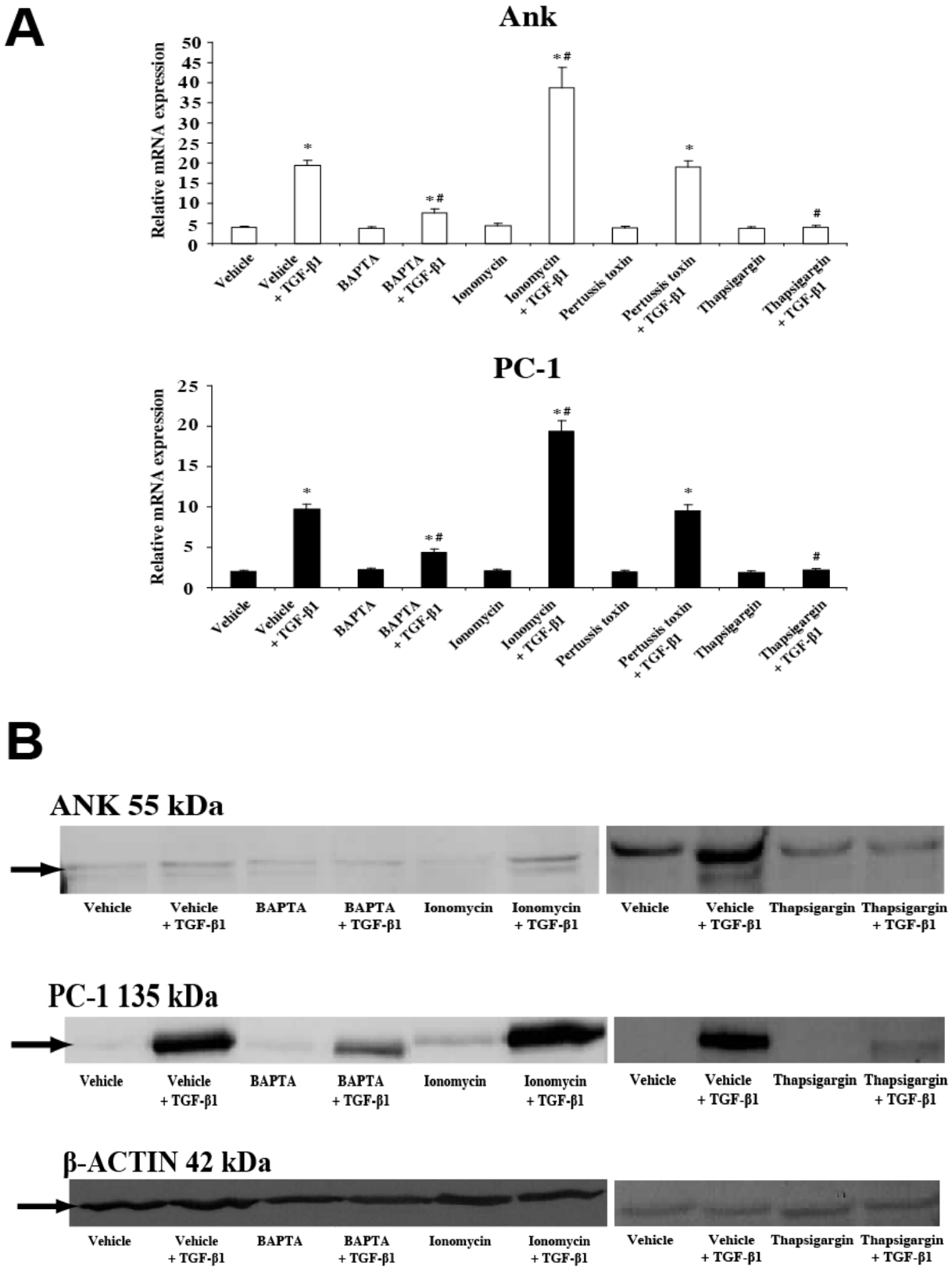


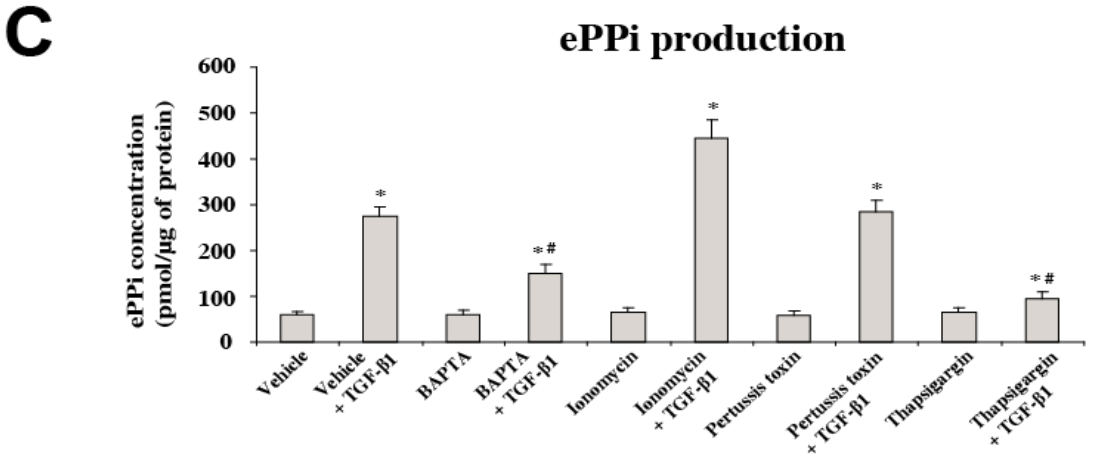
A, Effect of CaSR agonist and Ca^{2+} channels blockers on the inducing effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 mRNA expression. Total RNA was extracted from chondrocytes pre-treated with either vehicle or with one of the VOC inhibitors for 1 h, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 12 h, and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (reference gene) (n=3). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value. **B,** Effect of CaSR agonist and Ca^{2+} channels blockers on the stimulating effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 protein expression. Total protein were extracted from chondrocytes pre-treated with either vehicle or with one of the VOC inhibitors for 1 h, then with 10 ng/ml of TGF-β1 for 48 h, and subjected to western blot analysis. The relative abundance of protein of interest was normalized to that of β-actin protein. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Effect of CaSR agonist and Ca^{2+} channels blockers on the inducing effects of TGF-β1 on ePPi generation. ePPi was assayed from supernatants of chondrocytes pre-treated with either vehicle or with one of the VOC inhibitors for 1 h, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 72 h and normalized to total cell proteins. Data (n=6) are expressed as mean ± SD in picomoles per microgram of protein.
Statistically significant differences from vehicle are indicated as *: $p<0.05$, and from Vehicle + TGF-β1-treated cells as #: $p<0.05$.(ANOVA and Fisher PLSD *post-hoc* test).

Les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression des ARNm d'Ank et PC-1 ne sont pas affectés par la présence d'ω-conotoxine (bloquant les VOC de type N) ou de $GdCl_3$ (agoniste du CaSR), et ne sont que très faiblement diminués (17 %) par l'ω-agatoxine (inhibiteur des VOC de type P/Q). En revanche, la lercanidipine (inhibiteur des VOC de type L) diminue les effets stimulateurs du TGF-β1 de 45%, et le $NiCl_2$ bloque quasi-totalement ces effets. Ce profil de régulation de l'action du TGF-β1 est obtenu de façon similaire pour l'expression protéique d'ANK et PC-1, ainsi que sur la quantité d'ePPi produite par les cellules.

Ces résultats soulignent le rôle non-négligeable des VOC de type L, et surtout le rôle primordial des VOC de type T dans le contrôle de la réponse des chondrocytes au TGF-β1.

Figure 22 : Impact d'une modulation des niveaux d'iCa^{2+} sur les effets inducteurs du TGF-β1



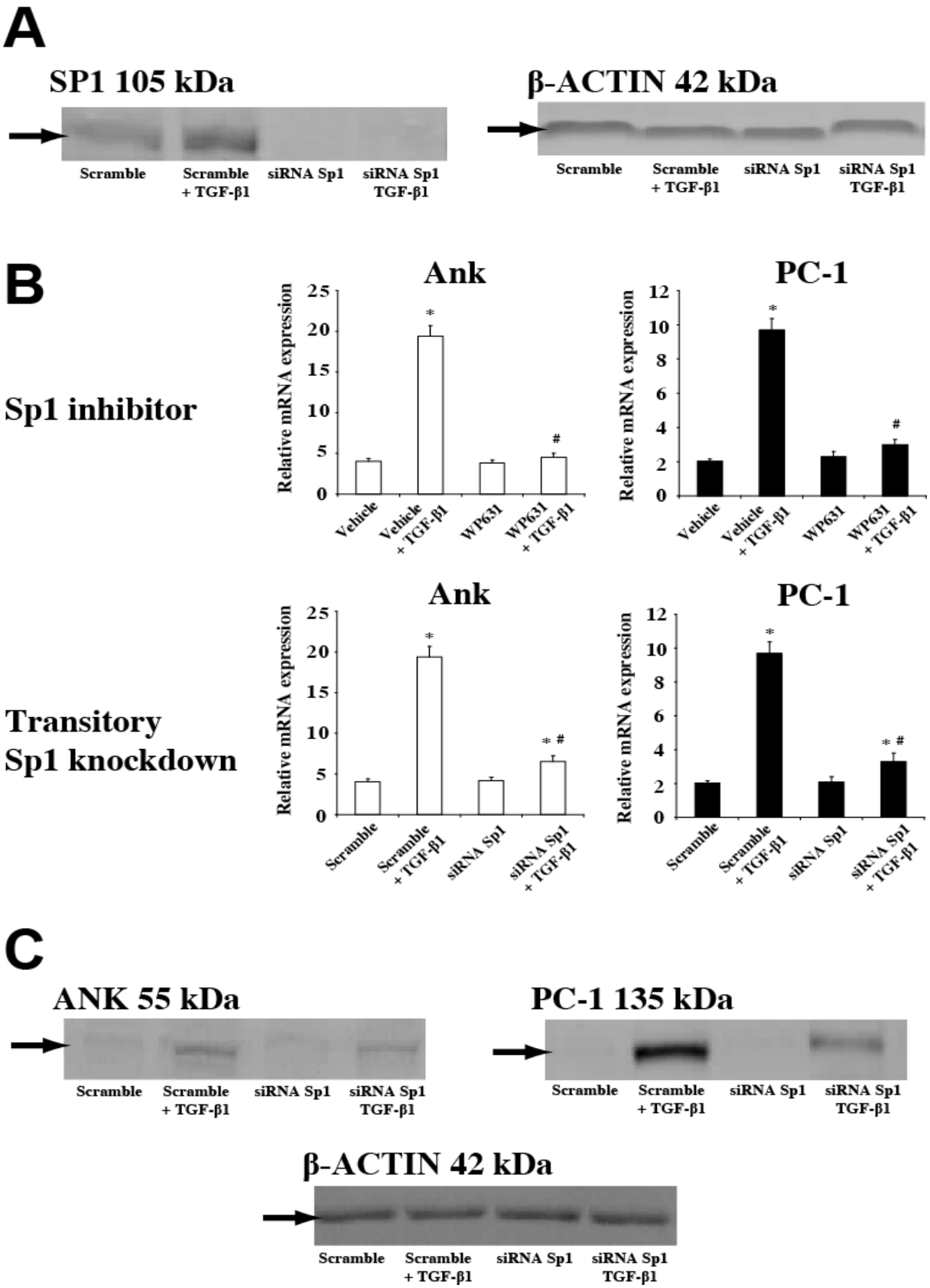


A, Influence of iCa^{2+} levels modulators on the stimulating effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 mRNA expression. Total RNA was extracted from chondrocytes pre-treated with either vehicle or with one of the iCa^{2+} modulators for 1 h, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 12 h, and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (reference gene) (n=3). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value. **B,** Influence of iCa^{2+} levels modulators on the stimulating effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 protein expression. Total protein were extracted from chondrocytes pre-treated with either vehicle or with one of the iCa^{2+} modulators for 1 h, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 48 h, and subjected to western blot analysis. The relative abundance of protein of interest was normalized to that of β-actin protein. Images presented are representative of three independent experiments. **C,** Influence of iCa^{2+} levels modulators on the stimulating effects of TGF-β1 on ePPi generation. ePPi was assayed from supernatants of chondrocytes pre-treated with either vehicle or with one of the iCa^{2+} modulators for 1 h, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 72 h and normalized to total cell proteins. Data (n=6) are expressed as mean ± SD in picomoles per microgram of protein. Statistically significant differences from vehicle are indicated as *: $p<0.05$, and from vehicle + TGF-β1-treated cells as #: $p<0.05$.(ANOVA and Fisher PLSD *post-hoc* test).

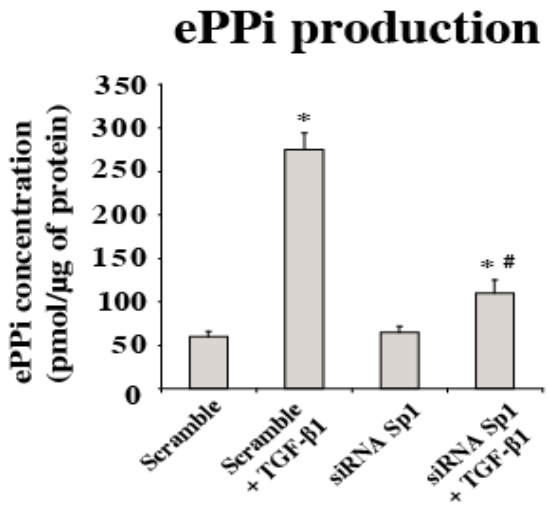
Les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression des ARNm d'Ank et PC-1 ne sont pas affectés par la présence de toxine pertussique (bloquant les canaux calciques sensibles à l'IP_3). En revanche, l'ionomycine (provoque une élévation de la concentration d'iCa^{2+}) augmente l'action stimulatrice du TGF-β1 d'un facteur 1,6 fois. Par ailleurs, le BAPTA (chélateur de l'iCa^{2+}) diminue les effets du TGF-β1 de 55%, et la thapsigargine (inhibiteur des SERCA) bloque quasi-totalement ces effets. Ce profil de régulation de l'action du TGF-β1 est obtenu de façon similaire pour l'expression protéique d'ANK et PC-1, ainsi que sur la quantité d'ePPi produite par les cellules.

Ces résultats suggèrent un rôle essentiel de l'iCa^{2+}, mobilisé de manière IP_3-indépendante, dans la réponse des chondrocytes au TGF-β1.

Figure 23 : Influence du facteur de transcription Sp1 sur les effets inducteurs du TGF-β1



D



A, Effect of Sp1 transitory knockdown on Sp1 protein expression. Total protein were extracted from chondrocytes transfected with 10 nM of either scramble or Sp1 siRNA, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 48 h, and subjected to western blot analysis. The relative abundance of protein of interest was normalized to that of β-actin protein. Images presented are representative of three independent experiments. **B,** Effect of WP631 and Sp1 transitory knockdown in the regulating effects of Ca^{2+} on the inducing effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 mRNA expression. Total RNA was extracted from chondrocytes transfected with 10 nM of either scramble or Sp1 siRNA, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 12 h, and subjected to RT-qPCR analysis. The levels of mRNA of interest were normalized to that of S29 (reference gene) (n=3). Results are presented in histograms as means (± SD) over S29 value. **C,** Effect of Sp1 transitory knockdown in the regulating effects of Ca^{2+} on the inducing effects of TGF-β1 on Ank and PC-1 protein expression. Total protein were extracted from chondrocytes transfected with 10 nM of either scramble or Sp1 siRNA, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 48 h, and subjected to western blot analysis. The relative abundance of protein of interest was normalized to that of β-actin protein. Images presented are representative of three independent experiments. **D,** Effect of Sp1 transitory knockdown in the regulating effects of Ca^{2+} on the stimulating effects of TGF-β1 on ePPi generation. ePPi was assayed from supernatants of chondrocytes transfected with 10 nM of either scramble or Sp1 siRNA, then stimulated with 10 ng/ml of TGF-β1 for 72 h and normalized to total cell proteins. Data (n=6) are expressed as mean ± SD in picomoles per microgram of protein.
Statistically significant differences from scramble/vehicle are indicated as *: $p<0.05$, and from vehicle/scramble +TGF-β1-treated cells as #: $p<0.05$.(ANOVA and Fisher PLSD *post-hoc* test).

Le TGF-β1 augmente l'expression protéique de Sp1, et nous avons pu explorer le rôle de ce facteur de transcription grâce à la technologie de l'ARN interférence, dont nous prouvons l'efficacité avec des expériences de western blot. L'invalidation transitoire de Sp1, tout comme l'utilisation du WP631 (inhibiteur chimique sélectif de l'action de Sp1) diminuent très fortement les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression des ARNm d'Ank et PC-1, l'effet observé le moins important étant une baisse de 65% de l'expression de l'ARNm de PC-1 lors d'une invalidation transitoire de *Sp1*. Ce profil de régulation de l'action du TGF-β1 est obtenu

de façon similaire pour l'expression protéique d'ANK et PC-1, ainsi que sur la quantité d'ePPi produite par les cellules.

Ces résultats mettent en évidence un rôle clé du facteur de transcription Sp1 dans la réponse des chondrocytes au TGF-β1.

Un schéma de synthèse de l'ensemble de ces résultats est proposé en Figure 24.

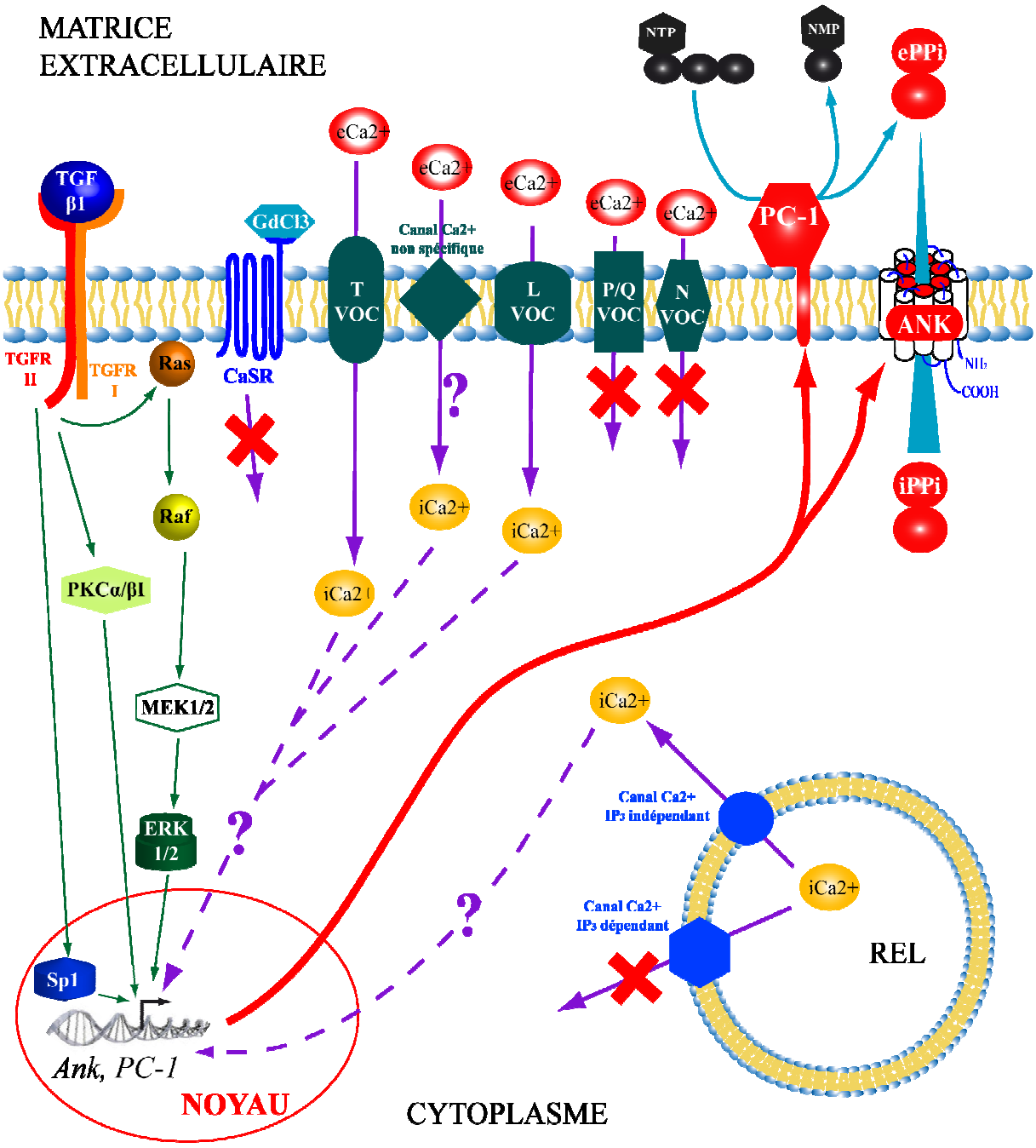


Figure 24: Les effets inducteurs du TGF-β1 sur la production d'ePPi dépendent des concentrations d'eCa2+ et d'iCa2+

REL: Réticulum Endoplasmique Lisse ; VOC: Canal calcique dépendant du voltage

III.C. Discussion et perspectives

Il est intéressant de noter que le $NiCl_2$, inhibiteur des flux calciques dépendant des VOC de type T, diminue quasi-totalement les effets stimulateurs du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank* et *PC-1*. Or, nous démontrons également un effet important (45%) de la Lercanidipine, qui bloque les VOC de type L. Ces résultats peuvent soulever des interrogations, dans la mesure où le blocage des VOC de type T semble à lui seul suffisant pour s'opposer aux effets inducteurs du TGF-β1. Cette différence provient peut être de la concentration de lercanidipine utilisée. En effet, il a été décrit que les inhibiteurs des VOC, comme le vérapamil (inhibiteur des VOC de type L), peuvent perdre leur sélectivité et affecter les VOC de type T à des concentrations plus élevées (Spedding et Paoletti, 1992). Cependant, les concentrations de Lercanidipine que nous avons employé sont en accord avec celles considérées comme sélectives, et utilisées habituellement dans d'autres travaux (Corsini *et al.*, 1996 ; Wirtz et Herzig, 2004).

Une explication peut potentiellement provenir de la concentration, assez élevée, de $NiCl_2$ utilisée, qui pourrait faire perdre la sélectivité de ce composé aux VOC de type T, et affecter d'autres canaux calciques non-spécifiques. Nous avions testé plusieurs concentrations sur nos cellules, variant de 2 à 5 mM, entrant dans la gamme des concentrations utilisées habituellement dans d'autres études répertoriées dans la littérature (Buchan et Martin, 1991 ; Nikodijevic *et al.*, 1992 ; Laskowska-Bozek *et al.*, 1996). Nous avons alors choisi la concentration de 2 mM pour son efficacité sur les effets du TGF-β1, couplée à son innocuité (bleu Trypan) et son absence d'effet néfaste sur le métabolisme des cellules (test MTT). Il a cependant été décrit dans plusieurs autres travaux des utilisations à des concentrations se situant plutôt aux alentours de 100 µM à 1 mM (Kim-Lee *et al.*, 1992 ; Lawson et Chatelain, 1992 ; Chow *et al.*, 2003). Pour vérifier notre hypothèse, des expériences utilisant des concentrations plus faibles de $NiCl_2$ sont actuellement en cours au laboratoire.

Un autre résultat à souligner est l'indépendance de la libération calcique intracellulaire de l'IP_3. En effet, la mobilisation du calcium à partir du réticulum endoplasmique *via* la cascade de la PLC, générant du diacylglycérol et de l'IP_3, est un phénomène très bien caractérisé à l'heure actuelle. Or l'utilisation de la toxine pertussique, qui bloque les canaux calciques IP_3-dépendants, s'est avérée inefficace sur l'action stimulatrice du TGF-β1. Pour savoir si ces observations ne provenaient pas de la qualité de la toxine pertussique utilisée, nous avons réalisé au laboratoire des expériences complémentaires avec l'inhibiteur chimique U-73122, sélectif de la PLC. De la même façon qu'avec la toxine, le blocage de l'activité de

la PLC n'a eu aucune répercussion sur les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank* et *PC-1*.

Nos résultats mettent en évidence l'importance des concentrations d'eCa^{2+} et d'iCa^{2+} dans les effets inducteurs du TGF-β1 sur le métabolisme du PPi. La modulation de ces concentrations semble ainsi grandement influencer l'impact de ce facteur de croissance sur les chondrocytes. Des expériences sont actuellement en cours au laboratoire pour étudier les effets de la variation des niveaux d'eCa^{2+} et d'iCa^{2+} sur l'activation des voies ERK 1/2 et PKC Ca^{2+}-dépendantes, que nous avons décrites comme étant les principales voies dont dépendent les effets du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank*. Il est possible que la modulation des concentrations calciques intra- et extracellulaires puisse modifier le profil de phosphorylation de ces protéines, ce qui pourrait expliquer nos résultats présentés ci-dessus.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a porté sur trois rôles du gène *Ank* au sein du cartilage articulaire : tout d'abord, la contribution d'ANK dans la production d'ePPi par des chondrocytes stimulés avec du TGF-β1 ; ensuite, l'implication d'ANK dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire ; et enfin, l'influence de la concentration de calcium sur la production d'ePPi par des chondrocytes stimulés avec du TGF-β1. Nous avons pu démontrer qu'ANK était la protéine responsable de la majeure partie de la génération d'ePPi induite par le TGF-β1. Nous avons également mis en évidence le fait qu'ANK et le PPi qu'elle exporte préservent le phénotype du chondrocyte articulaire par un phénomène de contrôle négatif exercé sur l'expression de Wnt-5a. Pour terminer, nous avons pu souligner le rôle critique de la concentration de calcium dans les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank*, aspect essentiel si l'on se place dans des cas de CCA secondaires aux hypercalcémies pouvant être retrouvées chez des patients atteints d'hyperparathyroïdie.

La première partie de ce travail a permis de distinguer dans notre modèle de chondrocyte articulaire la contribution respective d'ANK et PC-1 dans la production d'ePPi stimulée par le TGF-β1. Nous avons démontré qu'ANK contribuait de façon majoritaire (60%) à cette génération comparativement à PC-1, ce qui est en indirectement accord avec une étude réalisée sur des ostéoblastes qui établissait la contribution de PC-1 dans la génération d'ePPi comme allant de 35% à 50% (Hessle *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter, dans les expériences complémentaires que nous avons réalisé, qu'une double transfection (transfection simultanée) des cellules avec un siRNA dirigé contre Ank et l'autre contre PC-1 permet de contrecarrer totalement les effets inducteurs du TGF-β1 sur la production d'ePPi, alors que la « somme théorique » des effets de chacun des siRNA séparé ne diminuerait cette production que de 80% au maximum. Ce résultat pourrait bien indiquer une coopération des deux protéines ANK et PC-1 dans la génération d'ePPi, comme cela a été suggéré par d'autres travaux (Johnson et Terkeltaub, 2004). Une étude très récente particulièrement intéressante a d'ailleurs mis en évidence une interaction d'ANK avec le transporteur PiT-1, un autre acteur de la balance PPi/Pi (Wang *et al.*, 2009). Ces travaux mettent en lumière le fait que la mutation M48T « gain de fonction » dans le gène *Ank* déstabilise cette interaction, semblant ainsi suggérer, au vu du niveau d'ePPi plus élevé qu'entraîne la présence de cette mutation, un rôle régulateur de PiT-1 sur la fonction d'ANK.

Le mode d'action du TGF-β1 semble également être en faveur d'une action coordonnée d'ANK et PC-1. En effet, nous avons démontré que ce facteur de croissance induit l'expression de l'ARNm d'Ank, ainsi que celle de PC-1, par la voie Ras/Raf-1/ERK

1/2, indépendamment de la voie Smad. Comme les deux protéines sont les principaux générateurs d'ePPi, ces résultats vont dans le sens d'une dépendance de la production d'ePPi à la voie de signalisation Ras/Raf-1/ERK 1/2. Des expériences de dosage d'ePPi dans le surnageant de chondrocytes transfectés avec ces dominants négatifs et l'inhibiteur chimique sélectif de MEK 1/2 sont prévues pour vérifier cette hypothèse.

L'ensemble de ces résultats suggère que les effets du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank*, de *PC-1,* et *in fine* sur la génération d'ePPi, passeraient probablement par les mêmes mécanismes moléculaires. Bien qu'il ait été démontré que le probénécide était capable d'inhiber la production d'ePPi stimulée par le TGF-β1 (Rosenthal et Ryan, 1994), ce médicament (Bénémide©) n'est pas indiqué dans le traitement des chondrocalcinoses articulaires en France. Nous démontrons que l'induction d'*Ank* par le TGF-β1 est fortement dépendante des PKC Ca^{2+}-dépendantes, et donc le développement encourageant d'inhibiteurs sélectifs de PKCα/βI en clinique dans le domaine cardiovasculaire et de la cancérologie (Goekjian et Jirousek, 1999 ; Hanauske *et al.*, 2007) pourrait s'avérer être une piste intéressante dans le blocage de la formation de cristaux de PPCD par un excès d'ePPi. Cependant, les solutions thérapeutiques actuelles semblent s'orienter vers la dissolution des microcristaux par le thiosulfate de sodium, un agent chélateur du calcium. Les effets de cette molécule sur l'expression d'*Ank* et *PC-1* n'ont à ce jour pas été démontrés. Il pourrait être intéressant de tester l'action séparée du thiosulfate de sodium, et éventuellement son action conjointe à un inhibiteur sélectif des PKC Ca^{2+}-dépendantes dans les effets inducteurs du TGF-β1 sur l'expression d'ANK et PC-1, responsables de la production d'ePPi.

La deuxième partie de cette thèse a permis de démontrer l'implication d'ANK et de l'ePPi dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire. Nous avons pu mettre en évidence que l'ePPi exporté par ANK semble exercer un contrôle négatif sur la synthèse de Wnt-5a., évitant ainsi une activation de la voie « canonique » des Wnt qui entraîne une perte des marqueurs du chondrocyte articulaire. Nous parvenons à contrecarrer les effets délétères de l'IL-1β et du siRNA dirigé contre *Ank* en ajoutant une concentration finale de 0,1 mM de PPi exogène. Il s'agit cependant de tempérer ce constat, puisque ce mécanisme ne semble valable que pour une certaine zone de concentration d'ePPi ajoutée. En effet, notre concentration finale de 100 µM peut paraître élevée, vu qu'il est souvent décrit dans la littérature que la concentration d'ePPi dans le liquide synovial de patients sains oscille entre 5 et 10 µM, et peut s'élever jusqu'à 15-20 µM dans les liquides synoviaux provenant de patients souffrant d'arthrose ou de CCA (Doherty *et al.*, 1991 ; Pattrick *et al.*, 1991; Ryan *et*

al., 1991). Dans nos expériences complémentaires (figure supplémentaire 1 de l'article portant sur ce sujet), nous démontrons que la présence de 0,01 mM de PPi exogène (soit 10 µM ; une concentration plus proche de la physiologie) n'a aucun effet positif significatif sur la perte des marqueurs du chondrocyte articulaire entraînée par l'invalidation d'*Ank*. Bien que nous n'ayons pas réalisé d'expériences avec une concentration intermédiaire de PPi exogène (entre 0,01 mM et 0,1 mM), qui pourrait diminuer les effets de l'invalidation d'*Ank*, nos résultats démontrent tout de même de façon non-ambiguë que nous limitons fortement la perte des marqueurs du chondrocyte articulaire en ajoutant 0,1 mM de PPi exogène aux cellules rendues déficientes pour l'expression d'*Ank*. A l'inverse, nous remarquons (figure supplémentaire 2 de l'article portant sur ce sujet) que la présence d'1 mM d'ePPi est fortement défavorable concernant l'expression des marqueurs du phénotype chondrocytaire (diminution de Sox-9 par simple addition de PPi exogène). Des travaux sont d'ailleurs actuellement en cours au laboratoire sur l'action de cette forte concentration de PPi exogène à l'aide de la méthode des « PCR arrays », permettant l'étude d'une très large gamme de gènes entrant dans une même thématique, telle que l'homéostasie de la MEC ou encore la signalisation des Wnt. Des résultats préliminaires ont permis de mettre en évidence une forte influence du PPi exogène à la concentration d'1 mM, qui semble être particulièrement favorable à l'activation de la voie des Wnt.

Un point essentiel de ces travaux reste le mode d'action de l'ePPi sur le chondrocyte articulaire. Nous n'avons pas exploré plus en détail quels pouvaient être les mécanismes moléculaires impliqués dans le mode d'action du PPi exogène. Il est intéressant de noter qu'il n'existe à ce jour aucun récepteur pour le PPi décrit à la surface de la membrane plasmique. La stimulation de chondrocytes avec du PPi exogène reste par ailleurs assez marginale dans la littérature à l'heure actuelle. Le groupe de Robert Terkeltaub a démontré que le PPi exogène était capable d'induire l'expression de la MMP-13 sur des chondrocytes bovins cultivés en monocouche (Johnson et Terkeltaub, 2004). Cette étude ne propose cependant aucun mécanisme d'action du PPi exogène pour induire ces effets. Une explication pourrait être, comme le suggèrent les travaux de Gurley et collaborateurs, la bi-directionnalité du flux de PPi transporté par ANK, autrement dit, ce transporteur pourrait également internaliser le PPi exogène vers l'intérieur de la cellule (Gurley *et al.*, 2006). Comme il a précédemment été démontré que la variation de PPi intracellulaire pouvait influencer l'expression de plusieurs gènes, dont le gène *Ank* (Harmey *et al.*, 2004), cela laisse à penser que le PPi exogène pourrait être internalisé par ANK, et ainsi exercer directement son effet au sein du cytoplasme. Cependant, il convient de considérer avec précaution les conclusions des travaux de Gurley et

collaborateurs, puisque les auteurs y affirment, sans démonstration, qu'ANK est un transporteur bi-directionnel comme de nombreux autres transporteurs membranaires. Ces expériences sont d'ailleurs dans l'incapacité de démontrer un export de PPi vers le milieu extracellulaire, alors que la même équipe avait clairement mis en évidence quelques années auparavant qu'ANK était capable d'exporter le PPi (Ho *et al.*, 2000). L'hypothèse du PPi exogène pouvant exercer son action *via* une internalisation par ANK manque d'arguments en sa faveur à l'heure actuelle, et il paraît tout particulièrement intéressant d'élaborer un protocole expérimental permettant d'obtenir des nouvelles données concernant la possibilité d'une bi-directionnalité du transport de PPi par ANK. En outre, nous évaluons actuellement au laboratoire les effets du PPi sur l'activation des voies de signalisation intracellulaire (MAPK, PKC, Smad...), afin de savoir si l'addition de PPi exogène, bien qu'aucun récepteur ne soit caractérisé, entraîne une cascade de phosphorylation au sein des chondrocytes articulaires.

Notre étude concernant l'influence d'ANK et du PPi sur le phénotype du chondrocyte articulaire a été réalisée *in vitro* sur des cellules de rat. Des expériences sont actuellement en cours au laboratoire pour examiner les effets d'une modulation d'*Ank* sur les cellules humaines provenant de pièces articulaires post-opératoires (après pose de prothèse totale de genou ou de hanche). Les résultats préliminaires semblent cependant indiquer que la modulation d'Ank n'a qu'une très faible influence sur l'expression du collagène de type II en ARNm. Un tel résultat pourrait s'expliquer par le fait que les patients subissant une pose de prothèse ont un cartilage articulaire en très mauvais état, arthrosique, et composé de chondrocytes ayant sans doute déjà perdu en grande partie l'expression de leurs marqueurs phénotypiques. D'autres expériences sont prévues sur cette thématique de recherche, notamment l'investigation d'une surexpression d'*Ank* intraarticulaire par infection lentivirale dans un modèle de souris spontanément arthrosique (souche Str/ort, voire des souris déficientes pour l'expression du collagène de type IX qui développent une dégénérescence non inflammatoire du cartilage articulaire (Fassler *et al.*, 1994)). L'étude de l'évolution de l'arthrose (composition de la MEC, expression du collagène de type II...) sur le cartilage des souris contrôles comparativement aux souris infectées surexprimant *Ank* pourrait permettre de statuer sur la fonction de ce gène en terme d'évolution de la pathologie arthrosique, mais également dans le maintien des marqueurs du phénotype du chondrocyte articulaire. Une expérience « inverse » pourrait être réalisée, basée sur la transfection de short hairpin RNA (shRNA) (invalidation d'*Ank* par un mécanisme d'ARN interférence de façon plus stable

qu'un siRNA) dans le cartilage d'animaux sains. Nous pourrions alors, *via* des injections intraarticulaires de PPi, tenter de s'opposer à de tels phénomènes.

La troisième partie de ce travail a permis de mettre en évidence le rôle essentiel du calcium dans la génération d'ePPi par les chondrocytes en réponse à une stimulation avec le TGF-β1. En effet, nous avons mis en évidence que seuls certains VOC étaient possiblement impliqués, comme les VOC de type L, et dans une mesure plus importante les VOC de type T. Si nos résultats permettent d'exclure sans trop d'ambigüité l'implication des VOC de type P/Q et des VOC de type N dans les effets stimulateurs du TGF-β1 sur l'expression d'*Ank* et *PC-1*, des doutes peuvent être soulevés sur le fait de savoir si les VOC de type T sont impliqués, ou s'il s'agit d'un effet non-sélectif du $NiCl_2$. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place des expériences au laboratoire utilisant des doses plus faibles de $NiCl_2$, de l'ordre de la centaine de µM. En parallèle, nous avons prévu d'invalider transitoirement les VOC de type T (à l'aide de la technologie siRNA ou shRNA), afin de vérifier si l'effet que nous observons avec le $NiCl_2$ provient bien de ces VOC et non pas de canaux non-spécifiques d'entrée du calcium.

Afin de valider notre modèle cellulaire entrant dans le cadre des CCA secondaires à des hypercalcémies (et donc potentiellement accompagnant des cas d'hyperparathyroïdie), il serait intéressant d'obtenir un modèle animal présentant ces signes cliniques. Il se trouve que les souris déficientes pour l'expression du CaSR dans les glandes parathyroïdiennes présentent une hyperparathyroïdie, couplée à une hypercalcémie (Garner *et al.*, 2001). Il serait intéressant de réaliser des injections de TGF-β1 à ces souris en comparaison à des souris contrôle, afin de vérifier si les concentrations plus élevées de calcium favorisent le développement d'une CCA.

L'étude de la contribution du gène *Ank* dans la balance PPi/Pi et dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire a permis de mettre en évidence le rôle majoritaire de ce transporteur dans des situations d'augmentation de la sensibilité chondrocytaire au TGF-β1 dans le cadre des CCA sporadiques, ouvrant ainsi des perspectives de pistes thérapeutiques éventuelles à plus long terme. Par ailleurs, ANK influence l'expression des marqueurs du phénotype du chondrocyte articulaire, et donc la qualité de synthèse de la MEC du cartilage. Cela met en lumière un rôle original de ce transporteur, mais également du PPi qu'il exporte, et propose une nouvelle voie de recherche dans l'arthrose, concernant l'influence de cet ion sur l'homéostasie du cartilage. Enfin, l'influence du calcium semble cruciale sur l'action du

TGF-β1 dans la génération d'ePPi, ce qui permet de proposer un mécanisme d'apparition potentiel des CCA secondaires à des cas d'hyperparathyroïdie dont le tableau clinique indique également la présence d'une hypercalcémie.

Références Bibliographiques

Addison, W. N., F. Azari, E. S. Sorensen, M. T. Kaartinen et M. D. McKee (2007). "Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity." J Biol Chem **282**(21): 15872-83.

Aigner, T. et L. McKenna (2002). "Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage." Cell Mol Life Sci **59**(1): 5-18.

Aigner, T., S. Soder, P. M. Gebhard, A. McAlinden et J. Haag (2007). "Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence." Nat Clin Pract Rheumatol **3**(7): 391-9.

Andrew, L. J., V. Brancolini, L. S. de la Pena, M. Devoto, F. Caeiro, R. Marchegiani, A. Reginato, A. Gaucher, P. Netter, P. Gillet, D. Loeuille, D. J. Prockop, A. Carr, B. F. Wordsworth, M. Lathrop, S. Butcher, E. Considine, K. Everts, A. Nicod, S. Walsh et C. J. Williams (1999). "Refinement of the chromosome 5p locus for familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease." Am J Hum Genet **64**(1): 136-45.

Axmann, A., D. Seidel, T. Reimann, U. Hempel et K. W. Wenzel (1998). "Transforming growth factor-beta1-induced activation of the Raf-MEK-MAPK signaling pathway in rat lung fibroblasts via a PKC-dependent mechanism." Biochem Biophys Res Commun **249**(2): 456-60.

Bai, G., D. S. Howell, G. A. Howard, B. A. Roos et H. S. Cheung (2001). "Basic calcium phosphate crystals up-regulate metalloproteinases but down-regulate tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in human fibroblasts." Osteoarthritis Cartilage **9**(5): 416-22.

Bardin, T. et D. Kuntz (1988). "[Joint chondrocalcinosis and primary hyperparathyroidism]." Rev Rhum Mal Osteoartic **55**(7): 511-3.

Barre, L., N. Venkatesan, J. Magdalou, P. Netter, S. Fournel-Gigleux et M. Ouzzine (2006). "Evidence of calcium-dependent pathway in the regulation of human beta1,3-glucuronosyltransferase-1 (GlcAT-I) gene expression: a key enzyme in proteoglycan synthesis." Faseb J **20**(10): 1692-4.

Bollen, M., R. Gijsbers, H. Ceulemans, W. Stalmans et C. Stefan (2000). "Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move." Crit Rev Biochem Mol Biol **35**(6): 393-432.

Boutros, M., N. Paricio, D. I. Strutt et M. Mlodzik (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." Cell **94**(1): 109-18.

Buchan, K. W. et W. Martin (1991). "Bradykinin induces elevations of cytosolic calcium through mobilisation of intracellular and extracellular pools in bovine aortic endothelial cells." Br J Pharmacol **102**(1): 35-40.

Burt, H. M., J. K. Jackson, P. Dryden et H. Salari (1993). "Crystal-induced protein tyrosine phosphorylation in neutrophils and the effect of a tyrosine kinase inhibitor on neutrophil responses." Mol Pharmacol **43**(1): 30-6.

Calo, L., L. Punzi et A. Semplicini (2000). "Hypomagnesemia and chondrocalcinosis in Bartter's and Gitelman's syndrome: review of the pathogenetic mechanisms." Am J Nephrol **20**(5): 347-50.

Cardenal, A., I. Masuda, A. L. Haas, W. Ono et D. J. McCarty (1996). "Identification of a nucleotide pyrophosphohydrolase from articular tissues in human serum." Arthritis Rheum **39**(2): 252-6.

Chen, W., D. ten Berge, J. Brown, S. Ahn, L. A. Hu, W. E. Miller, M. G. Caron, L. S. Barak, R. Nusse et R. J. Lefkowitz (2003). "Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4." Science **301**(5638): 1391-4.

Cheung, H. S. (2005). "Role of calcium-containing crystals in osteoarthritis." Front Biosci **10**: 1336-40.

Cheung, H. S., T. R. Devine et W. Hubbard (1997). "Calcium phosphate particle induction of metalloproteinase and mitogenesis: effect of particle sizes." Osteoarthritis Cartilage **5**(3): 145-51.

Cheung, H. S., P. B. Halverson et D. J. McCarty (1983). "Phagocytosis of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate crystals by rabbit articular chondrocytes stimulates release of collagenase, neutral protease, and prostaglandins E2 and F2 alpha." Proc Soc Exp Biol Med **173**(2): 181-9.

Cheung, H. S., J. D. Sallis et J. A. Struve (1996). "Specific inhibition of basic calcium phosphate and calcium pyrophosphate crystal-induction of metalloproteinase synthesis by phosphocitrate." Biochim Biophys Acta **1315**(2): 105-11.

Cheung, H. S., M. T. Story et D. J. McCarty (1984). "Mitogenic effects of hydroxyapatite and calcium pyrophosphate dihydrate crystals on cultured mammalian cells." Arthritis Rheum **27**(6): 668-74.

Cheung, H. S., J. J. Van Wyk, W. E. Russell et D. J. McCarty (1986). "Mitogenic activity of hydroxyapatite: requirement for somatomedin C." J Cell Physiol **128**(2): 143-8.

Chow, K. Y., C. Wu, G. P. Sui et C. H. Fry (2003). "Role of the T-type Ca2+ current on the contractile performance of guinea pig detrusor smooth muscle." Neurourol Urodyn **22**(1): 77-82.

Chuck, A. J., M. G. Pattrick, E. Hamilton, R. Wilson et M. Doherty (1989). "Crystal deposition in hypophosphatasia: a reappraisal." Ann Rheum Dis **48**(7): 571-6.

Church, V., T. Nohno, C. Linker, C. Marcelle et P. Francis-West (2002). "Wnt regulation of chondrocyte differentiation." J Cell Sci **115**(Pt 24): 4809-18.

Church, V. L. et P. Francis-West (2002). "Wnt signalling during limb development." Int J Dev Biol **46**(7): 927-36.

Cobeta-Garcia, J. C., A. Gascon, E. Iglesias et V. Estopinan (1998). "Chondrocalcinosis and Gitelman's syndrome. A new association?" Ann Rheum Dis **57**(12): 748-9.

Corsini, A., M. Bonfatti, P. Quarato, M. R. Accomazzo, M. Raiteri, A. Sartani, R. Testa, S. Nicosia, R. Paoletti et R. Fumagalli (1996). "Effect of the new calcium antagonist lercanidipine and its enantiomers on the migration and proliferation of arterial myocytes." J Cardiovasc Pharmacol **28**(5): 687-94.

Dayer, J. M., V. Evequoz, C. Zavadil-Grob, M. D. Grynpas, P. T. Cheng, J. Schnyder, U. Trechsel et H. Fleisch (1987). "Effect of synthetic calcium pyrophosphate and hydroxyapatite crystals on the interaction of human blood mononuclear cells with chondrocytes, synovial cells, and fibroblasts." Arthritis Rheum **30**(12): 1372-81.

Dell'accio, F., C. De Bari, N. M. Eltawil, P. Vanhummelen et C. Pitzalis (2008). "Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis." Arthritis Rheum **58**(5): 1410-21.

Derfus, B. A., J. B. Kurian, J. J. Butler, L. J. Daft, G. F. Carrera, L. M. Ryan et A. K. Rosenthal (2002). "The high prevalence of pathologic calcium crystals in pre-operative knees." J Rheumatol **29**(3): 570-4.

Detmers, P. A., S. K. Lo, E. Olsen-Egbert, A. Walz, M. Baggiolini et Z. A. Cohn (1990). "Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils." J Exp Med **171**(4): 1155-62.

Dickson, G. R. (1978). "Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in the hypertrophic chondrocyte of the frog." Histochemistry **57**(4): 343-7.
Doherty, M. (2003). "Calcium pyrophosphate dihydrate crystal-associated arthropathy." In: Hochberg, M, editor. Rheumatology. Edinburgh: Mosby: 1937–50.
Doherty, M., A. Chuck, D. Hosking et E. Hamilton (1991). "Inorganic pyrophosphate in metabolic diseases predisposing to calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition." Arthritis Rheum **34**(10): 1297-303.
Ea, H. K., V. Monceau, E. Camors, M. Cohen-Solal, D. Charlemagne et F. Liote (2008). "Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals." Ann Rheum Dis **67**(11): 1617-25.
Ea, H. K., B. Uzan, C. Rey et F. Liote (2005). "Octacalcium phosphate crystals directly stimulate expression of inducible nitric oxide synthase through p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in articular chondrocytes." Arthritis Res Ther **7**(5): R915-26.
Ekman, S. et H. Rodriguez-Martinez (1991). "Ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the normal and osteochondrotic joint cartilage of growing pigs." Acta Anat (Basel) **140**(1): 26-33.
Enomoto-Iwamoto, M., J. Kitagaki, E. Koyama, Y. Tamamura, C. Wu, N. Kanatani, T. Koike, H. Okada, T. Komori, T. Yoneda, V. Church, P. H. Francis-West, K. Kurisu, T. Nohno, M. Pacifici et M. Iwamoto (2002). "The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis." Dev Biol **251**(1): 142-56.
Fassler, R., P. N. Schnegelsberg, J. Dausman, T. Shinya, Y. Muragaki, M. T. McCarthy, B. R. Olsen et R. Jaenisch (1994). "Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5070-4.
Faure, G., P. Netter, B. Malaman, J. Steinmetz et A. Gaucher (1981). "Hereditary pyrophosphate arthropathy." Scand J Rheumatol **10**(2): 159-60.
Fedde, K. N., C. C. Lane et M. P. Whyte (1988). "Alkaline phosphatase is an ectoenzyme that acts on micromolar concentrations of natural substrates at physiologic pH in human osteosarcoma (SAOS-2) cells." Arch Biochem Biophys **264**(2): 400-9.
Felson, D. T., J. J. Anderson, A. Naimark, W. Kannel et R. F. Meenan (1989). "The prevalence of chondrocalcinosis in the elderly and its association with knee osteoarthritis: the Framingham Study." J Rheumatol **16**(9): 1241-5.
Feng, X. H. et R. Derynck (1997). "A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity." Embo J **16**(13): 3912-23.
Fink, S. P., D. Mikkola, J. K. Willson et S. Markowitz (2003). "TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines." Oncogene **22**(9): 1317-23.
Garancis, J. C., H. S. Cheung, P. B. Halverson et D. J. McCarty (1981). ""Milwaukee shoulder"--association of microspheroids containing hydroxyapatite crystals, active collagenase, ad neutral protease with rotator cuff defects. III. Morphologic and biochemical studies of an excised synovium showing chondromatosis." Arthritis Rheum **24**(3): 484-91.
Garner, S. C., M. Pi, Q. Tu et L. D. Quarles (2001). "Rickets in cation-sensing receptor-deficient mice: an unexpected skeletal phenotype." Endocrinology **142**(9): 3996-4005.
Gaucher, A., G. Faure, P. Netter et J. Pourel (1986). "[Familial articular chondrocalcinosis]." Presse Med **15**(6): 250-4.
Gaudry, M., C. J. Roberge, R. de Medicis, A. Lussier, P. E. Poubelle et P. H. Naccache (1993). "Crystal-induced neutrophil activation. III. Inflammatory microcrystals induce

a distinct pattern of tyrosine phosphorylation in human neutrophils." J Clin Invest **91**(4): 1649-55.
Gerster, J. C. (2007). "[Apatite deposition diseases]." Rev Med Suisse **3**(103): 747-50, 752.
Gerster, J. C., A. Gautier, Y. Droz-Georget, F. Flach, F. Ardizzoni, D. Gross et G. Gallacchi (1986). "[The place of apatite in rheumatic diseases. Study of 25 cases by x-ray microanalysis and scanning electron microscopy]." Schweiz Med Wochenschr **116**(13): 390-5.
Goding, J. W., R. Terkeltaub, M. Maurice, P. Deterre, A. Sali et S. I. Belli (1998). "Ecto-phosphodiesterase/pyrophosphatase of lymphocytes and non-lymphoid cells: structure and function of the PC-1 family." Immunol Rev **161**: 11-26.
Goekjian, P. G. et M. R. Jirousek (1999). "Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development." Curr Med Chem **6**(9): 877-903.
Goldring, M. B. (2006). "Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases." Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(5): 1003-25.
Goldring, M. B., J. R. Birkhead, L. F. Suen, R. Yamin, S. Mizuno, J. Glowacki, J. L. Arbiser et J. F. Apperley (1994). "Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes." J Clin Invest **94**(6): 2307-16.
Guerne, P. A., F. Blanco, A. Kaelin, A. Desgeorges et M. Lotz (1995). "Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development." Arthritis Rheum **38**(7): 960-8.
Guerne, P. A., R. Terkeltaub, B. Zuraw et M. Lotz (1989). "Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes." Arthritis Rheum **32**(11): 1443-52.
Guicheux, J., G. Palmer, C. Shukunami, Y. Hiraki, J. P. Bonjour et J. Caverzasio (2000). "A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification." Bone **27**(1): 69-74.
Gurley, K. A., R. J. Reimer et D. M. Kingsley (2006). "Biochemical and genetic analysis of ANK in arthritis and bone disease." Am J Hum Genet **79**(6): 1017-29.
Hachicha, M., P. H. Naccache et S. R. McColl (1995). "Inflammatory microcrystals differentially regulate the secretion of macrophage inflammatory protein 1 and interleukin 8 by human neutrophils: a possible mechanism of neutrophil recruitment to sites of inflammation in synovitis." J Exp Med **182**(6): 2019-25.
Hakim, F. T., R. Cranley, K. S. Brown, E. D. Eanes, L. Harne et J. J. Oppenheim (1984). "Hereditary joint disorder in progressive ankylosis (ank/ank) mice. I. Association of calcium hydroxyapatite deposition with inflammatory arthropathy." Arthritis Rheum **27**(12): 1411-20.
Halverson, P. B., H. S. Cheung, D. J. McCarty, J. Garancis et N. Mandel (1981). ""Milwaukee shoulder"--association of microspheroids containing hydroxyapatite crystals, active collagenase, and neutral protease with rotator cuff defects. II. Synovial fluid studies." Arthritis Rheum **24**(3): 474-83.
Hanauske, A. R., O. Oberschmidt, H. Hanauske-Abel, M. M. Lahn et U. Eismann (2007). "Antitumor activity of enzastaurin (LY317615.HCl) against human cancer cell lines and freshly explanted tumors investigated in in-vitro [corrected] soft-agar cloning experiments." Invest New Drugs **25**(3): 205-10.
Harada, M., N. Udagawa, K. Fukasawa, B. Y. Hiraoka et M. Mogi (1986). "Inorganic pyrophosphatase activity of purified bovine pulp alkaline phosphatase at physiological pH." J Dent Res **65**(2): 125-7.
Harmey, D., L. Hessle, S. Narisawa, K. A. Johnson, R. Terkeltaub et J. L. Millan (2004). "Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1,

and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders." Am J Pathol **164**(4): 1199-209.

Hessle, L., K. A. Johnson, H. C. Anderson, S. Narisawa, A. Sali, J. W. Goding, R. Terkeltaub et J. L. Millan (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9445-9.

Hirose, J., L. M. Ryan et I. Masuda (2002). "Up-regulated expression of cartilage intermediate-layer protein and ANK in articular hyaline cartilage from patients with calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease." Arthritis Rheum **46**(12): 3218-29.

Hirota, Y., T. Tsukazaki, A. Yonekura, Y. Miyazaki, M. Osaki, H. Shindo et S. Yamashita (2000). "Activation of specific MEK-ERK cascade is necessary for TGFbeta signaling and crosstalk with PKA and PKC pathways in cultured rat articular chondrocytes." Osteoarthritis Cartilage **8**(4): 241-7.

Ho, A. M., M. D. Johnson et D. M. Kingsley (2000). "Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis." Science **289**(5477): 265-70.

Hoshi, K., N. Amizuka, K. Oda, Y. Ikehara et H. Ozawa (1997). "Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice." Histochem Cell Biol **107**(3): 183-91.

Huang, R., M. Rosenbach, R. Vaughn, D. Provvedini, N. Rebbe, S. Hickman, J. Goding et R. Terkeltaub (1994). "Expression of the murine plasma cell nucleotide pyrophosphohydrolase PC-1 is shared by human liver, bone, and cartilage cells. Regulation of PC-1 expression in osteosarcoma cells by transforming growth factor-beta." J Clin Invest **94**(2): 560-7.

Huaux, J. P., A. Geubel, M. C. Koch, J. Malghem, B. Maldague, J. P. Devogelaer et C. Nagant de Deuxchaisnes (1986). "The arthritis of hemochromatosis. A review of 25 cases with special reference to chondrocalcinosis, and a comparison with patients with primary hyperparathyroidism and controls." Clin Rheumatol **5**(3): 317-24.

Hughes, A. E., D. McGibbon, E. Woodward, J. Dixey et M. Doherty (1995). "Localisation of a gene for chondrocalcinosis to chromosome 5p." Hum Mol Genet **4**(7): 1225-8.

Hwang, S. G., J. H. Ryu, I. C. Kim, E. H. Jho, H. C. Jung, K. Kim, S. J. Kim et J. S. Chun (2004). "Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms." J Biol Chem **279**(25): 26597-604.

Johnson, K., S. Hashimoto, M. Lotz, K. Pritzker, J. Goding et R. Terkeltaub (2001). "Up-regulated expression of the phosphodiesterase nucleotide pyrophosphatase family member PC-1 is a marker and pathogenic factor for knee meniscal cartilage matrix calcification." Arthritis Rheum **44**(5): 1071-81.

Johnson, K., M. Polewski, D. van Etten et R. Terkeltaub (2005). "Chondrogenesis mediated by PPi depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1-/- mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(4): 686-91.

Johnson, K. et R. Terkeltaub (2004). "Upregulated ank expression in osteoarthritis can promote both chondrocyte MMP-13 expression and calcification via chondrocyte extracellular PPi excess." Osteoarthritis Cartilage **12**(4): 321-35.

Johnson, K., S. Vaingankar, Y. Chen, A. Moffa, M. B. Goldring, K. Sano, P. Jin-Hua, A. Sali, J. Goding et R. Terkeltaub (1999). "Differential mechanisms of inorganic pyrophosphate production by plasma cell membrane glycoprotein-1 and B10 in chondrocytes." Arthritis Rheum **42**(9): 1986-97.

Johnson, K. A., W. Yao, N. E. Lane, P. Naquet et R. A. Terkeltaub (2008). "Vanin-1 pantetheinase drives increased chondrogenic potential of mesenchymal precursors in ank/ank mice." Am J Pathol **172**(2): 440-53.

Jones, A. C., A. J. Chuck, E. A. Arie, D. J. Green et M. Doherty (1992). "Diseases associated with calcium pyrophosphate deposition disease." Semin Arthritis Rheum **22**(3): 188-202.

Kavanaugh, M. P. et D. Kabat (1996). "Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family." Kidney Int **49**(4): 959-63.

Kim-Lee, M. H., B. T. Stokes et A. J. Yates (1992). "Reperfusion paradox: a novel mode of glial cell injury." Glia **5**(1): 56-64.

Kirsch, T., H. J. Kim et J. A. Winkles (2009). "Progressive ankylosis gene (ank) regulates osteoblast differentiation." Cells Tissues Organs **189**(1-4): 158-62.

Kohn, N. N., R. E. Hughes, C. D. Mc, Jr. et J. S. Faires (1962). "The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the "pseudogout syndrome". II. Identification of crystals." Ann Intern Med **56**: 738-45.

Laskowska-Bozek, H., U. Bany, T. Burakowski, R. Janiak, B. Lewartowski et J. Ryzewski (1996). "Effect of cholinergic stimulation on free intracellular Ca2+ concentration in human lymphocytes." Neuroimmunomodulation **3**(4): 247-53.

Lawson, K. et P. Chatelain (1992). "Effects of the divalent cations nickel and cadmium on contractions of rat aorta to endothelin-1." J Auton Pharmacol **12**(4): 237-43.

Lazarowski, E. R., R. C. Boucher et T. K. Harden (2000). "Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations." J Biol Chem **275**(40): 31061-8.

Li, L., H. Yuan, W. Xie, J. Mao, A. M. Caruso, A. McMahon, D. J. Sussman et D. Wu (1999). "Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells." J Biol Chem **274**(1): 129-34.

Liu-Bryan, R. et F. Liote (2005). "Monosodium urate and calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals, inflammation, and cellular signaling." Joint Bone Spine **72**(4): 295-302.

Liu-Bryan, R., K. Pritzker, G. S. Firestein et R. Terkeltaub (2005). "TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation." J Immunol **174**(8): 5016-23.

Liu, R., M. O'Connell, K. Johnson, K. Pritzker, N. Mackman et R. Terkeltaub (2000). "Extracellular signal-regulated kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 2 mitogen-activated protein kinase signaling and activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB transcription factors play central roles in interleukin-8 expression stimulated by monosodium urate monohydrate and calcium pyrophosphate crystals in monocytic cells." Arthritis Rheum **43**(5): 1145-55.

Liu, Y. Z., A. P. Jackson et S. D. Cosgrove (2009). "Contribution of calcium-containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage.

Lotz, M., F. Rosen, G. McCabe, J. Quach, F. Blanco, J. Dudler, J. Solan, J. Goding, J. E. Seegmiller et R. Terkeltaub (1995). "Interleukin 1 beta suppresses transforming growth factor-induced inorganic pyrophosphate (PPi) production and expression of the PPi-generating enzyme PC-1 in human chondrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10364-8.

Martel-Pelletier, J., N. Alaaeddine et J. P. Pelletier (1999). "Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis." Front Biosci **4**: D694-703.

Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel et J. Tschopp (2006). "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." Nature **440**(7081): 237-41.

Masuda, I., A. Cardenal, W. Ono, J. Hamada, A. L. Haas et D. J. McCarty (1997). "Nucleotide pyrophosphohydrolase in human synovial fluid." J Rheumatol **24**(8): 1588-94.

Masuda, I. et J. Hirose (2002). "Animal models of pathologic calcification." Curr Opin Rheumatol **14**(3): 287-91.

Mc Carty, D., Jr., N. N. Kohn et J. S. Faires (1962). "The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the "pseudogout syndrome". I. Clinical aspects." Ann Intern Med **56**: 711–33.

McCarthy, G. M., J. A. Augustine, A. S. Baldwin, P. A. Christopherson, H. S. Cheung, P. R. Westfall et R. I. Scheinman (1998). "Molecular mechanism of basic calcium phosphate crystal-induced activation of human fibroblasts. Role of nuclear factor kappab, activator protein 1, and protein kinase c." J Biol Chem **273**(52): 35161-9.

McCarthy, G. M., P. G. Mitchell et H. S. Cheung (1991). "The mitogenic response to stimulation with basic calcium phosphate crystals is accompanied by induction and secretion of collagenase in human fibroblasts." Arthritis Rheum **34**(8): 1021-30.

McCarthy, G. M., P. G. Mitchell, J. A. Struve et H. S. Cheung (1992). "Basic calcium phosphate crystals cause coordinate induction and secretion of collagenase and stromelysin." J Cell Physiol **153**(1): 140-6.

McCarthy, G. M., P. R. Westfall, I. Masuda, P. A. Christopherson, H. S. Cheung et P. G. Mitchell (2001). "Basic calcium phosphate crystals activate human osteoarthritic synovial fibroblasts and induce matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in adult porcine articular chondrocytes." Ann Rheum Dis **60**(4): 399-406.

McCarty, D. J., P. B. Halverson, G. F. Carrera, B. J. Brewer et F. Kozin (1981). ""Milwaukee shoulder"--association of microspheroids containing hydroxyapatite crystals, active collagenase, and neutral protease with rotator cuff defects. I. Clinical aspects." Arthritis Rheum **24**(3): 464-73.

McCarty, D. J., Jr. et R. A. Gatter (1966). "Recurrent acute inflammation associated with focal apatite crystal deposition." Arthritis Rheum **9**(6): 804-19.

McCarty, D. J., J. R. Lehr et P. B. Halverson (1983). "Crystal populations in human synovial fluid. Identification of apatite, octacalcium phosphate, and tricalcium phosphate." Arthritis Rheum **26**(10): 1220-4.

McGill, P. E., A. T. Grange et C. S. Royston (1984). "Chondrocalcinosis in primary hyperparathyroidism. Influence of parathyroid activity and age." Scand J Rheumatol **13**(1): 56-8.

Miller, E. J. et W. G. Brelsford (1993). "Interleukin 8: the major neutrophil chemotaxin in a case of pseudogout." J Rheumatol **20**(7): 1250-2.

Mitchell, P. G., W. J. Pledger et H. S. Cheung (1989). "Molecular mechanism of basic calcium phosphate crystal-induced mitogenesis. Role of protein kinase C." J Biol Chem **264**(24): 14071-7.

Mitchell, P. G., J. A. Struve, G. M. McCarthy et H. S. Cheung (1992). "Basic calcium phosphate crystals stimulate cell proliferation and collagenase message accumulation in cultured adult articular chondrocytes." Arthritis Rheum **35**(3): 343-50.

Molenaar, M., M. van de Wetering, M. Oosterwegel, J. Peterson-Maduro, S. Godsave, V. Korinek, J. Roose, O. Destree et H. Clevers (1996). "XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in Xenopus embryos." Cell **86**(3): 391-9.

Molloy, E. S., M. P. Morgan, G. A. Doherty, B. McDonnell, M. Hilliard, J. O'Byrne, D. J. Fitzgerald et G. M. McCarthy (2008). "Mechanism of basic calcium phosphate crystal-stimulated cyclo-oxygenase-1 up-regulation in osteoarthritic synovial fibroblasts." Rheumatology (Oxford) **47**(7): 965-71.

Morgan, M. P., L. C. Whelan, J. D. Sallis, C. J. McCarthy, D. J. Fitzgerald et G. M. McCarthy (2004). "Basic calcium phosphate crystal-induced prostaglandin E2 production in human fibroblasts: role of cyclooxygenase 1, cyclooxygenase 2, and interleukin-1beta." Arthritis Rheum **50**(5): 1642-9.

Moustakas, A. et C. H. Heldin (2005). "Non-Smad TGF-beta signals." J Cell Sci **118**(Pt 16): 3573-84.

Moustakas, A., S. Souchelnytskyi et C. H. Heldin (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." J Cell Sci **114**(Pt 24): 4359-69.

Naccache, P. H., S. Bourgoin, E. Plante, C. J. Roberge, R. de Medicis, A. Lussier et P. E. Poubelle (1993). "Crystal-induced neutrophil activation. II. Evidence for the activation of a phosphatidylcholine-specific phospholipase D." Arthritis Rheum **36**(1): 117-25.

Naccache, P. H., M. Grimard, C. J. Roberge, C. Gilbert, A. Lussier, R. de Medicis et P. E. Poubelle (1991). "Crystal-induced neutrophil activation. I. Initiation and modulation of calcium mobilization and superoxide production by microcrystals." Arthritis Rheum **34**(3): 333-42.

Nair, D., R. P. Misra, J. D. Sallis et H. S. Cheung (1997). "Phosphocitrate inhibits a basic calcium phosphate and calcium pyrophosphate dihydrate crystal-induced mitogen-activated protein kinase cascade signal transduction pathway." J Biol Chem **272**(30): 18920-5.

Nakamura, Y., M. Nawata et S. Wakitani (2005). "Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders." Am J Pathol **167**(1): 97-105.

Nakatani, S., H. Mano, I. M. Ryanghyok, J. Shimizu et M. Wada (2006). "Excess magnesium inhibits excess calcium-induced matrix-mineralization and production of matrix gla protein (MGP) by ATDC5 cells." Biochem Biophys Res Commun **348**(3): 1157-62.

Neame, R. L., A. J. Carr, K. Muir et M. Doherty (2003). "UK community prevalence of knee chondrocalcinosis: evidence that correlation with osteoarthritis is through a shared association with osteophyte." Ann Rheum Dis **62**(6): 513-8.

Netter, P., D. Loeuille, J. Y. Jouzeau, P. Gillet, J. Peterschmitt, J. Pourel et A. Gaucher (2001). "[Familial articular chondrocalcinosis: study of an Alsatian family]." Bull Acad Natl Med **185**(2): 417-24; discussion 424-6.

Nikodijevic, B., D. Nikodijevic et P. Lazarovici (1992). "Pardaxin-stimulated calcium uptake in PC12 cells is blocked by cadmium and is not mediated by L-type calcium channels." J Basic Clin Physiol Pharmacol **3**(4): 359-70.

Nurnberg, P., H. Thiele, D. Chandler, W. Hohne, M. L. Cunningham, H. Ritter, G. Leschik, K. Uhlmann, C. Mischung, K. Harrop, J. Goldblatt, Z. U. Borochowitz, D. Kotzot, F. Westermann, S. Mundlos, H. S. Braun, N. Laing et S. Tinschert (2001). "Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia." Nat Genet **28**(1): 37-41.

Palmer, G., J. Guicheux, J. P. Bonjour et J. Caverzasio (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**(6): 2236-43.

Palmer, G., J. Zhao, J. Bonjour, W. Hofstetter et J. Caverzasio (1999). "In vivo expression of transcripts encoding the Glvr-1 phosphate transporter/retrovirus receptor during bone development." Bone **24**(1): 1-7.

Pattrick, M., E. Hamilton, J. Hornby et M. Doherty (1991). "Synovial fluid pyrophosphate and nucleoside triphosphate pyrophosphatase: comparison between normal and diseased and between inflamed and non-inflamed joints." Ann Rheum Dis **50**(4): 214-8.

Pawlotsky, Y., P. Le Dantec, R. Moirand, P. Guggenbuhl, A. M. Jouanolle, M. Catheline, J. Meadeb, P. Brissot, Y. Deugnier et G. Chales (1999). "Elevated parathyroid hormone

44-68 and osteoarticular changes in patients with genetic hemochromatosis." Arthritis Rheum **42**(4): 799-806.

Pendleton, A., M. D. Johnson, A. Hughes, K. A. Gurley, A. M. Ho, M. Doherty, J. Dixey, P. Gillet, D. Loeuille, R. McGrath, A. Reginato, R. Shiang, G. Wright, P. Netter, C. Williams et D. M. Kingsley (2002). "Mutations in ANKH cause chondrocalcinosis." Am J Hum Genet **71**(4): 933-40.

Poubelle, P. E., R. De Medicis et P. H. Naccache (1987). "Monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals differentially activate the excitation-response coupling sequence of human neutrophils." Biochem Biophys Res Commun **149**(2): 649-57.

Pouliot, M., M. J. James, S. R. McColl, P. H. Naccache et L. G. Cleland (1998). "Monosodium urate microcrystals induce cyclooxygenase-2 in human monocytes." Blood **91**(5): 1769-76.

Pritchard, M. H. et J. D. Jessop (1977). "Chondrocalcinosis in primary hyperparathyroidism. Influence of age, metabolic bone disease, and parathyroidectomy." Ann Rheum Dis **36**(2): 146-51.

Prudhommeaux, F., C. Schiltz, F. Liote, A. Hina, R. Champy, B. Bucki, E. Ortiz-Bravo, A. Meunier, C. Rey et T. Bardin (1996). "Variation in the inflammatory properties of basic calcium phosphate crystals according to crystal type." Arthritis Rheum **39**(8): 1319-26.

Qureshi, H. Y., J. Sylvester, M. El Mabrouk et M. Zafarullah (2005). "TGF-beta-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene in chondrocytes is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway and Sp1 transcription factor." J Cell Physiol **203**(2): 345-52.

Rees, J. A. et S. Y. Ali (1988). "Ultrastructural localisation of alkaline phosphatase activity in osteoarthritic human articular cartilage." Ann Rheum Dis **47**(9): 747-53.

Reuben, P. M., M. A. Brogley, Y. Sun et H. S. Cheung (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**(17): 15190-8.

Reuben, P. M., Y. Sun et H. S. Cheung (2004). "Basic calcium phosphate crystals activate p44/42 MAPK signal transduction pathway via protein kinase Cmicro in human fibroblasts." J Biol Chem **279**(34): 35719-25.

Reuben, P. M., L. Wenger, M. Cruz et H. S. Cheung (2001). "Induction of matrix metalloproteinase-8 in human fibroblasts by basic calcium phosphate and calcium pyrophosphate dihydrate crystals: effect of phosphocitrate." Connect Tissue Res **42**(1): 1-12.

Richette, P., G. Ayoub, T. Bardin, S. Bouvet, P. Orcel et A. M. Badran (2005). "Hypomagnesemia and chondrocalcinosis in short bowel syndrome." J Rheumatol **32**(12): 2434-6.

Richette, P., G. Ayoub, S. Lahalle, E. Vicaut, A. M. Badran, F. Joly, B. Messing et T. Bardin (2007). "Hypomagnesemia associated with chondrocalcinosis: a cross-sectional study." Arthritis Rheum **57**(8): 1496-501.

Roberge, C. J., R. de Medicis, J. M. Dayer, M. Rola-Pleszczynski, P. H. Naccache et P. E. Poubelle (1994). "Crystal-induced neutrophil activation. V. Differential production of biologically active IL-1 and IL-1 receptor antagonist." J Immunol **152**(11): 5485-94.

Roberge, C. J., M. Gaudry, R. de Medicis, A. Lussier, P. E. Poubelle et P. H. Naccache (1993). "Crystal-induced neutrophil activation. IV. Specific inhibition of tyrosine phosphorylation by colchicine." J Clin Invest **92**(4): 1722-9.

Rojas, K., L. Serrano de la Pena, T. Gallardo, A. Simmons, K. Nyce, R. McGrath, E. Considine, A. J. Vasko, E. Peterson, D. Grady, R. Cox, L. J. Andrew, M. Lovett, J.

Overhauser et C. J. Williams (1999). "Physical map and characterization of transcripts in the candidate interval for familial chondrocalcinosis at chromosome 5p15.1." Genomics **62**(2): 177-83.
Rosen, F., G. McCabe, J. Quach, J. Solan, R. Terkeltaub, J. E. Seegmiller et M. Lotz (1997). "Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation." Arthritis Rheum **40**(7): 1275-81.
Rosenthal, A. K., H. S. Cheung et L. M. Ryan (1991). "Transforming growth factor beta 1 stimulates inorganic pyrophosphate elaboration by porcine cartilage." Arthritis Rheum **34**(7): 904-11.
Rosenthal, A. K., B. A. McCarty, H. S. Cheung et L. M. Ryan (1993). "A comparison of the effect of transforming growth factor beta 1 on pyrophosphate elaboration from various articular tissues." Arthritis Rheum **36**(4): 539-42.
Rosenthal, A. K. et L. M. Ryan (1994). "Probenecid inhibits transforming growth factor-beta 1 induced pyrophosphate elaboration by chondrocytes." J Rheumatol **21**(5): 896-900.
Rothenberg, R. J. (1987). "Modulation of prostaglandin E2 synthesis in rabbit synoviocytes." Arthritis Rheum **30**(3): 266-74.
Rothenberg, R. J., D. England, N. Qureshi et K. Takayama (1988). "Stimulation of rabbit synoviocyte prostaglandin E2 synthesis by lipopolysaccharides and their subunit structures." Arthritis Rheum **31**(2): 238-47.
Rutsch, F., S. Vaingankar, K. Johnson, I. Goldfine, B. Maddux, P. Schauerte, H. Kalhoff, K. Sano, W. A. Boisvert, A. Superti-Furga et R. Terkeltaub (2001). "PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification." Am J Pathol **158**(2): 543-54.
Ryan, L. M. (2001). "The ank gene story." Arthritis Res **3**(2): 77-9.
Ryan, L. M. et D. J. McCarty (1997). "Calcium pyrophosphate crystal deposition disease, pseudogout, and articular chondrocalcinosis." In: Arthritis and Allied Conditions: A textbook of Rheumatology (13th ed.), edited by Koopman W. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.: 2103-2126.
Ryan, L. M., J. W. Rachow et D. J. McCarty (1991). "Synovial fluid ATP: a potential substrate for the production of inorganic pyrophosphate." J Rheumatol **18**(5): 716-20.
Rynes, R. I. et E. G. Merzig (1978). "Calcium pyrophosphate crystal deposition disease and hyperparathyroidism: a controlled, prospective study." J Rheumatol **5**(4): 460-8.
Ryu, J. H. et J. S. Chun (2006). "Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1beta regulation of type II collagen expression in articular chondrocytes." J Biol Chem **281**(31): 22039-47.
Ryu, J. H., S. J. Kim, S. H. Kim, C. D. Oh, S. G. Hwang, C. H. Chun, S. H. Oh, J. K. Seong, T. L. Huh et J. S. Chun (2002). "Regulation of the chondrocyte phenotype by beta-catenin." Development **129**(23): 5541-50.
Salaun, C., P. Rodrigues et J. M. Heard (2001). "Transmembrane topology of PiT-2, a phosphate transporter-retrovirus receptor." J Virol **75**(12): 5584-92.
Salvarani, C., F. Rossi, P. L. Macchioni, R. Baricchi, N. Capozzoli, S. Castellani, L. Ghirelli, M. Veneziani, L. Scarti et I. Portioli (1989). "Bartter's syndrome and chondrocalcinosis: a possible role for hypomagnesemia in the deposition of calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) crystals." Clin Exp Rheumatol **7**(4): 415-20.
Sampson, H. W. (1988a). "Spondyloarthropathy in progressive ankylosis (ank/ank) mice: morphological features." Spine (Phila Pa 1976) **13**(6): 645-9.
Sampson, H. W. (1988b). "Ultrastructure of the mineralizing metacarpophalangeal joint of progressive ankylosis (ank/ank) mice." Am J Anat **182**(3): 257-69.

Sanmarti, R., D. Panella, M. A. Brancos, J. Canela, A. Collado et J. Brugues (1993). "Prevalence of articular chondrocalcinosis in elderly subjects in a rural area of Catalonia." Ann Rheum Dis **52**(6): 418-22.

Schneider, S., H. Steinbeisser, R. M. Warga et P. Hausen (1996). "Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos." Mech Dev **57**(2): 191-8.

Schumacher, H. R., J. L. Miller, C. Ludivico et R. A. Jessar (1981). "Erosive arthritis associated with apatite crystal deposition." Arthritis Rheum **24**(1): 31-7.

Schumacher, H. R., A. P. Smolyo, R. L. Tse et K. Maurer (1977). "Arthritis associated with apatite crystals." Ann Intern Med **87**(4): 411-6.

Shao, Y., M. Alicknavitch et M. C. Farach-Carson (2005). "Expression of voltage sensitive calcium channel (VSCC) L-type Cav1.2 (alpha1C) and T-type Cav3.2 (alpha1H) subunits during mouse bone development." Dev Dyn **234**(1): 54-62.

Sheldahl, L. C., M. Park, C. C. Malbon et R. T. Moon (1999). "Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner." Curr Biol **9**(13): 695-8.

Sohn, P., M. Crowley, E. Slattery et R. Serra (2002). "Developmental and TGF-beta-mediated regulation of Ank mRNA expression in cartilage and bone." Osteoarthritis Cartilage **10**(6): 482-90.

Solomon, D. H., R. J. Wilkins, D. Meredith et J. A. Browning (2007). "Characterisation of inorganic phosphate transport in bovine articular chondrocytes." Cell Physiol Biochem **20**(1-4): 99-108.

Spedding, M. et R. Paoletti (1992). "Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function." Pharmacol Rev **44**(3): 363-76.

Sun, T. Q., B. Lu, J. J. Feng, C. Reinhard, Y. N. Jan, W. J. Fantl et L. T. Williams (2001). "PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling." Nat Cell Biol **3**(7): 628-36.

Sun, Y., L. Wenger, C. E. Brinckerhoff, R. R. Misra et H. S. Cheung (2002). "Basic calcium phosphate crystals induce matrix metalloproteinase-1 through the Ras/mitogen-activated protein kinase/c-Fos/AP-1/metalloproteinase 1 pathway. Involvement of transcription factor binding sites AP-1 and PEA-3." J Biol Chem **277**(2): 1544-52.

Sweet, H. O. et M. C. Green (1981). "Progressive ankylosis, a new skeletal mutation in the mouse." J Hered **72**(2): 87-93.

Sylvia, V. L., S. Mackey, Z. Schwartz, L. Schuman, R. Gomez et B. D. Boyan (1994). "Regulation of protein kinase C by transforming growth factor beta 1 in rat costochondral chondrocyte cultures." J Bone Miner Res **9**(9): 1477-87.

Sylvia, V. L., Z. Schwartz, D. D. Dean et B. D. Boyan (2000). "Transforming growth factor-beta1 regulation of resting zone chondrocytes is mediated by two separate but interacting pathways." Biochim Biophys Acta **1496**(2-3): 311-24.

Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet et X. He (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." Nature **407**(6803): 530-5.

Tenenbaum, J., O. Muniz, H. R. Schumacher, A. E. Good et D. S. Howell (1981). "Comparison of phosphohydrolase activities from articular cartilage in calcium pyrophosphate deposition disease and primary osteoarthritis." Arthritis Rheum **24**(3): 492-500.

Terkeltaub, R., C. Zachariae, D. Santoro, J. Martin, P. Peveri et K. Matsushima (1991). "Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation." Arthritis Rheum **34**(7): 894-903.

Terkeltaub, R. A. (1993). "Gout and mechanisms of crystal-induced inflammation." Curr Opin Rheumatol **5**(4): 510-6.
Topol, L., X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P. J. Carolan et Y. Yang (2003). "Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation." J Cell Biol **162**(5): 899-908.
Tudan, C., D. Fong, V. Duronio, H. M. Burt et J. K. Jackson (2000a). "The inhibition of spontaneous and tumor necrosis factor-alpha induced neutrophil apoptosis by crystals of calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate monohydrate." J Rheumatol **27**(10): 2463-72.
Tudan, C., J. K. Jackson, L. Blanis, S. L. Pelech et H. M. Burt (2000b). "Inhibition of TNF-alpha-induced neutrophil apoptosis by crystals of calcium pyrophosphate dihydrate is mediated by the extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways up-stream of caspase 3." J Immunol **165**(10): 5798-806.
Tudan, C., J. K. Jackson, L. Charlton, S. L. Pelech, B. Sahl et H. M. Burt (1998). "Activation of S6 kinase in human neutrophils by calcium pyrophosphate dihydrate crystals: protein kinase C-dependent and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathways." Biochem J **331 (Pt 2)**: 531-7.
van Amerongen, R., A. Mikels et R. Nusse (2008). "Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors." Sci Signal **1**(35): re9.
Virkki, L. V., J. Biber, H. Murer et I. C. Forster (2007). "Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families." Am J Physiol Renal Physiol **293**(3): F643-54.
Volpe, A., A. Guerriero, A. Marchetta, P. Caramaschi et L. Furlani (2009). "Familial hypocalciuric hypercalcemia revealed by chondrocalcinosis." Joint Bone Spine.
Wang, J., H. W. Tsui, F. Beier, K. P. Pritzker, R. D. Inman et F. W. Tsui (2008). "The ANKH DeltaE490Mutation in Calcium Pyrophosphate Dihydrate Crystal Deposition Disease (CPPDD) Affects Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) Activities." Open Rheumatol J **2**: 23-30.
Wang, J., H. W. Tsui, F. Beier et F. W. Tsui (2009). "The CPPDD-associated ANKH M48T mutation interrupts the interaction of ANKH with the sodium/phosphate cotransporter PiT-1." J Rheumatol **36**(6): 1265-72.
Wang, J., C. Wang, H. W. Tsui, F. Las Heras, E. Y. Cheng, N. N. Iscove, B. Chiu, R. D. Inman, K. P. Pritzker et F. W. Tsui (2007). "Microcytosis in ank/ank mice and the role of ANKH in promoting erythroid differentiation." Exp Cell Res **313**(20): 4120-9.
Wang, W., J. Xu, B. Du et T. Kirsch (2005). "Role of the progressive ankylosis gene (ank) in cartilage mineralization." Mol Cell Biol **25**(1): 312-23.
Wendling, D., L. Jeannin-Louys, P. Kremer, F. Fellmann, E. Toussirot et E. Mornet (2001). "Adult hypophosphatasia. Current aspects." Joint Bone Spine **68**(2): 120-4.
Williams, C. J., Y. Zhang, A. Timms, G. Bonavita, F. Caeiro, J. Broxholme, J. Cuthbertson, Y. Jones, R. Marchegiani, A. Reginato, R. G. Russell, B. P. Wordsworth, A. J. Carr et M. A. Brown (2002). "Autosomal dominant familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease is caused by mutation in the transmembrane protein ANKH." Am J Hum Genet **71**(4): 985-91.
Wirtz, S. et S. Herzig (2004). "Molecular mechanisms of vasoselectivity of the 1,4-dihydropyridine lercanidipine." Br J Pharmacol **142**(2): 275-84.
Wright, G. D. et M. Doherty (1997). "Calcium pyrophosphate crystal deposition is not always 'wear and tear' or aging." Ann Rheum Dis **56**(10): 586-8.
Xu, Y., K. P. Pritzker et T. F. Cruz (1994). "Characterization of chondrocyte alkaline phosphatase as a potential mediator in the dissolution of calcium pyrophosphate dihydrate crystals." J Rheumatol **21**(5): 912-9.

Yepes, M., E. Moore, S. A. Brown, H. N. Hanscom, E. P. Smith, D. A. Lawrence et J. A. Winkles (2003). "Progressive ankylosis (Ank) protein is expressed by neurons and Ank immunohistochemical reactivity is increased by limbic seizures." Lab Invest **83**(7): 1025-32.

Yonekura, A., M. Osaki, Y. Hirota, T. Tsukazaki, Y. Miyazaki, T. Matsumoto, A. Ohtsuru, H. Namba, H. Shindo et S. Yamashita (1999). "Transforming growth factor-beta stimulates articular chondrocyte cell growth through p44/42 MAP kinase (ERK) activation." Endocr J **46**(4): 545-53.

Zaka, R., A. S. Dion, A. Kusnierz, J. Bohensky, V. Srinivas, T. Freeman et C. J. Williams (2009). "Oxygen Tension Regulates the Expression of ANK (progressive ankylosis) in a Hif-1-Dependent Manner in Growth Plate Chondrocytes." J Bone Miner Res.

Zeng, L., F. Fagotto, T. Zhang, W. Hsu, T. J. Vasicek, W. L. Perry, 3rd, J. J. Lee, S. M. Tilghman, B. M. Gumbiner et F. Costantini (1997). "The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation." Cell **90**(1): 181-92.

Zhang, Y., K. Johnson, R. G. Russell, B. P. Wordsworth, A. J. Carr, R. A. Terkeltaub et M. A. Brown (2005). "Association of sporadic chondrocalcinosis with a -4-basepair G-to-A transition in the 5'-untranslated region of ANKH that promotes enhanced expression of ANKH protein and excess generation of extracellular inorganic pyrophosphate." Arthritis Rheum **52**(4): 1110-7.

Zhang, Y., R. Terkeltaub, M. Nevitt, L. Xu, T. Neogi, P. Aliabadi, J. Niu et D. T. Felson (2006). "Lower prevalence of chondrocalcinosis in Chinese subjects in Beijing than in white subjects in the United States: the Beijing Osteoarthritis Study." Arthritis Rheum **54**(11): 3508-12.

Zhao, Q., H. Eberspaecher, V. Lefebvre et B. De Crombrugghe (1997). "Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis." Dev Dyn **209**(4): 377-86.

Zitnan, D. et S. Sitaj (1957). "Calcification multiple du cartilage articulaire (étude clinique et radiologique). In: Ninth International Congress on Rheumatic Diseases. 1957 (Toronto)." Cesk Rentgenol **14**: 27-34.

Zuscik, M. J., T. E. Gunter, J. E. Puzas et R. N. Rosier (1997). "Characterization of voltage-sensitive calcium channels in growth plate chondrocytes." Biochem Biophys Res Commun **234**(2): 432-8.

« Contribution of the *Ank* gene in the PPi/Pi balance and in the maintenance of the articular chondrocyte phenotype »

Articular chondrocalcinosis (CCA) are microcrystalline arthtopathies characterized by the presence of calcium pyrophosphate dihydrate crystals (CPPD) in the synovial fluid, cartilage and periarticular tissues. There are 3 forms of CCA, including the familal forms, rares and dependent upon an autosomal dominant transmission mechanism, the sporadic forms, that are the most frequents, which probability of occurrence increase with ageing, and the metabolic forms, secondary to other pathologies like hyperparathyroidism (often coupled with hypercalcaemia). The *Ank* gene encodes a transporter which function is to export inorganic pyrophosphate (PPi) outside the cells. A link is well established between "gain of function" mutations in the coding sequence of the *Ank* gene and the familial forms of CCA. Just like the microcrystalline arthropathies, otseoarthritis (OA) is defined by the depletion in articular cartilage. Another phenomenon takes place in the course of OA: the chondrocyte dedifferentiation, also known as the loss of characteristic hallmarks of the articular chondrocyte phenotype. Usually, this phenotype is defined by a high expression level of specific genes coding the extracellular matrix (ECM) (aggrecan, type II collagen), or coding regulators of these genes (Sox-9). It is clearly established that the Wingless and Integration site (Wnt) protein family is implicated in OA. Interleukin-1β (IL-1β), the main cytokine implicated in the ECM degradation in the OA process, is also described as a potent inducer of some Wnt proteins expression, but also as a strong inhibitor of PPi generation by articular chondrocytes.

The aim of this work was to study, on one hand, the contribution of the *Ank* gene in the production of PPi by articular chondrocytes stimulated with transforming growth factor-β1 (TGF-β1), since the sensitivity of chondrocytes to this growth factor increases with ageing, along with the amplitude of responsivity of the cells to this stimulus. On the other hand, since CPPD are often associated with OA, and since *Ank* expression is finely regulated during chondrogenesis I wanted to study the possible implication of Ank in the phenomenon of the articular chondrocytes loss, similar to those observed in OA. Finally, I studied the role of the calcium on the TGF-β1 effects on ePPi production, in the field of metabolic CCA.

I first studied, with RNA interference, selective chemicals inhibitors and transfection of constitutively active forms and dominant negative, that ANK was the main contributor to the PPi generation induced by TGF-β1, and that this induction of *Ank* expression was dependent on Ras/Raf-1/ERK 1/2 as well as Ca^{2+}-dependant PKC. We also showed, using reporter plasmid and transient *Ank* invalidation, that ANK and the exported PPi preserve the phenotype of articular chondrocytes in a negative control phenomenon upon Wnt-5a expression. Finally, we demonstrated with voltage-operated channels blockers and modulators of intracellular calcium concentration, the high influence of calcium on the stimulating effects of TGF-β1 on *Ank* induction and ePPi production.

The study of the contribution of the *Ank* gene in the PPi/Pi balance and in the maintenance of articular chondrocyte allowed demonstrating, on one hand, the predominant role of this transporter in the situations of chondrocytic hypersensitivity to TGF-β1 in the field of sporadic CCA, thus opening possible therapeutic research opportunities. On the other hand, the influence of ANK on the expression of articular chondrocytic markers, and thus in the quality of the ECM, highlights an original role for ANK, but also for PPi, and opens a new research insights in the field of OA. Finally, this work put in light a possible implication of the Ank gene in the metabolic forms of CCA associated with the hypercalcaemia found in hyperparathyroidism.

Keywords: Chondrocalcinosis, phenotype, chondrocyte, *Ank*, Wnt, inorganic pyrophosphate

« Contribution du gène *Ank* dans la balance PPi/Pi et dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire »

Résumé des travaux de Frédéric CAILOTTO :

Les chondrocalcinoses articulaires (CCA) sont des arthropathies microcristallines se caractérisant par la présence de cristaux de pyrophosphate de calcium dihydratés (PPCD) au sein du liquide synovial, du cartilage et des tissus périarticulaires. Il existe trois formes de CCA : les formes familiales, rares et se transmettant de façon autosomique dominante, et les formes sporadiques, les plus fréquentes et dont la probabilité d'apparition augmente avec l'âge, et les formes secondaires à d'autres pathologies, comme l'hyperparathyroïdie (souvent conjointe à une hypercalcémie). Le gène *Ank* code un transporteur dont la fonction est d'exporter le pyrophosphate inorganique (PPi) hors des cellules. Un lien est clairement établi entre des mutations « gain de fonction » dans la séquence codante du gène *Ank* et les formes familiales de CCA. Tout comme les arthropathies microcristallines, l'arthrose se caractérise également par une dégénérescence du cartilage articulaire. Un autre phénomène se produit lors de la mise en place de cette pathologie : il s'agit de la dédifférenciation, autrement dit la perte des marqueurs caractéristiques du phénotype des chondrocytes articulaires. Habituellement, ce dernier est défini par un niveau d'expression élevé de gènes spécifiques codant la matrice extracellulaire (MEC) (agrécane, collagène de type II) ou codant des régulateurs de l'expression des ces molécules (Sox-9). Il est clairement établi que les protéines Wingless and Integration site (Wnt) sont impliquées dans l'arthrose. L'interleukine-1β (IL-1β), principale cytokine induisant la dégradation du cartilage, est également décrite comme induisant l'expression de certaines Wnt, mais également comme inhibant la production de PPi par les chondrocytes articulaires.

Le but de ce travail a été d'étudier la contribution du gène *Ank* dans la production de PPi par les chondrocytes articulaires stimulés avec du transforming growth factor-β1 (TGF-β1), puisque la sensibilité et l'amplitude de réponse des chondrocytes a ce facteur de croissance augmente avec le l'âge des patients. Nous avons également, au vu du rôle d'ANK dans l'export de PPi, du fait de l'association fréquente des cristaux de PPCD avec l'arthrose et de la régulation fine du niveau d'expression d'*Ank* lors de la chondrogenèse, voulu étudier l'implication éventuelle d'*Ank* dans des phénomènes de perte du phénotype du chondrocyte articulaire similaires aux processus se produisant lors de l'arthrose. Enfin, nous avons étudié le rôle du calcium sur les effets du TGF-β1 dans la production d'ePPi, dans le cadre de l'association des CCA secondaires avec les hypercalcémies.

Nous avons d'abord démontré, par des approches d'invalidation par ARN interférence, de stimulation des cellules à l'aide d'inhibiteurs chimiques sélectifs et de transfection de formes constitutivement actives et de dominants négatifs, qu'ANK était la protéine responsable de la majorité de la génération d'ePPi induite par le TGF-β1, et que l'augmentation de l'expression d'Ank par ce facteur de croissance dépend essentiellement de l'activation de la voie de signalisation Ras/Raf-1/ERK 1/2 ainsi que des PKC Ca^{2+}-dépendantes. Nous avons également mis en évidence, en utilisant des méthodes de plasmides rapporteurs et d'invalidation transitoire d'*Ank*, le fait qu'ANK et le PPi qu'elle exporte préservent le phénotype du chondrocyte articulaire par un phénomène de contrôle négatif exercé sur l'expression de Wnt-5a. Enfin, nous avons mis en évidence la très grande influence du calcium sur les effets inducteurs du TGF-β1 dans la génération d'ePPi dépendante d'ANK.

L'étude de la contribution du gène *Ank* dans la balance PPi/Pi et dans le maintien du phénotype du chondrocyte articulaire a permis de mettre en évidence le rôle majoritaire de ce transporteur dans des situations d'augmentation de sensibilité chondrocytaire au TGF-β1, dans le cadre des CCA sporadiques, ouvrant ainsi des perspectives de pistes thérapeutiques à plus long terme. Par ailleurs, ANK influence l'expression des marqueurs du phénotype du chondrocyte articulaire, et donc la qualité de synthèse de la MEC du cartilage. Cela met en lumière un rôle original de ce transporteur, mais également du PPi qu'il exporte, et propose une nouvelle voie de recherche dans l'arthrose, concernant l'influence de cet ion sur l'homéostasie du cartilage. Enfin, ce travail a mis en évidence le rôle crucial du calcium sur les effets inducteurs du TGF-β1 dans la production d'ePPi, ce qui pourrait expliciter une partie du mécanisme d'apparition de CCA secondaires aux hypercalcémies.

Mots clés : *Ank,* Chondrocalcinose, phénotype, chondrocyte, Wnt, pyrophosphate inorganique