

Université de Montréal

Étude moléculaire et cytochimique des métalloendopeptidases PHEX
et NEP dans le tissu osseux chez la souris grise *Mus musculus* et son
mutant *Hyp*.

Par

Andréa Araujo Frota Ruchon

Programme de sciences biomédicales

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en sciences biomédicales



Avril 2000

© Andréa Araujo Frota Ruchon, 2000

W
4
U58
2000
V.034

U.S. STATE DEPARTMENT

UNITED STATES DEPARTMENT OF STATE

OFFICE OF THE ASSISTANT SECRETARY FOR PUBLIC AFFAIRS

Washington, D.C.

1970

UNITED STATES DEPARTMENT OF STATE

OFFICE OF THE ASSISTANT SECRETARY FOR PUBLIC AFFAIRS

WASHINGTON, D.C.

UNITED STATES DEPARTMENT OF STATE

OFFICE OF THE ASSISTANT SECRETARY FOR PUBLIC AFFAIRS

WASHINGTON, D.C.

UNITED STATES DEPARTMENT OF STATE



UNITED STATES DEPARTMENT OF STATE

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude moléculaire et cytochimique des métalloendopeptidases PHEX
et NEP dans le tissu osseux chez la souris grise *Mus musculus* et son
mutant *Hyp*.

Présentée par

Andréa Araujo Frota Ruchon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| Daniel Lajeunesse | président-rapporteur |
| Guy Boileau | directeur de recherche |
| Mieczyslaw Marcinkiewicz | codirecteur de recherche |
| Louis-Georges Ste-Marie | membre du jury |
| Robert Day | examineur externe |
| Pierre D'Amour | représentant du doyen |

Thèse acceptée le: 27 juin 2000

SOMMAIRE

Le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X (HYP, XLH, aussi connu comme rachitisme résistant à la vitamine D) est la forme la plus fréquente de plusieurs désordres Mendéliens de l'homéostasie du phosphate inorganique (Pi) (McKusick, 1994). Elle est caractérisée par un retard de croissance associé à un rachitisme et/ou une ostéomalacie, par une hypophosphatémie importante due à une perte rénale de Pi et par des altérations du métabolisme de la vitamine D (révisé par Rasmussen et Tenenhouse, 1995; et par Tenenhouse, 1999). Transmise d'une façon dominante, sa fréquence est de 1:20000 naissances chez l'homme. Le gène responsable de XLH a été récemment identifié et nommé *PHEX* pour "Phosphate regulating gene with homology to Endopeptidases on the X chromosome" (The HYP Consortium, 1995). Beaucoup de nos connaissances actuelles sur la pathophysiologie de XLH ont été dérivées d'études utilisant les homologues murines de la maladie humaine, les souris Hyp (Eicher *et al.*, 1976) et Gy (Lyon *et al.*, 1986), qui portent des délétions importantes au niveau du gène *Phex*.

La partie de la séquence humaine du gène *PHEX* publiée par le consortium HYP (1995) prévoit une protéine membranaire qui présente des homologies de 50% à 60% avec les membres de la famille des métalloendopeptidases à zinc, dont la Neprilysine (NEP) est le prototype. Après la constatation de cette homologie importante, nous nous sommes intéressés à étudier *PHEX*. Nous avons entrepris des études de localisation de ses ARNm et de son ontogenèse par hybridation *in situ* (ISH) dans des coupes histologiques de souris. Les résultats ont démontré la présence des ARNm de *Phex* dans les os des embryons à partir du jour embryonnaire 15 (e15), coïncidant avec la déposition de la matrice osseuse. L'examen microscopique a montré la présence des ARNm de *Phex* dans les ostéoblastes du squelette en formation et dans les odontoblastes des dents en développement. À la suite de l'ISH nous avons procédé à l'hybridation à la Northern de tissu osseux et dentaire de souris nouveau-nées et adultes. Dans ces tissus, un

d'environ 7 kb a été détecté alors que les tissus contrôles (poumon, foie, thymus, cerveau) ont été tous négatifs.

L'évidence de l'expression de Phex préférentiellement dans l'os nous a conduit à étudier ce tissu. En conséquence, l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse, porte sur les études de localisation des endopeptidases Phex et Nep dans le tissu osseux chez la souris normale et son mutant *Hyp*.

Après avoir déterminé la distribution des ARNm de Phex, nous avons étudié l'expression de la protéine. En utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre PHEX humaine, nous avons montré sa présence dans des extraits tissulaires d'os et de dents et, à l'échelle cellulaire, à la surface des ostéoblastes, ostéocytes et odontoblastes, de même que son absence dans les cellules moins différenciées de la lignée ostéoblastique (préostéoblastes et précurseurs). En outre, nous rapportons le déclin de l'expression de la protéine Phex avec l'âge, ce qui suggère une corrélation entre la présence de Phex et la croissance des os et des dents. Ensuite, nous vérifions l'expression de Phex, Nep, ostéocalcine et du récepteur de PTH/PTHrP chez la souris *Hyp*.

Étudier le patron d'expression de NEP dans le tissu osseux, surtout au niveau des cellules ostéoblastiques, a été l'autre de nos objectifs. Malgré l'indication de la présence de NEP, ou d'une autre enzyme apparentée à la NEP, dans les tissus squelettiques (Dutriez *et al.*, 1991), ni sa localisation cellulaire ni sa fonction n'avaient été établies. Nos résultats démontrent que la NEP est présente dans toutes les cellules de la lignée ostéoblastique, des précurseurs jusqu'aux ostéocytes. En plus, nous montrons que plusieurs peptides ostéogéniques synthétiques comme le PTHrP₁₋₃₄ ("parathyroid hormone-related peptide"₁₋₃₄), l'ostéostatine (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉), l'OGP ("osteogenic growth peptide"), la calcitonine et le α -CGRP (" α -calcitonin gene-related peptide"), sont des substrats de NEP *in vitro*.

L'identification relativement récente des différents membres de la famille des endopeptidases, nous a laissé supposer l'existence d'autres, encore inconnus. Les membres de cette famille possèdent, en général, des fonctions biologiques importantes au niveau du fonctionnement de l'organisme et sont identifiés comme des cibles potentielles pour le "design" d'agents thérapeutiques. Cela rend l'hypothèse de l'existence d'autres enzymes semblables très intéressante et méritant d'être investiguée. En conséquence, une stratégie de RT-PCR, dont l'objectif était de trouver d'autres enzymes apparentées à la NEP, a été conçue, testée avec des ARNm des testicules de souris adulte, et a abouti à la découverte d'un nouveau membre de la famille de la NEP, appelé NL1 pour "NEP-like 1". L'ensemble des études rapportant le clonage de son ADNc complet, sa caractérisation biochimique et enzymatique, ainsi que sa distribution tissulaire et cellulaire, complète les travaux présentés dans cette thèse.

Mots clés:

Rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X (XLH, HYP), tissu osseux, ostéoblaste, ostéocyte, odontoblaste, neprilysin, peptidases.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|-----------------------------|-------|
| Sommaire | iii |
| Table des matières | vi |
| Liste des tableaux | xiii |
| Liste des figures..... | xiv |
| Liste des abréviations..... | xviii |
| Dédicace..... | xx |
| Remerciements | xxi |

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION1

I. REVUE DE LA LITTÉRATURE2

A) Le système peptidergique et les protéases/peptidases2

A.1) Les métalloprotéases/peptidases à zinc3

A.1.1) Classification des métalloprotéases/peptidases à zinc.....3

A.1.2) Les métallopeptidases de la famille de la Neprilysine6

A.1.2.1) Neprilysine (NEP, “neutral endopeptidase” 24.11, enkephalinase et CALLA ou CD10)8

| | | |
|-----------------|--|-----------|
| A.1.2.1.1) | Structure primaire, topologie et glycosylation | 8 |
| A.1.2.1.2) | Organisation génique | 9 |
| A.1.2.1.3) | Distribution tissulaire..... | 9 |
| A.1.2.1.4) | Substrats et fonctions physiologique | 11 |
| A.1.2.1.4.1) | Le contrôle de la transmission du message nociceptif | 11 |
| A.1.2.1.4.2) | la manutention de l'équilibre hydro-électrolytique et de la tension artérielle | 13 |
| A.1.2.1.4.3) | Le contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaires..... | 13 |
| A.1.2.1.4.4) | Le contrôle de l'inflammation | 14 |
| A.1.2.2) | PHEX | 15 |
| A.1.2.2.1) | Structure génique..... | 15 |
| A.1.2.2.2) | Structure primaire, topologie et glycosylation..... | 16 |
| A.1.2.2.3) | Distribution tissulaire | 20 |
| A.1.2.2.4) | Substrats et fonctions physiologiques potentielles | 21 |
| | | |
| B) | L'homéostasie du phosphate et les désordres cliniques du transport de phosphate | 26 |
| | | |
| B.1) | L'homéostasie du phosphate | 26 |
| B.1.1) | L'absorption intestinale de phosphate..... | 28 |
| B.1.2) | Le transport rénal de phosphate | 28 |

| | |
|---|----|
| B.1.2.1) Mécanismes cellulaires de transport de phosphate | 29 |
| B.1.2.1.1) Variétés moléculaires des transporteurs de Pi | 30 |
| B.1.2.1.1.1) Le transporteur NaPi Type I..... | 30 |
| B.1.2.1.1.2) Le transporteur NaPi Type II..... | 31 |
| B.1.2.1.1.3) Le transporteur NaPi Type III | 34 |
| B.2) Les désordres cliniques du transport de phosphate | 35 |
| B.2.1) Le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X | 36 |
| B.2.1.1) Aspects cliniques et biochimiques de XLH..... | 36 |
| B.2.1.2) La pathogénèse et les modèles animaux de XLH | 38 |
| B.2.1.2.1) XLH/Hyp et le transport de phosphate..... | 39 |
| B.2.1.2.2) XLH/Hyp et les défauts de minéralisation | 41 |
| B.2.1.2.3) XLH/Hyp et le métabolisme de la vitamine D..... | 42 |
| B.2.2) Le rachitisme héréditaire autosomique avec Hypercalciurie | 43 |
| B.2.2.1) Aspects cliniques et biochimiques de HHRH/TH | 43 |
| B.2.2.2) La pathogénèse de HHRH/TH | 44 |
| B.2.3) L'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique | 45 |
| B.2.3.1) Aspects cliniques et biochimiques de l'OHO | 45 |
| B.2.3.2) La pathogénèse de l'OHO..... | 46 |
| | |
| (C) Le tissu osseux | 48 |
| C.1) Organisation du tissu osseux | 48 |
| C.2) Histogénèse du tissu osseux | 50 |

| | |
|--|----|
| C.2.1) Ossification primaire | 50 |
| C.2.1.1) Ossification intraconjonctive périostique | 50 |
| C.2.1.2) Ossification intraconjonctive intramembranaire | 50 |
| C.2.1.3) Ossification endochondrale | 50 |
| C.2.2) Ossification secondaire | 51 |
| C.3) Les cellules du tissu osseux | 51 |
| C 3.1) La lignée ostéoblastique | 51 |
| C.3.1.1) Embryologie de la lignée ostéoblastique | 53 |
| C.3.1.2) Les cellules de la lignée ostéoblastique | 54 |
| C.3.2) Les ostéoclastes | 56 |
| C.3.2.1) L'embryologie des ostéoclastes | 56 |
| C.3.2.2) Mécanisme d'action des ostéoclastes | 57 |
| C.3.3) Régulateurs de la fonction des cellules osseuses | 57 |
| C.4) La matrice osseuse | 58 |
| C.4.1) Les protéines de la matrice osseuse | 58 |
| C.4.1.1) Le collagène | 58 |
| C.4.1.2) Les protéines non-collagéniques | 59 |
| C.4.1.2.1) La phosphatase alcaline | 59 |
| C.4.1.2.2) L'ostéocalcine | 60 |
| II) OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE | 61 |

CHAPITRE 2 - ARTICLE 63

Pex mRNA is Localized in Developing Mouse Osteoblasts and Odontoblasts

| | |
|------------------------------------|----|
| Sommaire | 64 |
| <i>Title Page</i> | 65 |
| <i>Summary</i> | 65 |
| <i>Introduction</i> | 65 |
| <i>Materials and Methods</i> | 66 |
| <i>Results</i> | 69 |
| <i>Discussion</i> | 71 |
| <i>Acknowledgements</i> | 74 |
| <i>Literature Cited</i> | 74 |

CHAPITRE 3 - ARTICLE 75

*Pex Protein in Murine Osteoblasts, Osteocytes and Odontoblasts: Absence of
Expression in X - Linked Hyp Mice.*

| | |
|------------------------------------|-----|
| Sommaire | 76 |
| <i>Title Page</i> | 77 |
| <i>Abstract</i> | 78 |
| <i>Introduction</i> | 79 |
| <i>Materials and Methods</i> | 81 |
| <i>Results</i> | 86 |
| <i>Discussion</i> | 90 |
| <i>Acknowledgements</i> | 94 |
| <i>References</i> | 95 |
| <i>Figures</i> | 101 |

CHAPITRE 4 - ARTICLE 111

Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides

| | |
|------------------------------------|-----|
| Sommaire | 112 |
| <i>Title Page</i> | 113 |
| <i>Abstract</i> | 114 |
| <i>Introduction</i> | 115 |
| <i>Materials and Methods</i> | 117 |
| <i>Results</i> | 120 |
| <i>Discussion</i> | 124 |
| <i>Acknowledgements</i> | 128 |
| <i>References</i> | 129 |
| <i>Tableau</i> | 135 |
| <i>Figures</i> | 136 |

CHAPITRE 5 – ARTICLE 141

Molecular cloning, distribution and biochemical characterization of a new mouse testis soluble zinc-metalloproteinase (NL1) of the neprilysin family

| | |
|------------------------------------|-----|
| Sommaire | 142 |
| <i>Title Page</i> | 143 |
| <i>Abstract</i> | 144 |
| <i>Introduction</i> | 145 |
| <i>Materials and Methods</i> | 147 |
| <i>Results</i> | 152 |
| <i>Discussion</i> | 157 |
| <i>Acknowledgements</i> | 162 |
| <i>References</i> | 163 |
| <i>Tableaux</i> | 168 |
| <i>Figures</i> | 170 |

| | |
|---|-----|
| CHAPITRE 6 – DISCUSSION | 183 |
| 6.1) PHEX | 183 |
| 6.1.1) Sites d'expression physiologique..... | 183 |
| 6.1.2) Phex et les souris Hyp..... | 185 |
| 6.1.3) Phex et la minéralisation osseuse..... | 185 |
| 6.1.4) Phex et les marqueurs tardifs de différenciation ostéoblastique..... | 186 |
| 6.1.5) Corrélation entre PHEX et NEP..... | 188 |
| 6.1.6) Le contrôle de l'expression de PHEX..... | 189 |
| 6.1.7) PHEX et la réabsorption de Pi..... | 189 |
| 6.2) NEP | 191 |
| 6.2.1) Sites d'expression physiologique..... | 191 |
| 6.2.2) La NEP dans les os..... | 192 |
| 6.2.3) Substrats peptidiques présents dans l'os..... | 192 |
| 6.3) NL1 | 193 |
| 6.4) Perspectives d'études futures | 194 |
| 6.4.1) PHEX..... | 194 |
| 6.4.2) NEP..... | 195 |
| 6.4.3) Recherche d'autres membres de la famille de la NEP dans l'os..... | 195 |
| 6.5) Conclusion | 195 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 197 |

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1:

| | | |
|--------------|---|----|
| Tableau I. | Principaux sites d'expression de la NEP | 10 |
| Tableau II. | Principaux substrats de la NEP..... | 12 |
| Tableau III. | Comparaison entre les formes de rachitisme/ostéomalacie héréditaires et l'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique..... | 37 |

CHAPITRE 4:

| | | |
|-----------------|--|------------|
| <i>Table 1.</i> | <i>Amino acid sequence of osteogenic peptides hydrolyzed by NEP.....</i> | <i>135</i> |
|-----------------|--|------------|

CHAPITRE 5:

| | | |
|-----------------|--|------------|
| <i>Table 1.</i> | <i>Comparison of NL1 with other members of the neprilysin family.....</i> | <i>168</i> |
| <i>Table 2.</i> | <i>Comparison of NL1 and sNEP enzymatic parameters with D-Ala₂-Leu₅- enkephalin.....</i> | <i>169</i> |

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1:

- Figure 1 Classification des métalloprotéases/peptidases à zinc (Hooper, 1994) ...5
- Figure 2 Représentation schématique des membres de la famille de la NEP7
- Figure 3 Comparaison entre les gènes PHEX et NEP (Francis *et al.*, 1997)17
- Figure 4 Représentation schématique du gène et de la protéine PHEX (Tenenhouse, 1999)19
- Figure 5 Mécanisme d'action hypothétique de PHEX et la pathogenèse de XLH/HYP et d'OHO (Nelson *et al.*, 1997)22
- Figure 6 Représentation schématique du mécanisme d'action hypothétique de PHEX au niveau des os et de ses substrats peptidiques circulants (Tenenhouse, 1999)24
- Figure 7 Représentation schématique du cotransporteur NaPi Type II (NaPi-2, rat; Murer *et al.*, 1998)33
- Figure 8 Anatomie macroscopique d'un os long humain (Tibia; White et Folkens, 1991)49
- Figure 9 Représentation schématique de l'histologie d'une trabécule osseuse pendant le processus d'ossification intramembranaire52

| | |
|--|----|
| Figure 10 Représentation schématique de la différenciation des ostéoblastes (Aubin <i>et al.</i> , 1995)..... | 55 |
|--|----|

CHAPITRE 2:

| | |
|---|-----------|
| <i>Figure 1 Emulsion autoradiography showing ISH pattern for Pex mRNA at the anatomic level in sagittal section from a mouse embryo at e16.....</i> | <i>66</i> |
| <i>Figure 2 Sites of Pex mRNA expression in primordium of mandibular bone and vertebrae at day e16, and incisor at e19</i> | <i>67</i> |
| <i>Figure 3 Sites of Pex mRNA expression in developing mouse calvaria on e14, e15, e16, e19 and p3.....</i> | <i>68</i> |
| <i>Figure 4 Sites of Pex mRNA expression in mandible bone on e14, e15, e16, e19 and p3</i> | <i>70</i> |
| <i>Figure 5. Pex mRNA present in developing teeth and mandibular bone in e19 mouse</i> | <i>72</i> |
| <i>Figure 6. Northern blot analysis of Pex mRNA levels</i> | <i>73</i> |

CHAPITRE 3:

| | |
|--|------------|
| <i>Figure 1. Immunoblotting of recombinant and endogenous PHEX/Phex.....</i> | <i>101</i> |
| <i>Figure 2. Immunocytochemical distribution of Phex in bones and teeth of 4-day normal and Hyp mice</i> | <i>102</i> |

| | |
|---|------------|
| <i>Figure 3. Phex immunoreactivity in trabeculae of bone of mandible of a 4-day mouse at high cellular resolution</i> | <i>104</i> |
| <i>Figure 4. ISH comparison of Phex mRNA levels in normal (+/Y) and Hyp (Hyp/Y) P4 mice</i> | <i>105</i> |
| <i>Figure 5. Ribonuclease protection assay of RNA from P4 mouse Calvaria</i> | <i>106</i> |
| <i>Figure 6. Phex protein in normal and Hyp mice.....</i> | <i>108</i> |
| <i>Figure 7. Immunoblotting of NEP in calvaria, kidney and liver protein extracts of normal (+) and Hyp P4 mice.....</i> | <i>109</i> |
| <i>Figure 8. ISH of osteocalcin and PTH/PTHrP receptor mRNA in embryonic (E17) and postnatal (P4) normal (+/Y) and Hyp (Hyp/Y) mice</i> | <i>110</i> |

CHAPITRE 4:

| | |
|--|------------|
| <i>Figure 1. NEP mRNA distribution in a 4-day old mouse observed by in situ hybridization.....</i> | <i>136</i> |
| <i>Figure 2. Immunoblotting of recombinant and endogenous NEP.....</i> | <i>137</i> |
| <i>Figure 3. Distribution of NEP immunoreactivity in bones of 4-day old mouse ..</i> | <i>138</i> |
| <i>Figure 4. Degradation of bone-related peptides by purified NEP.....</i> | <i>140</i> |

CHAPITRE 5:

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 1. Partial amino acid sequence alignment of human NEP, ECE-1 and PHEX.....</i> | 170 |
| <i>Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of NL1 cDNA cloned from mouse testis</i> | 171 |
| <i>Figure 3. Amino acid sequence comparison of NL1 and NEP.....</i> | 173 |
| <i>Figure 4. Immunoblot analysis of NL1-transfected HEK 293 cells</i> | 175 |
| <i>Figure 5. Analysis of NL1 processing in HEK 293 cells.....</i> | 176 |
| <i>Figure 6. NL1 enzymatic activity</i> | 177 |
| <i>Figure 7. HPLC analysis of degradation products of Leu⁵-enkephalin.....</i> | 179 |
| <i>Figure 8. Tissue distribution of mouse NL1 mRNA by Northern blot and RT-PCR analysis.....</i> | 181 |
| <i>Figure 9. NL1 mRNA distribution in adult mouse testis observed by in situ hybridization.....</i> | 182 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ACE - "Angiotensin-converting enzyme"
ADNc - Acide désoxyribonucléique complémentaire
ANP - "Atrial natriuretic peptide"
BLP - "Bombesin-like peptide"
BMP - "Bone morphogenetic proteins"
BNP - "Brain natriuretic peptide"
CALLA - "Common acute lymphoblastic leukemia antigen"
CD10 - "Cluster differentiation 10"
CGRP - "Calcitonin gene related peptide"
CRM - "Cross reacting material"
CT - Calcitonine.
ECE - L'enzyme de conversion de l'endothéline.
EGF - "Epithelial growth factor"
ELISA - "Enzyme-linked adsorbent assay"
EST - "Express sequence tag"
FGF - "Fibroblast growth factor"
GH - "Growth hormone"
Gy - Gyro mouse
Glv-1 - Récepteur du virus B de la leucémie féline et du singe gibbon.
HCl - Acide chlorhydrique
HHRH - Rachitisme héréditaire autosomique avec hypercalciurie.
HYP/Hyp - Hypophosphatémique, chez l'homme/souris
IGF - "Insulin growth factor"
IH - Hypercalciurie idiopathique.
ISH - "*In situ* hybridization".
kDa - Kilodalton
M-CSF - "Macrophage - colony stimulating factor"
NB - "Northern blot"

- NEP - "Neutral endopeptidase 24.11"
- NL1 - "NEP-like 1"
- NPT1/Npt1 - Gène du cotransporteur NaPi I humain/murin
- NPT2/Npt2 - Gène du cotransporteur NaPi II humain/murin
- OGP - "Osteogenic growth peptide"
- OK- "Opossum kidney"
- OHO - Ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique.
- PDGF - "Platelet-derived growth factor"
- PHEX/ Phex - "Phosphate regulating gene with homologie to endopeptidase on the X chromosome", gène ou protéine humaine/murine.
- Pi - Phosphate inorganique
- PTH - Parathormone
- PTHrP- "PTH-related peptide"
- Ram-1 - Récepteur du virus de la leucémie murine
- RIA - "Radioimmunoassay"
- RPA - "Ribonuclease protection assay".
- RT-PCR - "Reverse transcription - polimerase chain reaction"
- STC - Stanniocalcine
- SV40 - "Simian virus 40"
- TGF - "Transforming growth factor"
- Tmax – Taux de transport maximal
- TmP/GFR - Tmax de phosphate par unité de volume de l'ultra-filtrat glomérulaire
- TRAP - "Tartrate-resistant acid phosphatase"
- VDRE - "Vitamine D responsive element"
- WB - "Western blot"
- XLH - "X-linked hypophosphatemia"

À mon père,

Manoel Artur Mendes Frota

(1932-1997)

et

à mon ami et époux,

Jean Pierre Ruchon

REMERCIEMENTS

Je remercie avec la plus grande gratitude mon directeur de recherche, le Dr. Guy Boileau, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je voudrais souligner l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail et lui exprimer ma plus profonde reconnaissance pour la disponibilité dont il a toujours fait preuve.

Je remercie aussi chaleureusement mon codirecteur, le Dr. Mieczyslaw Marcinkiewicz pour les conseils, les commentaires constructifs et pour m'avoir appris la rigueur envers la préparation d'un article scientifique.

Je remercie également le Dr. Suzy Tenenhouse, le Dr. Philippe Crine et le Dr. Luc DesGroseillers, pour leur implication dans ce projet et dont les conseils furent grandement appréciés.

Un merci spécial à Jwadiga Marcinkiewicz qui m'a initiée, entre autres, à la technique d'hybridation *in situ*. Son amitié et son inestimable soutien technique m'ont beaucoup aidé.

Je tiens aussi à remercier tous les membres des deux laboratoires (Boileau/Chrétien) pour leur gentillesse et leur bonne humeur, particulièrement Guillaume Lesage, Line Lespérance et Jim Rochemont. Je suis aussi très reconnaissante envers Natalie Dion, qui m'a initiée à la biologie moléculaire, il y a quelques années. Je tiens également à souligner l'aide inestimable que m'ont porté Claire Vézina, Mireille Fyfe, Andrew Chen, Louise Cournoyer et Pierre Melançon.

Mes remerciements vont à Jean Pierre Ruchon pour m'avoir toujours soutenue et encouragée ainsi qu'à Julien et Christian Ruchon, pour leur amour, leur compréhension et leur joie de vivre.

Je remercie l'Agence Canadienne pour le Développement International (ACDI), ainsi qu'au Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pour m'avoir octroyé une bourse d'étude.

Enfin, je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

INTRODUCTION

L'introduction de cette thèse est constituée de deux parties; l'une est consacré à la revue de la littérature alors que l'autre présente les objectifs du projet de recherche. Son corps rassemble quatre articles qui traitent des métallopeptidases à zinc de la famille de la Neprilysine. Trois des ces articles démontrent la présence de ces peptidases dans le tissu osseux: les deux premiers ont pour sujet PHEX, dont le gène est impliqué dans la pathogénèse du rachitisme familial hypophosphatémique, une maladie de l'homéostasie du phosphate; le troisième décrit NEP dans les cellules de la lignée ostéoblastique et démontre la dégradation de quelques peptides osteogéniques par cet enzyme. Le quatrième article rapporte la découverte d'une nouvelle enzyme de cette famille, NL1 pour Nep-like 1, ainsi que sa caractérisation biochimique et sa distribution tissulaire et cellulaire. Par conséquent, la revue de la littérature sera constituée des trois parties suivantes:

- (A) Le système peptidergique et les protéases/peptidases,
- (B) L'homéostasie du phosphate et les désordres cliniques du transport de phosphate,
- (C) Le tissu osseux.

D) REVUE DE LA LITTÉRATURE

A) Le système peptidergique et les protéases/peptidases

Les peptides sont utilisés par les cellules du monde des levures jusqu'à celui des mammifères pour déclencher des réponses physiologiques. L'usage des peptides comme messagers cellulaires se fait normalement selon les étapes suivantes: 1) production et relâche du peptide par la cellule, 2) l'interaction du peptide avec son récepteur à la surface de la cellule cible, et 3) dégradation du peptide de façon à finaliser son action. Les étapes première et dernière ont besoin de la participation des protéases/peptidases, soit pour compléter la maturation du peptide, soit pour son inactivation.

Les protéases/peptidases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques d'une protéine ou d'un peptide cible. On distingue deux catégories d'enzymes selon la position de la liaison peptidique à être clivée dans le substrat: les endopeptidases, qui hydrolysent les liaisons localisées à l'intérieur de la molécule, et les exopeptidases, dont l'action de clivage se fait à l'extrémité du substrat, relâchant un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide, soit du côté amino-terminal (aminopeptidases) ou carboxy-terminal (carboxy-peptidases). Les protéases /peptidases peuvent être encore regroupées selon leur mécanisme catalytique en sérines, cystéines, acide aspartiques ou carboxyliques et en métalloprotéases. Cette classification est basée selon le groupement ou acide aminé de l'enzyme qui amorce l'hydrolyse du substrat (Barrett et Rawling, 1991; Rawling et Barrett, 1993), soit, respectivement, une sérine, une cystéine, un résidu acide, généralement un acide aspartique, ou un ion métallique.

Les métalloprotéases/peptidases requièrent donc un ion métallique, généralement le zinc, pour leur activité. Le zinc se lie à l'enzyme par trois résidus pouvant être, de préférence, des histidines, des acides glutamiques, des acides aspartiques ou des cystéines. Les métalloprotéases/peptidases ont été impliquées dans

la modulation de plusieurs phénomènes physiologiques. La thermolysine, une enzyme bactérienne (de *Bacillus thermoproteoliticus*), est souvent présentée comme modèle de cette classe de peptidase (Matthews *et al.*, 1972; Rawling et Barrett, 1995).

A.1) Les métalloprotéases/peptidases à zinc

Les métalloprotéases/peptidases à zinc sont impliquées dans la majorité des processus physiologiques et physiopathologiques, comme le développement embryonnaire, la reproduction, les maladies cardio-vasculaires, dégénératives et inflammatoires, le cancer et quelques maladies infectieuses (Lennarz et Strittmater, 1991; Schiavo *et al.*, 1992; Blundell, 1994). Ces enzymes possèdent une séquence consensus, appelée la “signature du zinc”, dans leur séquence primaire (Jongeneel *et al.*, 1989). Cette séquence consensus est composée des acides aminés liant l’atome de zinc et du résidu qui assure la catalyse du substrat.

A.1.1) Classification des métalloprotéases/peptidases à zinc

Les métalloprotéases/peptidases à zinc ont été classées selon le positionnement des résidus formant cette séquence consensus (Bode *et al.*, 1993; Hooper, 1994) (Figure 1). Ainsi, les métalloprotéases/peptidases à zinc qui contiennent dans leur séquence le motif **HEXXH** (“X” désignant un acide aminé quelconque) ont été nommées zincines. Dans cette séquence, les deux histidines sont impliquées dans la liaison de l’atome de zinc tandis que l’acide glutamique assure la catalyse. Les zincines sont subdivisées en deux sous-groupes, les gluzincines et les metzincines, selon la nature et la position du troisième ligand du zinc ou la présence d’une structure particulière.

Les gluzincines utilisent un acide glutamique comme troisième ligand du zinc, présentant comme “signature du zinc” le motif **HEXXH.....E**. Ce groupe rassemble quatre familles, soit celle de la thermolysine, celle de la neprilysine (NEP, “neutral endopeptidase” 24.11), celle de l’enzyme de conversion de l’angiotensine (ACE) et celle des aminopeptidases.

Les metzincines présentent la séquence consensus allongée **HEBXHXBGBXH**, les trois histidines étant les ligands du zinc et B représentant un gros acide aminé non-polaire. Leur nom est dû à une conformation tridimensionnelle nommée "Met-turn" ("methionine-containing β turn") présente en dessous de leur site actif. La famille des astacines, celle des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (matrixines), celle des serralysines et celle des adamalysines/reprolysines font partie de ce groupe.

La famille des insulinasés constitue le groupe des inverzincines. Leur séquence consensus, **HXXEH**, est identique à celle des zincines, mais la position des résidus est inversée. Le troisième ligand du zinc dans cette famille est un résidu d'acide glutamique retrouvé en dehors de la séquence consensus.

Les carboxypeptidases possèdent la séquence consensus **HXXE**, écourtée par rapport aux zincines et aux inverzincines. L'histidine et l'acide glutamique de cette séquence participent à la liaison du zinc. Le troisième ligand du zinc est une histidine localisée à plus d'une centaine d'acides aminés en aval de la séquence consensus. Les prototypes de cette famille sont les carboxypeptidases A et B.

Le dernier groupe de cette classification est constitué par la DD-carboxypeptidase, dont **H...HXH** est la séquence consensus et les trois histidines les ligands du zinc.

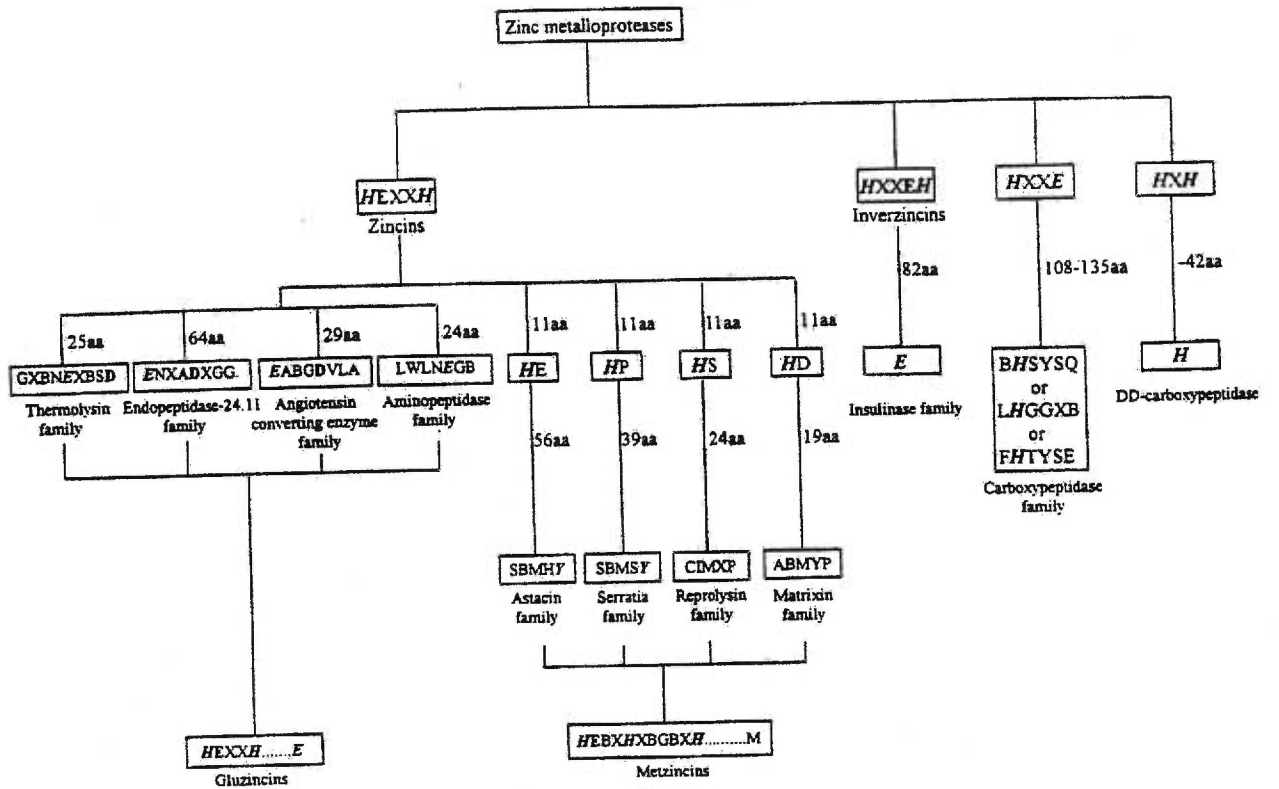


Figure 1. Classification des métalloprotéases/peptidases à zinc (Hopper 1994).

A.1.2) Les métallopeptidases de la famille de la Neprilysine (NEP)

Les cellules des mammifères synthétisent principalement deux classes de métalloendopeptidases, celles qui sont sécrétées et participent au remodelage de la matrice extracellulaire et les métalloendopeptidases de la surface cellulaire, lesquelles agissent dans la maturation finale des peptides, après sa sécrétion, ou dans l'inactivation de peptides biologiquement actifs. Les métallopeptidases membranaires sont généralement ectopeptidases ou protéines de type II, constituées d'une région transmembranaire, d'une courte queue cytoplasmique et d'un large domaine extracellulaire où se trouve le site active de l'enzyme.

La publication récente des séquences primaires de nouvelles métallopeptidases de mammifères ayant une forte identité avec la Neprilysine a suggéré l'existence d'une famille d'enzymes apparentées à la NEP ("NEP-like"; Rawlings et Barrett, 1995; Turner et Tanzawa, 1997). Six membres de cette famille ont été décrits pour le moment. Ces enzymes sont: la Neprilysine (NEP), prototype de la famille (Kerr et Kenny, 1974a,b), les enzymes de conversion de l'endothéline (ECE-1 et ECE-2) (Xu *et al.*, 1994; Emoto et Yanagisawa, 1995), le complexe antigénique Kell des érythrocytes (Lee *et al.*, 1991), PHEX, initialement PEX pour "Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome" (The Hyp Consortium, 1995), impliquée dans le contrôle du métabolisme du phosphate, et XCE, une enzyme récemment découverte et présente dans le système nerveux (Valdenaire, 1999). L'alignement des séquences de ces enzymes montre que, outre la séquence consensus **HEXXH.....E** et la topologie transmembranaire de type II, ces glycoprotéines présentent, au niveau de leur domaine extracellulaire, d'importantes similitudes de séquence (Figure 2). Plusieurs cystéines sont conservées, indiquant la possibilité d'un repliement tridimensionnel semblable impliquant des ponts dissulfures, et suggérant une origine commune pour ces enzymes. De plus, la majorité des résidus d'acides aminés impliqués dans le

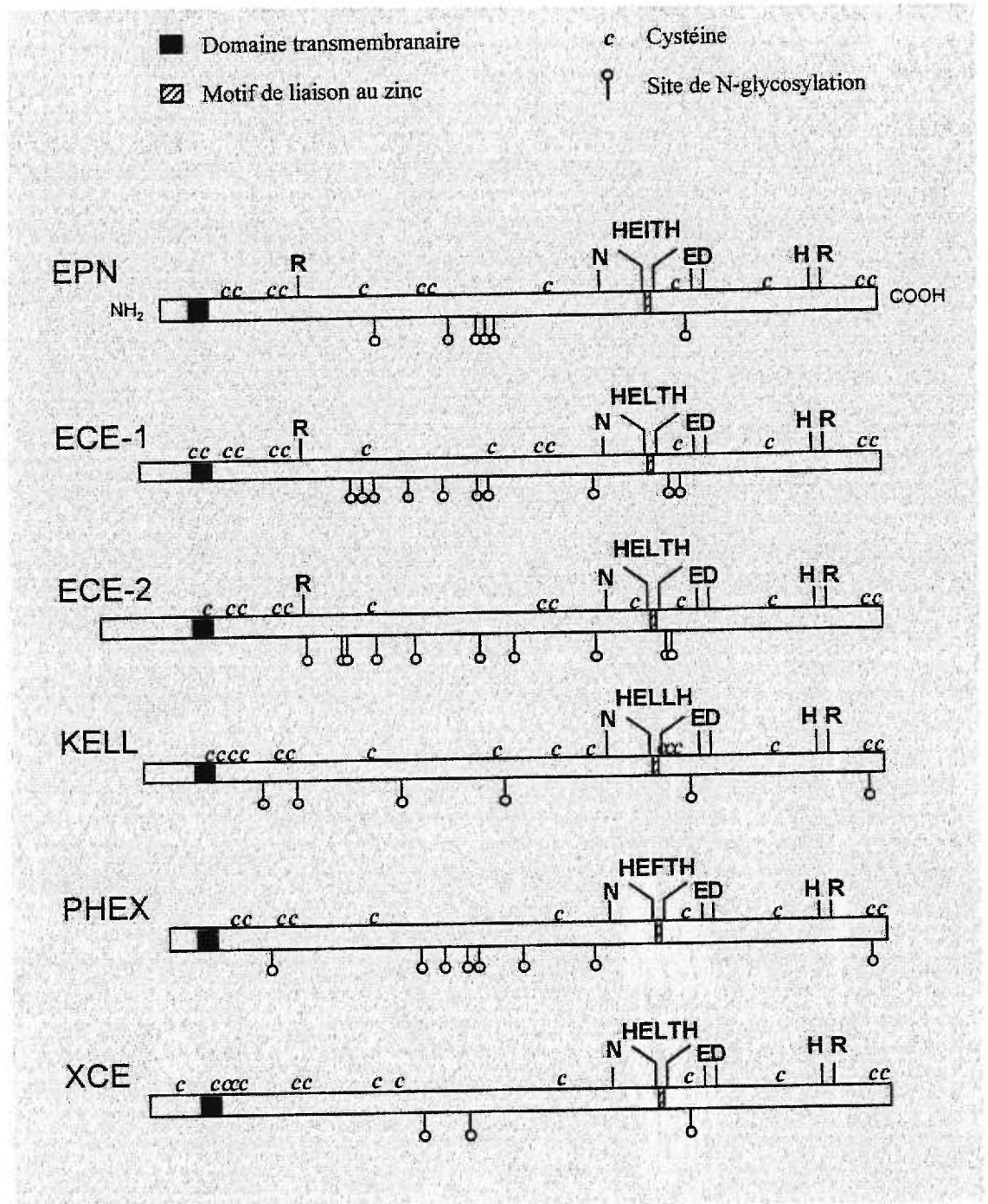


Figure 2. Représentation schématique des membres de la famille de la NEP.

mécanisme catalytique de la NEP, comme l'histidine 711 (Dion *et al.*,1993), l'asparagine 650 (Le Moual *et al.*,1994) et l'asparagine 542 (Dion *et al.*,1995), est aussi conservée. Ces observations suggèrent que ces enzymes possèdent, en plus de la structure, une similarité de leur mécanisme catalytique, tout en conservant leur propre spécificité de substrat. Deux membres de cette famille constituent l'objet de cette thèse, soit NEP et PHEX, et méritent une description plus détaillée.

A.1.2.1) Neprilysine (NEP, “neutral endopeptidase” 24.11, enkephalinase et CALLA ou CD10)

Initialement caractérisée comme une métallopeptidase à zinc avec une spécificité semblable à celle de l'enzyme bactérienne thermolysine, la NEP a été isolée comme une glycoprotéine de 90-100 kDa de poids moléculaire, faisant 4-5% de la masse protéique totale de la bordure en brosse des tubules contournés proximaux de reins de lapin. La NEP dégradait la chaîne β de l'insuline à pH neutre, d'où son appellation d'endopeptidase neutre (Kerr et Kenny, 1974 a,b). Elle a été redécouverte une deuxième fois comme l'enképhalinase, une nouvelle enzyme située dans le cerveau qui participait à la dégradation spécifique des enképhalines (Malfroy *et al.*, 1978), ainsi qu'une troisième fois lors du clonage de l'ADNc de CALLA (“Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen” ou CD10), un antigène de surface des lymphocytes B immatures, marqueur du développement de la leucémie lymphoblastique aigue de type B (Greaves *et al.*, 1975).

A.1.2.1.1) Structure primaire, topologie et glycosylation

La structure primaire complète de la NEP a été déduite des séquences de clones de l'ADNc de rat (Malfroy *et al.*, 1987), de lapin (Devault *et al.*, 1987), humains (Letarte *et al.*, 1988; Malfroy *et al.*, 1988) et de souris (Chen *et al.*, 1992). La comparaison des séquences de la NEP entre les différentes espèces de mammifères a montré une identité supérieure à 90% des acides aminés, indiquant un taux de conservation très élevé parmi ces espèces. La séquence primaire de la NEP suggère une ectoenzyme ou protéine de type II composée de 749 acides aminés et possédant une courte queue cytoplasmique (27 résidus), une région transmembranaire

unique (23 résidus), et un large domaine extracellulaire (699 résidus), responsable de l'activité catalytique de l'enzyme. Cette topologie a été confirmée par l'analyse par microscopie électronique des cellules COS-1 transfectées avec la NEP (Devault *et al.*, 1988) et est en accord avec la nécessité d'une extraction au toluène et à la trypsine pour sa purification (Kerr et Kenny, 1974a). L'ectodomaine adopte une structure globulaire compacte localisée proche de la membrane plasmique (Kenny *et al.*, 1983). Il contient le site catalytique de l'enzyme avec l'atome de zinc, ainsi que douze résidus cystéines impliqués dans la formation de ponts dissulfures qui stabiliseraient la conformation de l'enzyme active (Tam *et al.*, 1985). En plus, la NEP possède des sites potentiels de N-glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr, où Xaa peut être n'importe quel acide aminé sauf une proline) sur son ectodomaine. L'enzyme de lapin en contient cinq, alors que celles de rat, de souris et l'humaine en contiennent six. La glycosylation de la NEP est essentielle pour lui assurer un repliement correct, un transport adéquat jusqu'à la membrane plasmique et une activité enzymatique normale (Lafrance *et al.*, 1994).

A.1.2.1.2) Organisation génique

Le gène de NEP a été cartographié et s'étend sur 80 kb dans la région chromosomique 3q21-27 (Barker *et al.*, 1989). Il est composé de 24 exons et code pour plusieurs ARNm, tous contenant les exons 3 à 24 (codant pour la protéine) et présentant des variations dans la région promotrice (exon 1 et 2) (D'Adamio *et al.*, 1989).

A.1.2.1.3) Distribution tissulaire

La présence de la NEP a été démontrée en plusieurs tissus et types cellulaires (Tableau I) (révisé par Roques *et al.*, 1993 et Kenny, 1993), soit exprimée constitutivement dans des tissus comme le cerveau et le rein, ou d'une façon régulée pendant le développement, comme pour les lymphocytes. Les rôles physiologiques qu'elle exerce à ces divers endroits ne sont pas encore tous connus.

| Organe | Références |
|-------------------------|--|
| Système nerveux central | Waksman <i>et al.</i> (1984, 1985 et 1986) |
| Adénohypophyse | Barnes et Kenny (1988), Pollard <i>et al.</i> (1989) |
| Méninges | Zajac <i>et al.</i> (1987) |
| Reins | Gee <i>et al.</i> (1983), Sales <i>et al.</i> (1991) |
| Intestins | Gee <i>et al.</i> (1983) |
| Thymus | Bowes et Kenny (1987) |
| Poumons | Sales <i>et al.</i> (1991), Dutriez <i>et al.</i> (1992) |
| Noeuds lymphatiques | Sales <i>et al.</i> (1991), Dutriez <i>et al.</i> (1992) |
| Rate | Bowes et Kenny (1987) |
| Moelle osseuse | Le Bien et McCormack (1989) |
| Testicules | Kenny <i>et al.</i> (1987), Sales <i>et al.</i> (1991) |
| Ovaires | Kenny <i>et al.</i> (1987) |
| Prostate | Kenny <i>et al.</i> (1987) |
| Glandes salivaires | Sales <i>et al.</i> (1991), Dutriez <i>et al.</i> (1992) |
| Glandes exocrines | Gee <i>et al.</i> (1985) |
| Cartilage | Sales <i>et al.</i> (1991), Dutriez <i>et al.</i> (1992) |
| Os | Sales <i>et al.</i> (1991), Dutriez <i>et al.</i> (1992) |
| Placenta | Dutriez <i>et al.</i> (1992) |

Tableau I. Principaux sites d'expression de la NEP.

A.1.2.1.4) Substrats et fonctions physiologiques

La NEP dégrade *in vitro* une grande diversité de peptides bioactifs, généralement de petite taille (< 3.5 kDa) et, sauf pour quelques rares exceptions, en hydrolysant la liaison peptidique située du côté aminé d'un résidu hydrophobe (Turner *et al.*, 1985) (Tableau II). La confirmation de cette hydrolyse *in vivo* a été souvent réalisée en utilisant des inhibiteurs spécifiques de l'enzyme dans les tissus cibles et en vérifiant une augmentation subséquente de la concentration du peptide étudié. Pour le moment, l'importance de la NEP dans l'inactivation *in vivo* de peptides comme les enképhalines, la substance P, les peptides natriurétiques et les bombésin-like peptides a été bien établie et a permis de proposer une implication de cette enzyme dans certains processus physiologiques comme le contrôle de la transmission du message nociceptif, la manutention de l'équilibre hydro-électrolytique et de la tension artérielle, le contrôle de l'inflammation, de la différenciation et de la prolifération cellulaires (révisé en Kenny et Boustead, 1997).

A.1.2.1.4.1) Le contrôle de la transmission du message nociceptif

Les enképhalines sont des neuropeptides qui, se liant aux récepteurs opioïdes μ et δ , provoquent un effet anti-nociceptif ressemblant à celui de la morphine (Brownstein, 1993). La substance P, abondante dans la substance noire, a été impliquée dans le contrôle de la perception de la douleur (Oblin *et al.*, 1989). Plusieurs évidences supportent un rôle physiologique de la NEP dans l'inactivation des enképhalines et de la substance P, modulant ainsi la transmission du message nociceptif au niveau du cerveau (révisé par Turner, 1997). Par exemple, des études ont démontré la production *in vivo* d'une réponse antinociceptive, réversible par la naloxone, chez la souris (Roques *et al.*, 1980) ou l'augmentation de la récupération des enképhalines (de la Baume *et al.*, 1983) ou de la substance P (Mauborgne *et al.*, 1991), libérées par des coupes de certaines régions du cerveau, après l'utilisation du Thiorphan, un inhibiteur synthétique très spécifique de NEP. En plus, des études autoradiographiques et immunohistochimiques ont colocalisé NEP avec les récepteurs opioïdes (Waksman *et al.*, 1986 et 1987) et avec les enképhalines et la substance P (Barnes *et al.*, 1988; Barnes *et al.*, 1993). Malheureusement, le niveau de

| Substrats | Références |
|--------------------------------------|--|
| ANF | Stephenson et Kenny (1987b) |
| Angiotensine I | Stephenson et Kenny (1987a) |
| Angiotensine II | Stephenson et Kenny (1987a) |
| Bombésine | Shipp <i>et al.</i> (1991) |
| Bradykinine | Matsas <i>et al.</i> (1984) |
| CGRP | Katayama <i>et al.</i> (1991) |
| Cholécystokinine (CCK ₈) | Bunnett <i>et al.</i> (1988) |
| Dynorphine (1-9) | Matsas <i>et al.</i> (1984) |
| Endothéline 1, 2, et 3 | Vijayaraghavan <i>et al.</i> (1990) |
| γ-Endorphine | Hersh (1984) |
| GRP | Shipp <i>et al.</i> (1991) et Bunnett <i>et al.</i> (1985) |
| Leu-enképhaline | Matsas <i>et al.</i> (1984) |
| Met-enképhaline | Matsas <i>et al.</i> (1984) |
| LHRH | Matsas <i>et al.</i> (1984) |
| Neurokinine A | Hooper <i>et al.</i> (1985) |
| Neurotensine | Matsas <i>et al.</i> (1984) et Turner <i>et al.</i> (1987) |
| Substance P | Matsas <i>et al.</i> (1983 et 1984) |
| VIP | Goetzl <i>et al.</i> (1989) |

Tableau II. Principaux substrats de la NEP.

Ce tableau ne fait pas de distinction entre les substrats caractérisés *in vivo* ou *in vitro*.

complexité existant dans le cerveau, par rapport au nombre des neuropeptides et de peptidases, rend très difficile la définition exacte de l'importance d'une enzyme isolée dans ce tissu.

A.1.2.1.4.2) La manutention de l'équilibre hydro-électrolytique et de la tension artérielle

Les peptides natriurétiques participent à la régulation du volume sanguin et de la tension artérielle (Ruskoaho, 1992). Il a été démontré, en utilisant des préparations membranaires des microvilosités rénales (Stephenson et Kenny, 1987) ou du plexus choroïde (Bourne et Kenny, 1990), que NEP est l'enzyme responsable pour l'hydrolyse initiale de l'ANP (atrial natriuretic peptide) et du BNP (brain natriuretic peptide). Diverses études utilisant des inhibiteurs de NEP en modèles animaux de maladies cardio-vasculaire et rénale (Seymour *et al.*, 1993 et 1996; Pham *et al.*, 1993; Trippodo *et al.*, 1991; Margulies *et al.*, 1990) ou chez l'homme (Sagnella *et al.*, 1995; Richards *et al.*, 1991 et 1993; Singer *et al.*, 1991) ont démontré une augmentation de la diurèse et natriurèse dépendant de la dose d'inhibiteur utilisée. Ces études doivent être interprétées avec précaution, mais plusieurs suggèrent une participation importante de NEP dans la clearance de l'ANP et BNP, surtout en conditions pathologiques où le volume plasmatique et les niveaux de ces peptides sont augmentés (révisé par Wilkins et Kenny, 1997).

A.1.2.1.4.3) Le contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaires

En 1989, Kenny et collaborateurs ont proposé que les peptidases membranaires joueraient un rôle clé dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaires en modulant l'activité des peptides et en régulant leur accès aux cellules voisines (Kenny *et al.*, 1989). Cette hypothèse s'est avérée pour NEP et le tissu pulmonaire. NEP est exprimée par l'épithélium distal des voies respiratoires foétales et par l'épithélium bronchial adulte où elle contrôle, entre autres, la quantité de substance P, un médiateur de l'inflammation (Sunday *et al.*, 1992), et régule la prolifération cellulaire intermédiée par les peptides "bombesin-like",

des facteurs de croissance et mitogènes très puissants pour les fibroblastes et pour l'épithélium (Shipp *et al.*, 1991; King *et al.*, 1993). Ces peptides sont aussi mitogènes pour les adénocarcinomes pulmonaires, soit ceux à petites cellules (Ganju *et al.*, 1994), soit les autres (Cohen *et al.*, 1996). Dans plusieurs de ces cancers, il existe une boucle de croissance autocrine où les cellules tumorales sécrètent les peptides "bombesin-like", expriment leurs récepteurs et prolifèrent en leur présence (Sunday *et al.*, 1992). Il a été démontré que ces carcinomes pulmonaires expriment très peu ou pas NEP, et que leur croissance *in vitro* est inhibée par l'addition de NEP recombinante dans le milieu de culture et stimulé par l'addition des inhibiteurs spécifiques de NEP (Cohen *et al.*, 1996; Shipp *et al.*, 1991). En plus, les carcinomes pulmonaires à petites cellules se développent exclusivement chez les fumeurs, qui présentent une réduction de l'expression de NEP et une quantité élevée de peptides "bombesin-like" dans leur fluide bronchoalvéolaire (Shipp et Look, 1993). Ces études ont confirmé un lien direct entre la réduction de l'expression de NEP, l'augmentation de la disponibilité de peptides bombesin-like" et le développement du cancer pulmonaire. Cette relation entre NEP, les facteurs de croissance et la prolifération cellulaire a été établie aussi pour d'autres cancers, comme celui de la prostate (Papandreou *et al.*, 1997, 1998) et du sein (Burns *et al.*, 1999).

A.1.2.1.4.4) Le contrôle de l'inflammation

Dans tous les types cellulaires où elle a été étudiée, la NEP agit en réduisant une réponse cellulaire par la dégradation de peptides. Cet aspect est aussi valable pour la réaction inflammatoire. Par exemple, l'inhibition de la NEP fait augmenter les réactions inflammatoires neurogéniques pulmonaires, du fait de l'élévation des niveaux de la substance P, associé à la toux, la bronchoconstriction, la vasodilatation et la migration des neutrophiles (Shipp and Look, 1993; Koehne, 1998). En outre, la rupture du gène de la NEP chez la souris a augmenté la mortalité consécutive au choc septique induit par l'endotoxine LPS (Lu *et al.*, 1995). D'un autre côté, ces animaux ont été protégés du choc léthal par des injections de NEP recombinante, ce qui suggère qu'un mélange de peptides, comme les endothélines, bradikinines, tachykinines et enképhalines, est relâché et induit le choc léthal (Lu *et al.*, 1995).

Les résultats observés avec les souris knock-out indiquent que la fonction de NEP n'est pas essentielle pour le développement, ni pour la vie d'une souris de laboratoire dans un environnement contrôlé, jusqu'à l'arrivée d'une adversité, comme le choc septique, tel que montré dans l'étude de Lu et collaborateurs (1995). Il reste à vérifier la survie de ces animaux pendant des situations de stress ou des maladies, conditions qui augmentent les niveaux des peptides substrats de NEP. Nul doute que ce modèle animal va être très utile pour établir le rôle exact de NEP dans des processus biologiques très complexes comme l'hypertension, le contrôle de la douleur, l'inflammation, le développement du système immunitaire et la progression de certains cancers.

A.1.2.2) PHEX

Le gène PHEX (“Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome”), initialement appelé PEX (confusion avec les gènes des peroxisomes), a été découvert à la suite des études génétiques sur le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X (XLH, “X-Linked Hypophosphatemia”, HYP). Il a été localisé dans le chromosome X, région p22.1, en utilisant des marqueurs microsatellites extrêmement polymorphiques et des échantillons d'ADN de 150 familles porteuses de XLH (The HYP Consortium, 1995).

A.1.2.2.1) Structure génique

La structure du gène PHEX humain a été totalement caractérisée (Francis *et al.*, 1997). Il est composé de 22 exons, la majorité de taille inférieure à 130 bp, étendus parmi des introns très grands (environ 10 kb en moyenne), dans une large région génomique d'à peu près 220 kb. L'étude du gène PHEX représente un intérêt médical à cause des mutations trouvées chez les patients porteurs de XLH (voir section B de cette revue pour plus de détails). Il est aussi partiellement délété chez les souris Hyp et Gy, des modèles animaux de la maladie humaine (Eicher *et al.*, 1976; Lyon *et al.*, 1986; Beck *et al.*, 1997; Strom *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Suite au rapport initial qui a identifié des délétions et des mutations de type non-sens et de changement du cadre de lecture de la protéine (The HYP Consortium, 1995),

plusieurs autres défauts, comme des duplications, des insertions et différentes mutations contresens, répandues à travers tout le gène, ont été documentées chez les patients HYP. L'analyse de ces mutations prévoit, pour la grande majorité, une perte de fonction de l'enzyme PHEX (Holm *et al.*, 1996; Rowe *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1998).

En ce que concerne la transcription et la traduction du gène PHEX, l'analyse des séquences aux alentours du premier codon ATG, l'initiateur potentiel de la traduction de l'ARNm, a démontré l'absence d'une séquence consensus de type Kozak chez l'homme, la souris et le rat (Francis *et al.*, 1997). Cette donnée suggère que l'expression de PHEX puisse être soumise à une régulation très rigide surtout au niveau post-transcriptionnel (Kozak, 1991). De plus, grâce au programme GRAIL, l'étude de Francis et collaborateurs (1997) rapporte la prévision d'une région promotrice en amont de l'exon 2 de PHEX, qui, si utilisée, produirait une protéine dépourvue du domaine amino-terminal cytosolique et de la région transmembranaire. Cette protéine serait sécrétée ou cytosolique, selon la présence ou l'absence d'un signal peptidique dans sa séquence, qui la conduirait ou non à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Il faut dire que, pour le moment, il n'y a aucune évidence de l'existence de cette forme écourtée de PHEX et que toutes les séquences rapportées contiennent l'exon 1 (The HYP Consortium, 1995; Du *et al.*, 1996; Beck *et al.*, 1997; Grieff *et al.*, 1997; Guo et Quarles, 1997; Lipman *et al.*, 1998).

La région chromosomique contenant le gène PHEX (~ 220 kb ; Francis *et al.*, 1997) est beaucoup plus large que celle décrite pour le gène de NEP (~ 80 kb ; D'Adamio *et al.*, 1989). Néanmoins, PHEX et NEP ont une organisation des exons très semblable (Figure 3), par rapport à la taille et aux limites exon-intron, ce qui renforce leur parenté et l'hypothèse de leur origine commune.

A.1.2.2.2) Structure primaire, topologie et glycosylation

La structure primaire complète de la protéine PHEX a été déduite des séquences de clones d'ADNc humain (The HYP Consortium, 1995; Beck *et al.*,

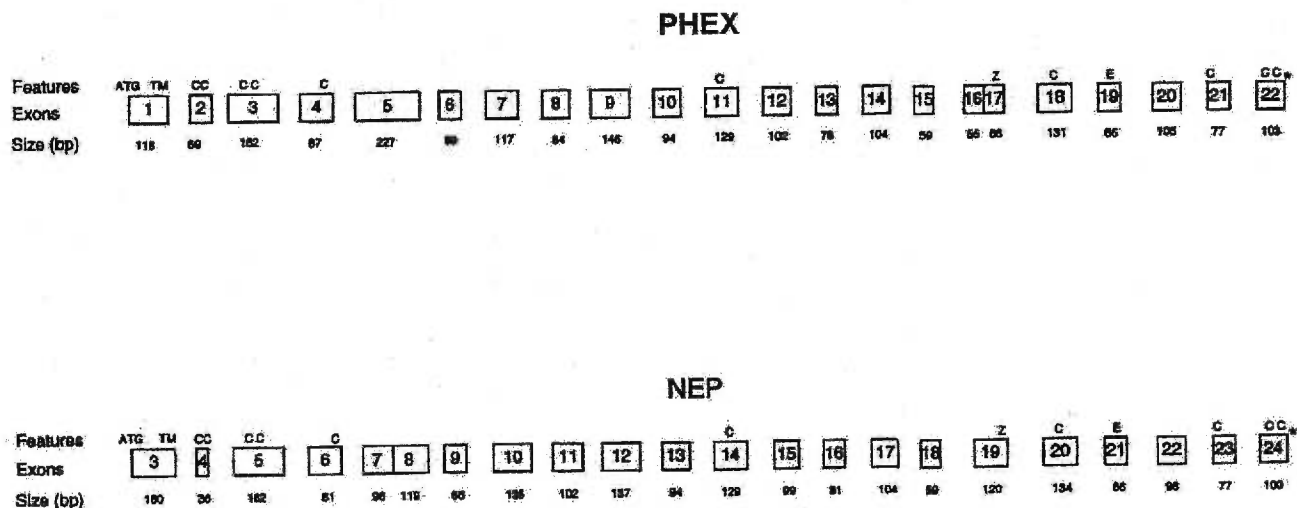


Figure 3 - Comparaison entre les gènes PHEX et NEP (Francis *et al.*, 1997).

Les exons codants sont représentés par des carrés et leur taille est marquée en dessous de chacun. Sept exons de ces deux gènes sont identiques en taille (les exons 3, 10, 11, 14, 15, 19 et 21 de PHEX sont équivalents aux exons 5, 13, 14, 17, 18, 21 et 23 de NEP). En dessus des carrés, les régions conservées sont représentées: (ATG) méthionine de départ; (TM) domaine transmembranaire; (C) résidu cystéine; (Z) motif de liaison au zinc (HEXXH); (E) deuxième motif de liaison au zinc (ENXADXGG); (*) codon stop.

1997; Grieff *et al.*, 1997; Guo et Quarles, 1997; Lipman *et al.*, 1998), de souris (Du *et al.*, 1996; Beck *et al.*, 1997; Strom *et al.*, 1997) et de rat (GenBank accession # R47026). Elle comprend 749 acides aminés qui présentent des homologies de 50% à 60% avec les membres de la famille des métalloendopeptidases à zinc (NEP, ECE-1 et 2, KELL et XCE). L'analyse de cette séquence prévoit une protéine membranaire dont la topologie est de type II, portant une courte queue cytosolique, une région transmembranaire et un large domaine extracellulaire (20, 27 et 702 acides aminés respectivement). Ces prédictions de l'analyse de séquence ont été confirmées par la technique d'extraction des protéines en présence du détergent Triton X-114 qui a démontré PHEX comme une protéine membranaire intégrale, ainsi que par sa localisation à la membrane plasmique par immunofluorescence (Lipman *et al.*, 1998). Le domaine extracellulaire de PHEX contient 10 résidus cystéines impliqués dans le repliement de la protéine, le site actif potentiel avec la séquence consensus HEXXH, l'acide glutamique comme troisième ligand du zinc dans le motif ENXADXGG, aussi très conservé parmi les membres de la famille, et d'autres résidus comme l'acide glutamique 581, l'asparagine 645 et l'histidine 710 qui correspondent dans la séquence de NEP à l'acide glutamique 584, l'asparagine 650 et l'histidine 711 (Figure 2 et 4). Il est important de rappeler que l'acide glutamique 584 et l'asparagine 650 participent au mécanisme catalytique de la NEP (Le Moual *et al.*, 1991; Le Moual *et al.*, 1994) et que l'histidine 711 est importante pour la stabilisation de l'état de transition (Dion *et al.*, 1993). En plus, PHEX possède huit sites potentiels de N-glycosylation sur son domaine extracellulaire. La glycosylation assure à la NEP un repliement correct, un transport adéquat jusqu'à la membrane plasmique et une activité enzymatique normale (Lafrance *et al.*, 1994). Pour le moment, il a été démontré que PHEX est glycosylée (Ruchon *et al.*, *J Bone Miner Res*, in press; troisième chapitre de cette thèse), mais les corrélations entre la glycosylation et les propriétés de PHEX n'ont pas encore été vérifiées.

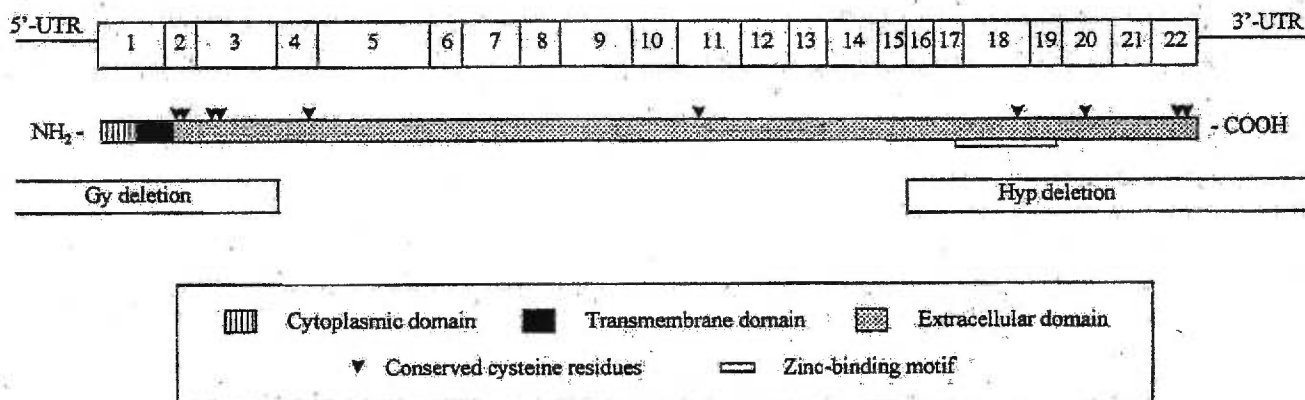


Figure 4 - Représentation schématique du gène et de la protéine PHEX (Tenenhouse, 1999).

Les domaines cytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire sont représentés, le dernier possédant les 10 cystéines et le motif de liaison au zinc. Les zones de délétion des mutations Hyp et Gy sont aussi montrées.

A.1.2.2.3) Distribution tissulaire

Le rapport initial du gène PHEX indiquait qu'il serait très peu exprimé dans la majorité des tissus. En effet, les difficultés à réaliser des Northern blots et à identifier des clones d'ADNc ont été nombreuses (HYP consortium, 1995). Il faut mentionner que jusqu'à présent, seulement une séquence EST de PHEX a été identifiée, provenant d'une librairie d'ADNc de dent incisive de rat. Ce clone contient ~ 470 nucléotides en amont de la méthionine initiale, la séquence codante complète de la protéine et ~ 2,5 kb de région 3' non-traduite (Francis *et al.*, 1997; GenBank accession # R47026). Plusieurs études ont été entreprises dans le but de définir les sites d'expression physiologique du gène PHEX, en se rappelant qu'une hypophosphatémie persistante due à une perte de phosphate au niveau des reins était le point cardinal de XLH. De plus, des études antérieures avaient démontré un défaut intrinsèque des ostéoblastes de souris Hyp dans la minéralisation de la matrice osseuse, après transplantation de ces cellules mutantes chez des souris normales (Ecarot-Charrier *et al.*, 1988; Ecarot *et al.*, 1992). Des études indépendantes avaient également suggéré un défaut spécifique dans le développement de la dentine secondaire chez les patients HYP (Shields *et al.*, 1990). Ces expériences indiquaient un rôle important pour PHEX dans les reins, les os et les dents. En tenant compte de ces données, nous avons choisi de vérifier les sites d'expression de PHEX chez la souris et d'étudier son ontogenèse, par des techniques d'hybridation *in situ* des ARNm et de Northern blot. Cette étude (Ruchon *et al.*, 1998; deuxième chapitre de cette thèse) a démontré que les os et les dents, et au niveau cellulaire les ostéoblastes et les odontoblastes, sont les sites d'expression les plus importants des ARNm de Phex. D'autres études indépendantes, réalisées parallèlement, ont suggéré la présence des ARNm de PHEX/Phex dans les os, poumons et ovaires humains (Beck *et al.*, 1997; Grieff *et al.*, 1997) ainsi que dans les os de la souris (Du *et al.*, 1996; Beck *et al.*, 1997) par des techniques de RT/PCR, de "ribonuclease protection assay" et de Northern blot. Aucune étude n'a jamais rapporté d'expression de PHEX/Phex dans le rein.

Après avoir déterminé la distribution des ARNm de Phex, nous avons étudié l'expression de la protéine chez la souris normale et son mutant Hyp. Les résultats

confirment la présence de Phex dans les ostéoblastes, ostéocytes et odontoblastes, de même que son absence chez les cellules moins différenciées de la lignée ostéoblastique (préostéoblastes et précurseurs), indiquant que PHEX/Phex est un marqueur des cellules différenciées des tissus minéralisés. L'absence de Phex, au niveau des ARNm et de la protéine, a aussi été démontrée chez le Hyp (Ruchon *et al.*, 2000; troisième chapitre de cette thèse).

A.1.2.2.4) Substrats et fonctions physiologiques potentielles

Une seule étude a rapporté jusqu'à maintenant une évidence expérimentale d'une activité endopeptidasique pour PHEX (Lipman *et al.*, 1998). Cette étude décrit la dégradation *in vitro* de la région amino-terminale active du parathormone (PTH₁₋₃₄) par des extraits de cellules Cos exprimant PHEX recombinante, dont la séquence a été dérivée d'une tumeur responsable pour un cas d'OHO ("Oncogenic Hypophosphatemic Osteomalacia" - voir section B de cette revue pour plus de détails). La même étude a démontré que, contrairement à NEP, PHEX ne possède pas d'activité dipeptidylpeptidasique, exemplifié par son incapacité d'hydrolyser la [D-Ala,Leu]enképhaline. Ce fait va de paire avec l'absence de l'arginine 102 dans la séquence de PHEX, un résidu essentiel pour cette activité chez NEP.

Sachant que les ostéoblastes, les ostéocytes et les odontoblastes sont les principales cellules exprimant PHEX et sans connaître son substrat physiologique, il n'est pas évident de comprendre comment la perte de fonction de PHEX cause la perte de phosphate au niveau des reins ainsi que des défauts de minéralisation au niveau des os et des dents. En ce qui concerne l'hyperphosphaturie, il a été présumé que, en agissant comme une ectoenzyme, PHEX pouvait métaboliser un facteur circulant impliqué dans le contrôle de la réabsorption du phosphate au niveau des reins, soit en clivant le précurseur d'une hormone capable de réabsorber le phosphate, pour produire sa forme active, soit en inactivant une hormone phosphaturique (Econs, 1996; Nesbitt et Drezner, 1996) (Figure 5). Cette hypothèse a été soutenue par les études de parabiose (Meyer *et al.*, 1989) et de "cross-transplantation" (Nesbitt *et al.*, 1992) qui suggèrent l'existence d'un facteur humoral

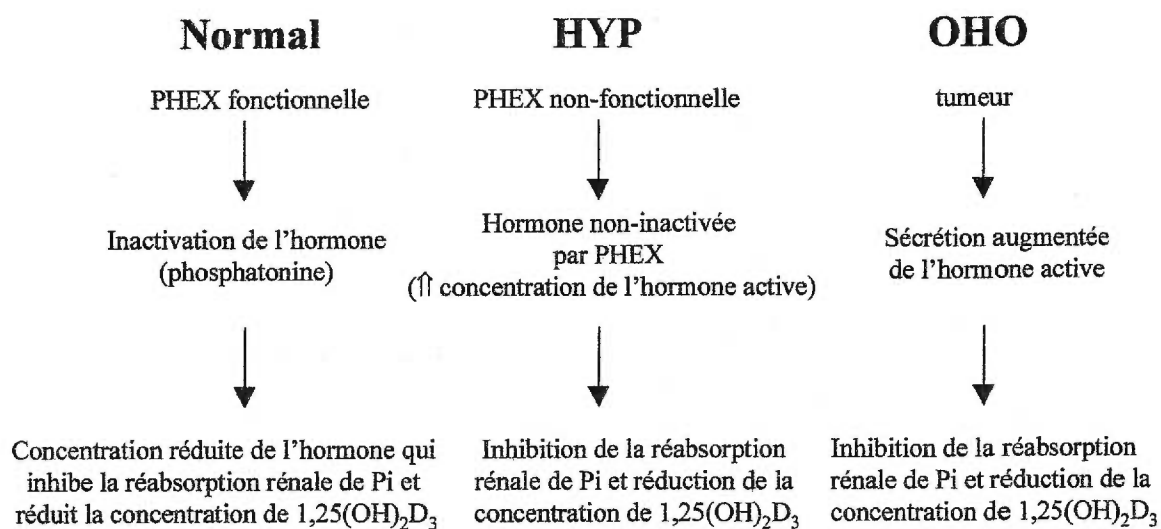


Figure 5. Mécanisme d'action hypothétique de PHEX et la pathogenèse de XLH et d'OHO (Nelson *et al.*, 1997).

comme la cause de la perte rénale de phosphate. Elle a aussi été supportée par les travaux de Lajeunesse et collaborateurs (1996) qui indiquent la production et/ou la modification, par des ostéoblastes, d'un facteur humoral qui inhiberait le cotransport de Na-Pi par des cellules épithéliales rénales. Par rapport aux défauts de minéralisation au niveau des os et des dents, il a été suggéré que PHEX aurait d'autres fonctions indépendantes de ces effets dans le transport rénal de phosphate, y compris la régulation de la minéralisation osseuse (Figure 6).

La dégradation *in vitro* de PTH par PHEX suggère que PTH est son substrat physiologique et aussi, possiblement, la phosphatonine, l'hormone phosphaturique circulante hypothétique (Econs et Drezner, 1994), responsable pour l'hypophosphatémie des patients OHO et possiblement XLH (Econs et Drezner, 1994; Hewison, 1994; Rowe, 1994). Néanmoins, l'homéostasie du calcium est généralement préservée chez les patients OHO et XLH, les taux sanguins de PTH sont normaux ou seulement légèrement augmentés et la majorité des travaux ont exclu PTH et PTHrP comme des responsables de l'hypophosphatémie de ces désordres (Cai *et al.*, 1994; Wilkins *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1996; Kumar, 1997). Cependant, il reste la possibilité que PHEX ait plusieurs substrats et que, particulièrement au niveau des ostéoblastes, elle module la biodisponibilité et l'activité de PTH. Il faut mentionner ici qu'une récente étude vient de démontrer la présence des ARNm de PHEX, par la technique de RPA ("RNase protection assay"), dans les parathyroïdes humaines, fait qui suggère un rôle pour PHEX envers la régulation de la PTH (Blydt-Hansen *et al.*, 1999). Parallèlement, PHEX pourrait aussi moduler l'activité d'autres hormones/facteurs, y compris la phosphatonine, produits et/ou modifiés par des ostéoblastes, spécifiquement impliqués dans la régulation de la réabsorption de Pi, dans la maturation des ostéoblastes et dans la minéralisation de la matrice osseuse.

Le rôle potentiel de PHEX dans la minéralisation de l'os a été "investigué" récemment (Xiao *et al.*, 1998). Les auteurs ont caractérisé et utilisé des cultures d'ostéoblastes immortalisés, dérivés des souris normales et Hyp transgéniques pour le virus simian 40 (SV40, "simian virus 40"). Comparées aux ostéoblastes dérivés des souris normales, les cultures dérivées des souris Hyp montraient une réduction de

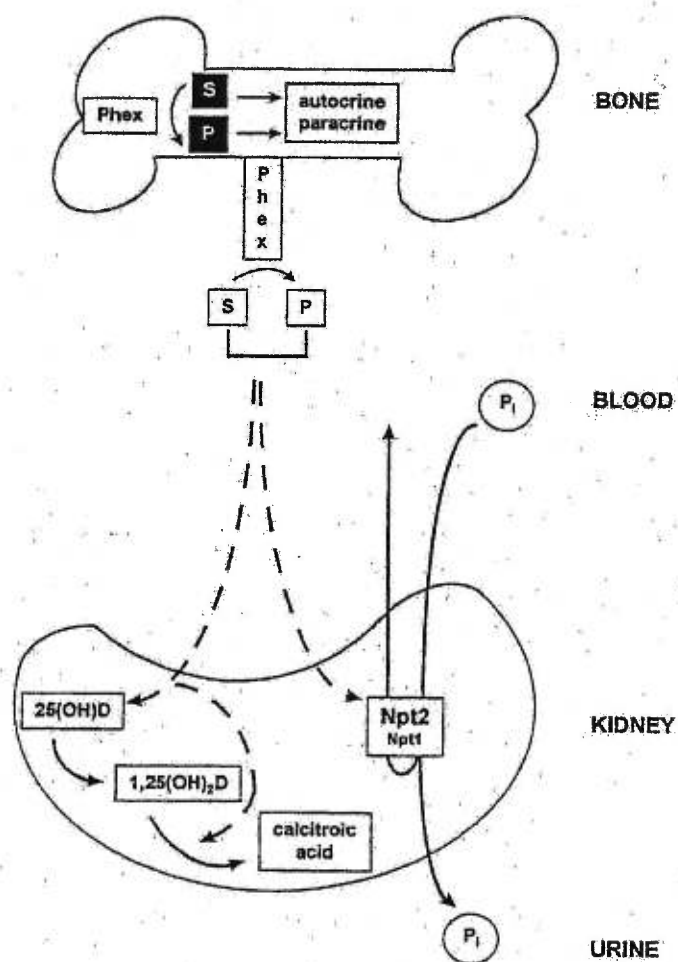


Figure 6 - Représentation schématique du mécanisme d'action hypothétique de PHEX au niveau des os et de ses substrats peptidiques circulants (Tenenhouse, 1999).

Ce modèle implique PHEX dans l'activation ou l'inactivation des facteurs peptidiques, produits dans l'os ou circulants (les substrats de PHEX [S]) et la formation des produits peptidiques actifs ou inactifs (les produits de PHEX [P]). Au niveau des os, les peptides actifs agiraient de façon autocrine ou paracrine au niveau de la régulation de la croissance, de la différenciation et/ou de la minéralisation. Au niveau des reins, les peptides actifs seraient impliqués dans la régulation de la réabsorption de P_i , via Npt1 et Npt2, et dans la synthèse et/ou dégradation de la forme active de la vitamine D.

l'accumulation de ^{45}Ca dans la matrice extracellulaire associée à une diminution de la formation des nodules de minéralisation. De plus, en utilisant des expériences de coculture des ostéoblastes normaux et Hyp, ils ont mis en évidence la production d'un facteur soluble par les ostéoblastes Hyp, qui bloquerait la minéralisation de la matrice extracellulaire par les ostéoblastes normaux. De cette façon, les auteurs ont confirmé que l'absence d'activité de Phex était associée à une dysfonction des ostéoblastes ainsi qu'à une minéralisation défectueuse *in vitro*. De plus, l'hypothèse que l'absence de fonction de Phex soit associée à l'accumulation d'un facteur produit par des ostéoblastes qui inhiberait la minéralisation de la matrice osseuse a été démontrée *in vitro*.

Egalement, l'expression de Phex, au niveau des ARNm et de la protéine, a été récemment rapportée en relation avec le processus de différenciation des ostéoblastes, de la minéralisation de la matrice osseuse et en réponse à l'administration de la vitamine D active [1,25(OH) $_2$ D $_3$ ou vitamine D $_3$] (Ecarot et Desbarats, 1999). Cette étude a utilisé des cultures primaires d'ostéoblastes dérivées de la calvaria ainsi que la lignée d'ostéoblastes de souris MC3T3-E1, et a suggéré une corrélation entre la différenciation des ostéoblastes et l'induction de l'expression du gène Phex. Elle a aussi démontré l'inhibition de l'expression de Phex par la vitamine D $_3$. La possibilité d'une modulation de l'expression de PHEX par la vitamine D $_3$ avait été suggérée par la présence d'un VDRE ("vitamine D responsive element") dans les voisinages du gène PHEX (Rowe *et al.*, 1996).

B) L'homéostasie du phosphate et les désordres cliniques du transport de phosphate

Le phosphate inorganique (Pi) est un nutriment essentiel tant en terme de fonctionnement cellulaire que de minéralisation du squelette. Il est essentiel comme source de phosphate pour l'ADN, l'ARN, les protéines et les phospholipides membranaires ainsi que pour les processus cellulaires comme la glycolyse, la glyconéogénèse, le métabolisme énergétique, la phosphorylation des molécules de signalisation intracellulaire, etc. Par conséquent, les perturbations qui altèrent les concentrations de Pi dans l'organisme sont responsables d'anomalies cliniques et biochimiques. Les problèmes cliniques associés à une hypophosphatémie chronique comprennent le rachitisme et l'ostéomalacie, la rhabdomyolysis et les cardiomyopathies. Les concentrations trop élevées de Pi, présentes par exemple chez les porteurs de faillite (défaillance) rénale, induisent l'hyperparathyroïdisme secondaire et ses complications (révisé par Amiel *et al.*, 1996).

B.1) L'homéostasie du phosphate

Ainsi que pour les autres substances inorganiques essentielles, le contenu corporel de Pi en général et de Pi plasmatique en particulier est déterminé par un bilan entre l'absorption intestinale et l'excrétion rénale. Le phosphate est suffisamment abondant dans les aliments naturels pour que le déficit de phosphate dû à la diète soit très rare. Il se présente seulement dans des cas de privation extrême d'alimentation. L'ingestion de phosphate par un individu adulte normal varie de 0,8 à 1,5 grammes par jour. Environ 75% du phosphate ingéré est absorbé au niveau de l'intestin, étant incorporé au pool extracellulaire de phosphate inorganique qui s'équilibre entre le sérum et l'os. Le phosphate absorbé peut être éliminé par les reins, incorporé dans des composants organiques des cellules en prolifération ou déposé comme le composant minéral de l'os (l'hydroxyapatite). Environ 85% du phosphate total de l'organisme est présent dans les os comme hydroxyapatite. Pendant les périodes de privation sévère, surtout si l'ingestion calorique est adéquate, le phosphate présent dans le minéral de l'os constitue l'unique source alternative pour les nécessités métaboliques de l'organisme, de sorte qu'il existe une perte nette

de phosphate de l'os due tant à l'inhibition du processus de minéralisation que de la stimulation de la résorption de l'os. Chez les individus en phase de croissance, la déposition de phosphate dans l'os est responsable du destin de la majorité du phosphate retenu de la diète. Cependant, même chez les individus en croissance, seulement un petit pourcentage du phosphate de la diète est retenu. La majorité du phosphate absorbé est excrétée dans l'urine.

La concentration sérique de Pi varie en fonction de l'âge chez l'Homme : de 3,8 à 5,5mg/dl (1,23 à 1,77 mM) chez l'enfant et de 3,0 à 4,5mg/dl (0,97 à 1,45 mM) chez l'adulte. Le Pi sérique est filtré par les glomérules rénaux et à peu près 80% du Pi filtré est réabsorbé. Les reins excrètent efficacement l'excès de Pi plasmatique par des processus régulés par des hormones. Plusieurs hormones et facteurs comme la parathormone (PTH), la 1,25-dihydroxyvitamine D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, vitamine D_3], l'hormone de croissance (GH), l'insuline et les facteurs apparentés à l'insuline (IGF) altèrent la réabsorption rénale de Pi. Cependant, aucune de ces hormones ou facteurs ne sont spécifiques pour la régulation de la concentration de Pi. Par exemple, la PTH et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont aussi responsables du contrôle des concentrations sériques de calcium (Ca), et le GH, l'insuline et l'IGF participent à d'autres processus métaboliques comme l'anabolisme, l'homéostasie du glucose et la croissance cellulaire. L'homéostasie du Pi est inséparable de celle du calcium pour deux raisons principales: la concentration de chacun de ces ions dans les fluides corporeux est limitée par la concentration de l'autre, et les deux sont demandés en proportions fixes pour la minéralisation de l'os. Malgré cette corrélation, il a été suggéré qu'il serait biologiquement utile à l'organisme d'avoir un facteur ou une hormone qui réponde spécifiquement aux altérations de Pi, sans avoir parallèlement des effets sur d'autres molécules, y compris le Ca (Kumar, 1997). Jusqu'à présent, malgré plusieurs évidences qui suggèrent l'existence d'une telle substance (Cai *et al.*, 1994; Econs et Drezner, 1994; Kumar, 1997) et qui ont même induit une appellation pour un facteur phosphaturique circulant hypothétique, la phosphatonine (Econs et Drezner, 1994), ce facteur/hormone spécifique au contrôle des niveaux de Pi extracellulaire n'a pas été identifié.

B.1.1) L'absorption intestinale de phosphate

Environ 70% du Pi ingéré est absorbé principalement au niveau du duodénum et du jéjunum, le pourcentage variant inversement avec la quantité ingérée. Le contrôle homéostatique principal de l'absorption intestinale est réalisé par la vitamine D dans sa forme active, la 1,25-dihydroxyvitamine D (vitamine D₃). La vitamine D₃ stimule l'absorption de Pi et de Ca et inhibe leur sécrétion vers le lumen intestinal. L'effet de PTH dans l'absorption intestinale de Pi est indirect, via la stimulation de la synthèse rénale de vitamine D₃. Il constitue un système de feedback négatif où l'augmentation ou la diminution de Ca plasmatique associée aux taux décroissants ou croissants de PTH peuvent baisser ou augmenter l'absorption intestinale de Ca et Pi.

B.1.2) Le transport rénal de phosphate

Le rein est l'organe clé dans l'homéostasie du phosphate (révisé par Mizgala et Quamme, 1985). L'excrétion rénale de phosphate est déterminée par le bilan entre les taux de filtration glomérulaire et de réabsorption tubulaire. Le Pi est librement filtré au niveau des capillaires glomérulaires (sa concentration dans l'ultra-filtrat glomérulaire correspond à environ 90% de sa concentration plasmatique). Cependant, le pourcentage de Pi filtré dépend de la concentration sérique de Ca, et elle diminue progressivement dès que les taux de calcium dans le plasma dépassent 10,5 mg/dl.

Une fois filtré, le Pi est réabsorbé dans les tubules. Le transport transépithélial de phosphate de la lumière du tubule vers le compartiment sanguin implique sa captation par la membrane de la bordure en brosse, l'acheminement intracellulaire et l'efflux à travers la membrane basolatérale (Murer *et al.*, 1991). L'étape initiale de ce transport épithélial, c'est à dire l'entrée de Pi dans les cellules tubulaires, depuis la lumière, en constitue l'étape limitante (Murer *et al.*, 1991; révisé par Murer et Biber, 1996; et par Murer *et al.*, 1998). Des études cinétiques ont démontré que le transport de Pi est réalisé par des systèmes de cotransport Na-Pi, un de haute capacité et basse affinité, l'autre de basse capacité et haute affinité, et que la

majorité de ce transport était réalisé dans le tubule proximal (Walker *et al.*, 1987). En fait, la partie contournée et la plus longue de ce tubule réabsorbe plus de 60% du Pi filtré à travers les deux systèmes de cotransport, pendant que la partie droite (*pars recta*) en assure la capture de 15 à 20% à travers un mécanisme de haute affinité et basse capacité (Walker *et al.*, 1987; Tenenhouse *et al.*, 1989). C'est aussi dans ces segments que la modulation du transport de Pi s'exerce : le siège de l'adaptation à l'apport alimentaire est principalement le tubule contourné précoce, tandis que celui de la réponse à l'hormone parathyroïdienne est la *pars recta* (Dennis *et al.*, 1977). Le transport de Pi dans les parties distales du néphron est quantitativement minoritaire et ses modalités y sont encore mal connues (Amiel *et al.*, 1996; Gmaj et Murer, 1986).

B.1.2.1) Mécanismes cellulaires de transport de phosphate

Le transport de Pi à travers l'épithélium du tubule rénal est un phénomène complexe. L'entrée apicale de Pi, effectuée contre un gradient électrochimique, est assurée par des systèmes de cotransport sodium-phosphate (NaPi), dont l'identification moléculaire, au cours des dernières années, constitue une avancée majeure dans la compréhension du fonctionnement tubulaire. Les mécanismes de l'entrée de Pi par le côté basolatéral de la cellule sont encore incertains.

Bien avant l'identification moléculaire des transporteurs de Pi, différentes études *in vivo* (clearances, microponctions) et *in vitro* (microperfusions tubulaires, fractionnement cellulaire, culture des cellules tubulaires, microvésicules reconstituées à partir de la membrane) ont suggéré qu'un cotransporteur de Na-Pi localisé dans la bordure en brosse rénale déterminait le taux de transport transépithélial au niveau du tubule proximal et était la cible des altérations physiologiques/pathophysiologiques de la réabsorption de Pi (révisé par Murer et Biber, 1992). Il a été démontré que les propriétés de ces cotransporteurs étaient en conformité avec la cinétique de Michaelis-Menten, quantifiées par une constante d'affinité (K_m) pour Pi avec Na, par une capacité de transport limitée ou saturable (V_{max}) et par un transport dirigé par un gradient de concentration intracellulaire de

Na. Récemment, différents cotransporteurs Na-Pi de haute affinité et basse capacité ont été clonés et sous-classés en trois familles ou sous-types.

B.1.2.1.1) Variétés moléculaires des transporteurs de Pi

Le premier ADNc des transporteurs de Pi, appelé NaPi-1, a été isolé à partir de rein de lapin par la technique de clonage et expression (“expression cloning”) dans les oocytes de *Xenopus laevis* en 1991 (Werner *et al.*, 1991). Cette découverte a été suivie par celle de deux autres transporteurs, NaPi-2 et NaPi-3, isolés à partir de librairies d’ADNc de cortex rénal de rat et humain respectivement (Mangagnin *et al.*, 1993). Les comparaisons de séquences détaillées ainsi que les études d’expression indiquaient que NaPi-1 et NaPi-2/3 étaient des protéines différentes, fait qui a suggéré l’existence des sous-classes de ces transporteurs rénaux de Pi, et la dénomination de ces sous-classes en Type I (NaPi-1) et Type II (NaPi-2/3) (Murer et Biber, 1994 et 1996). Des homologues de NaPi-1, donc transporteurs de Type I, ont été identifiés, soit dans les reins chez l’Homme (NPT1; Chong *et al.*, 1993), le rat (rNaPi-1; Li *et al.*, 1995) et la souris (Npt-1; Chong *et al.*, 1995), soit dans le cerveau chez le rat (rBNPI; Ni *et al.*, 1993 et 1995) et l’Homme (hBNPI; Ni *et al.*, 1996). Des homologues de NaPi-2/3, donc transporteurs de Type II, ont été isolés à partir des cellules de rein d’opossum (NaPi-4; Sorribas *et al.*, 1994), des cellules épithéliales de rein bovin, NBL-1 (Helps *et al.*, 1995), de l’intestin et rein du carrelet (NaPi-5; Werner *et al.*, 1994; Kohl *et al.*, 1996), de rein de lapin (NaPi-6; Verri *et al.*, 1995) et de rein de souris (NaPi-7; Collins et Ghishan, 1994; Hartmann *et al.*, 1995). Deux autres cotransporteurs de Pi, classifiés comme NaPi Type III, ont été récemment identifiés: *Glvr-1*, le récepteur du virus B de la leucémie féline et du singe gibbon, et *Ram-1*, le récepteur du virus de la leucémie murine (PiT-1 et PiT-2, respectivement; Olah *et al.*, 1994; Kavanaugh *et al.*, 1994; Kavanaugh et Kabat, 1996).

B.1.2.1.1.1) Le transporteur NaPi Type I

Les protéines de la famille du transporteur NaPi Type I (NaPi-I) sont présentes au niveau des reins, du foie et du cerveau, et possèdent environ 60-64 kDa

de poids moléculaire pour 465-476 résidus d'acides aminés. Bien que leur topologie membranaire n'ait jamais été démontrée expérimentalement, il a été proposé qu'elles traversent la membrane plasmique 6 à 10 fois. Par rapport à leurs propriétés fonctionnelles, il n'a pas été possible d'établir avec certitude leur rôle exact jusqu'à présent. Une activité de cotransport Na-Pi a été rapportée pour le clone humain et celui de rat, en contraste avec le clone de lapin, mais des données récentes suggèrent qu'il pourrait aussi se comporter comme un canal anionique perméable au chlore et à d'autres anions organiques (Murer *et al.*, 1994; Verri *et al.*, 1995; Quabius *et al.*, 1995; Busch *et al.*, 1996). Ceci a suggéré l'hypothèse que le NaPi-I soit une protéine bifonctionnelle (un transporteur de Pi et un canal de conductance anionique).

L'importance physiologique de protéines NaPi-I n'est pas non plus évidente. Plusieurs études ont écarté un rôle fondamental de ces transporteurs dans la régulation de l'homéostasie corporelle du Pi (Li *et al.*, 1996; Tenenhouse *et al.*, 1998). Cependant, une corrélation entre les niveaux de NaPi-I et le métabolisme du glucose dans le foie de rat a été rapportée, suggérant l'hypothèse que le NaPi-I puisse servir à combler la grande demande de Pi dans le foie, les reins et le cerveau, organes possédant un très haut niveau de métabolisme glucidique (Li *et al.*, 1996).

B.1.2.1.1.2) Le transporteur NaPi Type II

Peu de temps après son identification, des évidences fonctionnelles et physiologiques ont établi le rôle dominant des protéines de cette famille dans la réabsorption de Pi. Des sondes d'acides nucléiques et/ou l'anti-sérum dérivé d'immunisations avec des peptides synthétiques ont été utilisés pour quantifier les niveaux des ARNm et des protéines NaPi-II en réponse à des altérations physiologiques (Levi *et al.*, 1994; Kempson *et al.*, 1995). Des techniques d'immunohistochimie ont été employées pour démontrer leur localisation apicale restreinte aux bordures en brosse des tubules proximaux rénaux (Custer *et al.*, 1994). Récemment, l'expression intestinale de NaPi-II a été démontrée chez la souris (Tenenhouse *et al.*, 1998).

Les protéines NaPi-II comportent environ 650 acides aminés pour une masse de 80-90 kDa et contiennent des sites de N-glycosylation et des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C. La liaison avec le Pi est en conformité avec la cinétique de Michaelis-Menten, avec un K_m entre 20 à 100 $\mu\text{mol/l}$ selon l'espèce étudiée. Le sodium agit d'une façon coopérative avec le transporteur à une stoechiométrie de 3 Na^+ pour 1 Pi, et les protons diminuent l'affinité du transporteur pour le Na^+ , illustrant la dépendance caractéristique de la réabsorption de Pi au pH (Busch *et al.*, 1994; révisé par Werner *et al.*, 1998). Bien que la topologie des protéines NaPi-II soit extrêmement difficile à "investiguer", un modèle d'une protéine avec 8 domaines transmembranaires a été suggéré (Figure 7). Trois de ces régions ont été démontrées expérimentalement comme faisant partie des domaines cytoplasmique ou extracellulaire. La grande boucle entre les régions hydrophobes 3 et 4 est glycosylée, donc extracellulaire (Hayes *et al.*, 1994), pendant que les extrémités N et C-terminales sont intracytoplasmiques (Kohl *et al.*, 1998).

En ce qui concerne la modulation de l'expression de transporteurs NaPi-II, il a été démontré que les niveaux plasmatiques de PTH et les taux d'ingestion de Pi sont des facteurs régulateurs primordiaux (Levi *et al.*, 1994; Kempson *et al.*, 1995; révisé par Murer *et al.*, 1998). La PTH est un inhibiteur très puissant du cotransporteur NaPi-II, ses effets étant associés à la réduction de la V_{max} du cotransport de sodium et phosphate par la bordure en brosse rénale, ainsi qu'à l'endocytose suivie de la digestion du cotransporteur dans les lysosomes. Le retour au niveau normal des transporteurs après une inhibition par la PTH requiert une synthèse *de novo* des protéines. La privation chronique de Pi induit une réponse adaptative très complexe qui aboutit à une augmentation de l'expression de NaPi-II (ARNm et protéine). L'effet contraire peut être observé lors d'une surcharge de Pi.

Récemment, le rôle fondamental des transporteurs NaPi-II dans l'homéostasie du Pi a été démontré par l'inactivation du gène *Npt2* chez la souris (Beck *et al.*, 1998). Les mutants homozygotes (*Npt2*^{-/-}) présentent une hyperphosphaturie, une hypophosphatémie, une augmentation appropriée de la concentration sérique de 1,25(OH)₂D₃, suivie d'hypercalcémie, d'hypercalciurie et des niveaux de PTH plasmatique réduits. Par rapport au développement du squelette, ces mutants

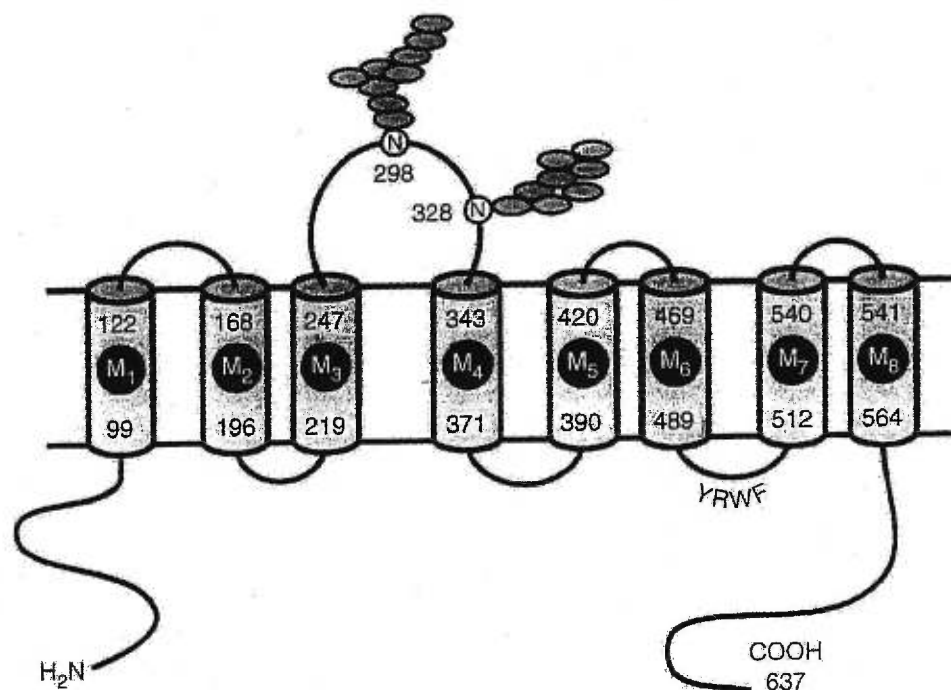


Figure 7. Représentation schématique du cotransporteur NaPi Type II (NaPi-2, rat; Murer *et al.*, 1998).

Les numéros indiquent les résidus d'acides aminés, et les deux sites de N-glycosylation connus sont aussi représentés.

présentaient, au moment du sevrage, des os trabéculaires peu développés et une ossification secondaire retardée. Cependant, ces anomalies disparaissaient avec le temps. Les animaux homozygotes (*Npt2^{-/-}*) n'ont jamais développé ni rachitisme ni ostéomalacie.

B.1.2.1.1.3) Le transporteur NaPi Type III

La plus récente famille de transporteurs NaPi a été à l'origine identifiée comme étant des récepteurs retroviraux (*Glv-1* et *Ram-1*; O'Hara *et al.*, 1990; van Zeijl *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994). Une identité de ~25% avec une possible perméase de Pi de *Neurospora crassa* a suggéré un rôle potentiel dans le transport de Pi pour ces protéines membranaires (Kavanaugh *et al.*, 1994). Il a été ensuite démontré que les deux récepteurs, *Glv-1* et *Ram-1*, induisent le transport de Pi d'une façon dépendante de Na⁺ après l'expression dans les oocytes de *Xenopus* (Kavanaugh *et al.*, 1994).

Les membres de la famille de protéines NaPi-III sont presque ubiquitaires (Kavanaugh *et al.*, 1994; Tenenhouse *et al.*, 1998) et présentent une topologie similaire avec deux domaines hydrophobes, qui croisent la membrane plasmique 5 à 6 fois, liés par un boucle hydrophile. Il a été suggéré que ces systèmes de transport soient impliqués dans la capture du Pi par de très nombreux types de cellules, rénales et non rénales. Le patron d'expression élargie ainsi que leur capacité à s'adapter à des altérations de la concentration extracellulaire de Pi a suggéré un rôle de protéines "housekeeping" pour NaPi-III au niveau cellulaire (Kavanaugh et Kabat, 1996; Werner *et al.*, 1998). Sa localisation cellulaire, basolatérale ou apicale, ainsi que la modulation de ce système de transport par les différentes voies de signalisation intracellulaires restent à déterminer.

B.2) Les désordres cliniques du transport de phosphate

La minéralisation des os dépend en grande partie d'une régulation appropriée de la disponibilité du phosphate inorganique (Pi) et du calcium (Ca). Pi et Ca sont les principaux constituants de l'hydroxyapatite, le composant minéral de l'os. Puisque Pi est une partie intégrante de la matrice osseuse, la déplétion de Pi associée à des concentrations très basses au niveau plasmatique et extracellulaire (hypophosphatémie), détermine des défauts de la minéralisation du squelette. La conséquence d'une hypophosphatémie chronique chez l'enfant est le rachitisme, alors que chez l'adulte c'est l'ostéomalacie. Les défauts de minéralisation sont traduits par une accumulation d'ostéoïde excessive à travers le squelette.

Les désordres cliniques associés au rachitisme et/ou à l'ostéomalacie hypophosphatémique peuvent être héréditaires ou acquis. Les formes héréditaires sont classifiées en deux groupes. Le premier rassemble les hypophosphatémies causées par une réponse anormale de l'organisme à la régulation par la vitamine D₃. De ce groupe font partie les désordres provenant de l'incapacité fonctionnelle ou d'un manque de l'enzyme rénale 1 α -hydroxylase, responsable pour la conversion de la forme hépatique de vitamine D (25-hydroxyvitamine D) en sa forme hormonale active, la vitamine D₃ [1,25(OH)₂D₃], ainsi que les désordres résultants des défauts au niveau du récepteur de la vitamine D₃. Le deuxième groupe des hypophosphatémies héréditaires est associé à une réabsorption anormale de Pi par les tubules rénaux, résultant dans la perte de Pi. Deux syndromes de ce groupe ont été bien caractérisés, le rachitisme familial hypophosphatémique, lié au chromosome X et résistant à la vitamine D₃ (HYP, XLH pour "X-linked hypophosphatemia"), et le rachitisme hypophosphatémique héréditaire autosomique avec hypercalciurie (HHRH). Les formes acquises d'hypophosphatémie seront représentées ici par l'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique (OHO), un syndrome rare associé à la présence d'une tumeur, et qui est caractérisé par des anomalies biochimiques et radiologiques très semblables à celles présentes chez des patients porteurs des ostéomalacies hypophosphatémiques héréditaires.

Pour une meilleure compréhension de cette thèse, le rachitisme familial hypophosphatémique, le rachitisme héréditaire autosomique avec hypercalciurie et l'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique seront décrits en plus de détails (Tableau III).

B.2.1) Le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X

Le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X (HYP, XLH, aussi connu comme rachitisme résistant à la vitamine D) est la forme la plus fréquente de plusieurs désordres Mendéliens de l'homéostasie du phosphate inorganique (Pi) (McKusick, 1994). Elle est transmise d'une façon dominante et sa fréquence est de 1:20000 naissances chez l'homme (révisé par Rasmussen et Tenenhouse, 1995; et par Tenenhouse, 1999). Le gène responsable de XLH a été récemment identifié et nommé PHEX pour "Phosphate regulating gene with homology to Endopeptidases on the X chromosome" (voir section A.1.2.2 de cette thèse).

B.2.1.1) Aspects cliniques et biochimiques de XLH

Les enfants porteurs de XLH présentent, avec une grande variabilité, un retard de croissance associé à une courbature fémorale et/ou tibiale, une hypophosphatémie bien établie, des niveaux plasmatiques de phosphatase alcaline élevés, des signaux radiologiques évidents de rachitisme ainsi qu'un retard de la dentition et des abcès dentaires périodiques dès leur première année. Avec la puberté et l'arrêt de la croissance des os, les signaux radiologiques d'ostéomalacie persistent, des pseudo-fractures se produisent, mais paradoxalement la masse totale de l'os augmente, due à un agrandissement important de la matrice osseuse minéralisée de manière incomplète. Outre les abcès dentaires spontanés et périodiques, les défauts de minéralisation de la dentine, impliquant la formation d'une dentine interglobulaire, associés à des chambres pulpaires élargies, sont des anomalies dentaires fréquentes chez ces patients (révisé par Rasmussen et Tenenhouse, 1995; et par Tenenhouse, 1999).

| | XLH | HHRH | OHO |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|----------|
| Inheritance | X-linked | AR | - |
| Age of onset | Early childhood | Early childhood | Any age |
| Clinical features | | | |
| Short stature | ++ | ++ | ++ |
| Bone pain | ++ | +++ | +++ |
| Femoral bowing | ++ | ++ | ++ |
| Muscle weakness | - | ++ | ++ |
| Radiologic signs | | | |
| Rickets | ++ | ++ | ++ |
| Pseudofracture | + | ++ | ++ |
| Coarse trabeculi | ++ | ++ | ++ |
| Dental abnormalities | ++ | ? | - |
| Calcium metabolism | | | |
| Serum Ca ²⁺ | N-LN | N-HN | N-LN |
| iPTH | N-HN | LN | N-HN |
| Ca _u | L | H | L |
| Ca absorption | L | H | L |
| Phosphate metabolism | | | |
| Serum phosphate | L | L | L |
| TmP/GFR | L | L | L |
| Alkaline phosphatase | H | H | H |
| Vitamin D metabolism | | | |
| Serum 25(OH)D | N | N | N |
| Serum 1,25(OH) ₂ D | N-LN | H | LN-L |
| 25(OH)D 1 α -hydroxylase | | | |
| Response to phosphate | Abnormal | Normal | Abnormal |

AR = autosomal recessive; N-LN = normal to low normal; iPTH = immunoreactive parathyroid hormone; N-HN = normal to high normal; LN = low normal; L = low; H = high; LN-L = low normal to low.

Tableau III. Comparaison entre les formes de rachitisme/ostéomalacie héréditaires et l'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique (Rasmussen et Tenenhouse, 1995).

Les altérations biochimiques de cette maladie sont, outre l'hypophosphatémie et l'augmentation des niveaux sériques de phosphatase alcaline, une normocalcémie ou légère hypocalcémie, des taux plasmatiques de PTH normaux ou légèrement augmentés, et des défauts combinés au niveau du rein, soit dans la réabsorption de Pi par des tubules proximaux (une TmP/GFR réduite), soit dans la régulation du métabolisme de la vitamine D (une concentration de vitamine D₃ normale ou normale basse, qui ne correspond pas aux niveaux d'hypophosphatémie présents dans cette condition).

B.2.1.2) La pathogenèse et les modèles animaux de XLH

Beaucoup de nos connaissances actuelles sur la pathophysiologie de XLH ont été dérivées d'études utilisant les homologues murines de la maladie humaine, les souris Hyp (Eicher *et al.*, 1976) et Gy (Lyon *et al.*, 1986). Ces souris sont différenciées de leurs frères normaux par leurs queues et membres postérieurs écourtés ainsi que par leur poids bas. La souris Hyp présente à peu près la même symptomatologie que les patients avec XLH et porte une délétion importante dans la région 3' du gène *Phex*, à partir de l'exon 16, mesurant de 18 à 33 kb de longueur (Beck *et al.*, 1997; Strom *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). Cette délétion comporte le site actif de l'enzyme et suggère une perte d'activité de *Phex* comme mécanisme physiopathologique de la mutation spontanée Hyp. La souris Gy, par contre, présente, en plus de la symptomatologie de la Hyp, une hyperactivité, des malformations de l'oreille interne et de la surdité, un comportement cyclique, la stérilité et une longévité plus courte (Lyon *et al.*, 1986). La mutation Gy, induite par radiation, est traduite au niveau moléculaire par une délétion génomique de 160 à 190 kb. Cette délétion comprend la partie 5' du gène *Phex*, où se trouvent les régions promotrices et les trois premiers exons, ainsi que le gène de l'enzyme spermine synthase, 39 kb en amont du gène *Phex* (Strom *et al.*, 1997; Lorenz *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1998). La délétion du gène de l'enzyme spermine synthase, en plus de celle de *Phex*, explique les différences de symptomatologie entre Hyp et Gy.

B.2.1.2.1) XLH/Hyp et le transport de phosphate

La corrélation entre la perte de fonction de PHEX/Phex chez les patients XLH/souris Hyp et Gy, et la non réabsorption de phosphate au niveau des reins n'est pas directe. La majorité des études concernant cette question a été réalisée avec les souris Hyp. Il a été démontré que le défaut dans la réabsorption de Pi chez ces mutants, localisé au niveau des tubules proximaux par des études de micropuncture (Giasson *et al.*, 1977 ; Cowgill *et al.*, 1979), persiste après une parathyroïdectomie, est spécifique pour le phosphate et implique une diminution de la V_{\max} d'un transporteur Na-Pi de haute affinité et basse capacité présent dans la bordure en brosse rénale (Tenenhouse *et al.*, 1978 et 1989). En essayant de comprendre le mécanisme impliqué dans la diminution de la V_{\max} de ce transporteur, des études ont démontré, premièrement, que l'affinité du transporteur pour le Na, le nombre de molécules de Na se liant au transporteur ainsi que la réponse du transporteur aux changements de pH étaient normales chez le mutant Hyp (Harvey et Tenenhouse, 1992). Ensuite, une réduction des cotransporteurs NaPi, de l'ordre de 50% pour ceux de Type II (Npt2) et de 20% pour ceux de Type I (Npt1) a été rapportée au niveau des ARNm et de la protéine (Tenenhouse *et al.*, 1994; Beck *et al.*, 1996; Tenenhouse et Beck, 1996; Tenenhouse *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent que le défaut dans la réabsorption de Pi chez les souris Hyp peut être attribué à une diminution du nombre des transporteurs NaPi de haute affinité dans la bordure en brosse rénale.

La corrélation entre la perte de fonction de Phex et la réduction de l'expression des gènes Npt1 et Npt2 chez le mutant Hyp n'est pas non plus évidente. Il a été suggéré que PHEX/Phex soit impliquée dans l'inactivation d'une hormone phosphaturique ou dans l'activation d'une hormone conservatrice de Pi (HYP Consortium, 1995; Econs et Francis, 1997). Par conséquent, une perte de fonction de PHEX/Phex pourrait être associée à un excès d'une hormone phosphaturique ou à un manque d'une autre conservatrice de Pi. Comme PHEX/Phex n'est pas exprimée dans les reins (Du *et al.*, 1996 ; Beck *et al.*, 1997 ; Ruchon *et al.*, 1998), le substrat ou le produit hypothétique de PHEX/Phex doit arriver aux reins par la circulation sanguine. En fait, multiples sont les évidences suggérant que le défaut dans le transport rénal de

Pi chez la souris Hyp est dû à la présence d'un facteur circulant anormal. Ces études seront résumées ci-dessous.

Des études de parabiose ont démontré que quand une souris Hyp est liée via la circulation à une souris normale, cette dernière développe une hypophosphatémie importante due à une diminution de la réabsorption de Pi, ce qui est indépendant de la présence de PTH (Meyer *et al.*, 1989a,b). Ces données suggèrent qu'un facteur humoral, dérivé de la souris Hyp, est en train de perfuser les reins de la souris normale. Devant le fait récemment découvert que la mutation Hyp affecte une peptidase, il n'est pas clair pourquoi la perte de Pi rénale demeure incorrigée par parabiose. Ceci peut s'expliquer par le fait que la protéine présente chez la souris normale n'aurait pas accès au facteur humoral dérivé de la Hyp. Cette possibilité est en accord avec le fait que Phex soit exprimée principalement dans les os et pas dans les reins (Du *et al.*, 1996; Beck *et al.*, 1997; Ruchon *et al.*, 1998).

Les expériences de transplantation rénale croisée entre les souris normales et Hyp supportent aussi l'hypothèse de la présence d'un facteur humoral chez les Hyp. Quand un rein d'une souris Hyp est transplanté chez une souris normale, il fonctionne très bien et l'animal ne développe pas d'hypophosphatémie. Par contre, chez un Hyp, le rein d'une souris normale ne réabsorbe pas de Pi efficacement et l'animal persiste avec l'hypophosphatémie (Nesbitt *et al.*, 1992). Ces données démontrent que le défaut chez le Hyp n'est ni corrigé ni transféré par une transplantation croisée des reins, et impliquent aussi un facteur humoral comme responsable de la perte rénale de Pi. Il est important de mentionner ici qu'une transplantation pareille avait été réalisée chez l'homme, avec des résultats semblables (Morgan *et al.*, 1974).

L'évidence directe de la présence d'un facteur humoral responsable de l'inhibition du transport rénal de Pi chez la souris Hyp a été fournie par la démonstration que le sérum des souris Hyp, ainsi que le milieu de culture des ostéoblastes Hyp, inhibait le cotransport Na-Pi par des cellules rénales murines en culture primaire (Lajeunesse *et al.*, 1996). Ces données indiquent que les ostéoblastes Hyp sont responsables de la relâche et/ou de la modification d'un facteur humoral qui inhibe le cotransport Na-Pi par les cellules épithéliales rénales. La démonstration de

l'expression de *PheX* de préférence au niveau des os est consistante avec ces résultats (Beck *et al.*, 1997 ; Ruchon *et al.*, 1998).

Ces données suggèrent que *PheX* est responsable de la modulation de l'action d'un (ou des) facteur humoral qui contrôlerait la transcription des gènes des cotransporteurs Na-Pi au niveau des reins, et par conséquent la réabsorption de Pi.

B.2.1.2.2) XLH/Hyp et les défauts de minéralisation

La corrélation entre XLH/Hyp et les défauts de minéralisation des os a été attribuée à la sévérité de l'hypophosphatémie présente dans ces conditions, puisqu'une amélioration significative du rachitisme et de l'ostéomalacie avait été observée chez les patients XLH et les souris Hyp traités avec des doses de Pi et de 1,25(OH)₂D₃ (Marie *et al.*, 1989). Cependant, plusieurs études ultérieures ont suggéré que la formation anormale des os, chez les Hyp, était déterminée non seulement par l'environnement hypophosphatémique, mais aussi par un défaut intrinsèque de leurs ostéoblastes (Yoshikawa *et al.*, 1985; Ecarot-Charrier *et al.*, 1988; Ecarot *et al.*, 1992 a,b et 1995). Le fait que les cellules osseuses provenant de souris normales et Hyp produisent de l'os anormal après transplantation intramusculaire chez la souris mutante (Ecarot-Charrier *et al.*, 1988) ou chez une souris normale privée de Pi (Ecarot *et al.*, 1992b) suggère que la normophosphatémie contribue de manière significative à une bonne formation osseuse. Cependant, quand les cellules osseuses Hyp étaient transplantées chez des souris normales (Ecarot *et al.*, 1992a), ou chez des souris Hyp traitées avec Pi ou 1,25(OH)₂D₃ (Ecarot *et al.*, 1992b et 1995), les paramètres histomorphométriques de formation osseuse s'amélioraient beaucoup, mais n'étaient pas normaux en comparaison avec ceux obtenus à partir des cellules normales. Ces données supportent l'hypothèse que les cellules osseuses Hyp présentent un défaut de minéralisation intrinsèque qui n'est pas corrigé par un environnement extracellulaire normal.

Outre le rachitisme et l'ostéomalacie, les os des souris Hyp présentent des déformations angulaires plus sévères, ainsi qu'un ratio Ca/Pi plus élevé et une réduction de la teneur en carbonate (Camacho *et al.*, 1995). En plus, des cultures primaires d'ostéoblastes Hyp produisent plus de glucose à partir de divers substrats,

présentent une réduction du pH intracellulaire et de l'activité de l'enzyme caséine kinase II, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de l'ostéopontine (Rifas *et al.*, 1995 et 1997). Ces résultats sont aussi consistants avec une dysfonction intrinsèque des ostéoblastes Hyp.

Finalement, encore pour renforcer l'hypothèse d'un défaut intrinsèque des ostéoblastes Hyp, des études récentes ont démontré que les souris homozygotes pour la disruption du gène *Npt2*, qui code pour le cotransporteur NaPi II, ne développent ni rachitisme ni ostéomalacie, malgré la présence d'une hypophosphatémie significative (Beck *et al.*, 1998). En plus, des ostéoblastes Hyp immortalisés accumulent moins de Ca et présentent, en culture, un défaut de minéralisation des nodules d'os quand comparés à des ostéoblastes normaux immortalisés (Xiao *et al.*, 1999). La même étude a démontré la production d'un facteur par les ostéoblastes Hyp qui inhibe la minéralisation de la matrice osseuse par des ostéoblastes normaux.

B.2.1.2.3) XLH/Hyp et le métabolisme de la vitamine D

Les souris Hyp et Gy, ainsi que les patients XLH, exhibent une régulation anormale de la vitamine D. La concentration plasmatique de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ chez les souris mutantes est similaire à celle des souris normales, par conséquent improprement basse pour le degré d'hypophosphatémie (Meyer *et al.*, 1980 ; Tenenhouse et Jones, 1990). En plus, ces souris présentent une réduction paradoxale de la concentration sérique de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, conséquence d'une privation de Pi, ainsi qu'une augmentation aussi paradoxale de cette concentration à l'occasion d'un apport supplémentaire de Pi. Pourtant, chez les souris normales, les taux sériques de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ augmentent avec l'épuisement de Pi et ne s'altèrent pas après sa supplémentation (Meyer *et al.*, 1980; Tenenhouse et Jones, 1990).

Les réponses adaptatives paradoxales des souris mutantes Hyp et Gy aux altérations de la concentration sérique de Pi peuvent être expliquées par l'inhibition de l'enzyme rénale 1α -hydroxylase, responsable de la synthèse de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ainsi que par la stimulation de l'activité de l'enzyme 24-hydroxylase, responsable de la première réaction de la voie d'oxydation C-24 pour le catabolisme de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Tenenhouse et Jones, 1990; Roy *et al.*, 1994; Roy et Tenenhouse,

1996). En plus, la démonstration, chez les Hyp, d'une régulation anormale de l'enzyme 1α -hydroxylase soit par un déficit de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Tenenhouse, 1983; Tenenhouse, 1984), soit par une infusion de PTH (Nesbitt *et al.*, 1986), d'AMPc (Nesbitt *et al.*, 1989) ou de PTHrP (Nesbitt et Drezner, 1990) supporte l'hypothèse que la régulation de la synthèse et de la dégradation de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ est défectueuse chez ces animaux. Encore une fois, l'association avec le manque de fonction de Phex est indirect. Une possibilité serait la présence d'un facteur humoral, normalement traité par Phex, qui modulerait la synthèse et/ou la dégradation rénale de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

B.2.2) Le rachitisme héréditaire autosomique avec hypercalciurie

Cette maladie a été décrite pour la première fois chez une tribu de bédouins dont les membres se mariaient entre eux depuis plusieurs générations (Tieder *et al.*, 1985 et 1987 ; révisé par Rasmussen et Tenenhouse, 1995). Elle est héritée d'une façon autosomique récessive. Le phénotype des individus homozygotes pour la mutation génique est marquant et décrit comme rachitisme héréditaire autosomique avec hypercalciurie (HHRH), pendant que celui des hétérozygotes est incomplet et décrit comme Hypercalciurie Idiopathique (IH).

B.2.2.1) Aspects cliniques et biochimiques de HHRH/IH

La symptomatologie clinique des patients HHRH inclut douleur dans les os, malformations squelettiques, petite taille, faiblesse musculaire et des signaux radiologiques de rachitisme et d'ostéomalacie présents dès la petite enfance. Les altérations biochimiques comprennent une hypophosphatémie, une normocalcémie, des niveaux plasmatiques de PTH et des concentrations urinaires d'AMPc basses ou dans le limite inférieur de la normalité, des niveaux normaux de 25-hydroxyvitamine D et de 24,25-dihydroxyvitamine D sériques associés à des taux sériques de $1,25$ -dihydroxyvitamine D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] augmentés et à une hypercalciurie. Les biopsies osseuses des enfants HHRH démontrent une ostéomalacie évidente caractérisée par des fronts de minéralisation irréguliers, une remarquable augmentation de la couche d'ostéoïde et un temps de minéralisation prolongé (Gazit *et al.*, 1991). Une

corrélation inverse entre les concentrations de Pi plasmatiques et l'épaisseur de l'ostéoïde a été rapportée, suggérant que l'hypophosphatémie est le facteur déterminant de l'ostéomalacie chez ces patients (Gazit *et al.*, 1991).

Les patients IH sont apparemment normaux mais présentent des défauts métaboliques légers caractérisés par l'hypercalciurie, par une concentration de vitamine D₃ plasmatique augmentée et par des niveaux de Pi plasmatique légèrement diminués. Ils n'ont aucune évidence de maladie osseuse ou de retard de croissance.

B.2.2.2) La pathogénese de HHRH/IH

Les réponses physiologiques et biochimiques présentées par des porteurs de HHRH sont compatibles avec privation chronique de Pi. Cependant, l'hyperphosphaturie associée à une basse TmP/GFR (T_{max} de phosphate par unité de volume de l'ultra-filtrat glomérulaire) indiquent plutôt un défaut primaire au niveau de la réabsorption de Pi avec une augmentation consécutive de la synthèse de la vitamine D₃, hyperabsorption intestinale de Ca et Pi et une suppression de la sécrétion de PTH. Par la suite, une hypophosphatémie chronique importante s'installe étant responsable du retard de la minéralisation et de la croissance osseuses. Ce mécanisme pathogénique est supporté par le fait que les patients traités oralement avec des doses de phosphate présentent une inversion de la symptomatologie avec normalisation des paramètres biochimiques et radiologiques. Les biopsies osseuses des patients traités démontrent la guérison de l'ostéomalacie. Seulement la TmP/GFR persiste anormale.

Le gène responsable pour HHRH n'est pas encore connu. Plusieurs sont des candidats, y compris le gène *NPT2/Npt2*, qui code pour les transporteurs NaPi II chez l'homme et la souris, respectivement. Ce gène a été localisé dans le chromosome autosomique humain 5q35 (Kos *et al.*, 1994; McPherson *et al.*, 1997) et murin 13B (Zhang *et al.*, 1997). Récemment, la disruption du gène *Npt2* chez la souris a été rapportée (Beck *et al.*, 1998). Les souris homozygotes pour la mutation (*Npt2*^{-/-}) présentent une perte rénale de Pi importante, une hypophosphatémie, une hypercalciurie et des anomalies biochimiques similaires à celles retrouvées chez les patients HHRH. De plus, les hétérozygotes (*Npt2*^{+/-}) sont presque normales. Cependant, les altérations osseuses ne sont pas compatibles. Les observations

préliminaires démontrent que les mutants *Npt2^{-/-}* ne présentent ni rachitisme ni ostéomalacie, mais plutôt un défaut de la formation de l'os trabéculaire et une ossification secondaire retardée à la naissance, qui ont une tendance à la normalisation et même à une surcompensation avec le sevrage et la croissance. Des études futures seront nécessaires pour confirmer si les souris *Npt2^{-/-}* sont réellement un modèle animal pour le HHRH.

B.2.3) L'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique

L'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique (OHO) est un désordre acquis rare de l'homéostasie du phosphate caractérisé par la présence d'une tumeur, d'hypophosphatémie, de niveaux réduits de vitamine D₃ sérique et d'évidences cliniques et histologiques d'ostéomalacie (Ryan et Reiss, 1984 ; révisé par Nelson *et al.*, 1997). Suite à l'ablation chirurgicale de la tumeur, les anomalies cliniques et biochimiques de la maladie disparaissent (Ryan et Reiss, 1984; Hewison, 1994; Drezner, 1996) indiquant qu'elles seraient la conséquence de la sécrétion, par la tumeur, d'un (ou des) facteur humoral.

L'OHO demeure un des rares syndromes endocrines où l'hormone produite anormalement reste inconnue. Parmi tous les syndromes associés à une hypophosphatémie, l'OHO ressemble le plus au rachitisme familial hypophosphatémique (XLH) et il a été suggéré que la perte de phosphate dans ces deux conditions était produite par le même facteur phosphaturique, qui a été nommé phosphatonine (Econs et Drezner, 1994).

B.2.3.1) Aspects cliniques et biochimiques de l'OHO

Les patients porteurs d'OHO présentent une symptomatologie vague qui se caractérise par des douleurs généralisées, une faiblesse musculaire, des fractures osseuses périodiques et des difficultés à marcher (Ryan et Reiss, 1984; Schapira *et al.*, 1995). Cette présentation clinique peut être confondue avec celle de plusieurs autres conditions, y compris l'arthrite rhumatoïde, la dystrophie musculaire ou des désordres psychiatriques (Ryan et Reiss, 1984).

Les anomalies biochimiques typiques de l'OHO sont l'hypophosphatémie et

l'hyperphosphaturie, dues à une diminution de la réabsorption tubulaire de P_i , et des concentrations sériques basses ou non détectées de la vitamine D_3 [$1,25(OH)_2D$], malgré des niveaux sériques normaux de $25OHD$ et de $24,25(OH)_2D$ (Cheng *et al.*, 1989; Drezner, 1996). Les niveaux de la phosphatase alcaline sont élevés et les concentrations sériques de Ca et PTH normales chez la majorité des patients (Weidner, 1991).

L'OHO demeure un problème diagnostique pour les cliniciens à cause des difficultés à trouver des tumeurs en général de petite taille et de localisation peu communes ("strange tumors in strange places", Weiss *et al.*, 1985), de croissance très lente, la majorité d'histologie bénigne et d'origine mesenchymateuse, classifiées de façon générale en tumeurs mixtes du tissu conjonctif, ou en tumeurs apparentées aux ostéoblastomes et aux fibromes, ossifiants ou non (Weidner et Santa Cruz, 1987).

B.2.3.2) La pathogenèse de l'OHO

L'observation que l'ablation de la tumeur impliquait la disparition de la symptomatologie clinique et des anomalies biochimiques chez les patients OHO a suggéré l'hypothèse que la tumeur était responsable de la production d'un facteur, ou des facteurs, conduisant à la perte rénale de phosphate et par conséquent à l'hypophosphatémie et l'ostéomalacie. Le même facteur ou un autre inhiberait l'activité de l'enzyme rénale 1α -hydroxylase, qui catalyse la formation de $1,25(OH)_2D_3$ (vitamine D_3), la forme active de la vitamine D , à partir de la $25OHD$ hépatique. Plusieurs expériences avaient démontré la présence de phosphaturie *in vivo*, après l'injection d'extraits de tumeur chez le chien (Aschinberg *et al.*, 1977), la souris (Lau *et al.*, 1979) et le rat (Popovtzer, 1981), ainsi que le développement d'hypophosphatémie et de phosphaturie après l'hétérotransplantation de tissu tumorale chez des souris athymiques (Drezner *et al.*, 1982; Nitzan *et al.*, 1989). En plus, des études récentes ont rapporté l'inhibition du transport de P_i chez les cellules de rein d'opossum (OK) par le milieu de culture de cellules de ces tumeurs (Cai *et al.*, 1994; Wilkins *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1996). Toutes ces études ont indiqué l'existence d'un facteur humoral qui serait sécrété par des cellules tumorales et agirait directement en inhibant la réabsorption de P_i par des cellules rénales. Le nom

phosphatonin a été suggéré pour ce facteur inhibiteur spécifique du transport de Pi (Econs et Drezner, 1994). La réduction de l'activité de l'enzyme 1α -hydroxylase a aussi été démontrée *in vivo* chez des souris transplantées avec la tumeur (Drezner *et al.*, 1982) et *in vitro* en cultures primaires de cellules rénales traitées avec des extraits tumoraux (Miyachi *et al.*, 1988).

L'identification de ce facteur phosphaturique hypothétique n'a pas été réalisée jusqu'à présent. Cependant, la démonstration que l'activité des extraits tumoraux était sensible à la chaleur et insoluble dans les lipides (Miyachi *et al.*, 1988), et que l'activité présente dans le milieu de culture des cellules tumorales était aussi sensible à la chaleur et à la dégradation par la trypsine (Wilkins *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1996a) indiquaient que le facteur devrait être un peptide.

Multiplés sont les groupes qui cherchent à identifier l'hormone inconnue responsable de l'OHO. Une immunoréactivité apparentée à PTH dans le milieu de culture a été décrite, bien que des dilutions en séries excluent la possibilité qu'elle soit due à la vraie PTH ou à un de ses fragments N-terminaux (Cai *et al.*, 1994). Des indications que l'hormone responsable de l'OHO agirait via des récepteurs de PTH/PTHrP ont aussi été rapportées (Seshadri *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1996a). Cependant, d'autres études n'ont pas réussi à détecter PTH ou PTHrP dans le milieu de culture de tumeurs par des méthodes immunologiques (Wilkins *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 1996a), ni par l'analyse à la Northern des ARNm préparés à partir des cellules tumorales en culture (Nelson *et al.*, 1996a). Ces données suggèrent que, malgré des similitudes qui lui permettent d'agir via des récepteurs PTH/PTHrP, l'hormone responsable de l'OHO n'est ni PTH, ni PTHrP.

(C) Le tissu osseux

Le tissu osseux est le constituant principal de l'os; il est d'origine mésenchymateuse et sa matrice extracellulaire est imprégnée de sels minéraux cristallisés qui la rendent rigide et imperméable. Malgré son apparence pierreuse, le tissu osseux est parfaitement vivant et en perpétuel remaniement. Il renferme quatre type de cellules: les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes de l'os ("lining cells") et les ostéoclastes. La croissance de l'os se fait par apposition de matrice et le renouvellement implique la destruction préalable du tissu osseux. Ce tissu constitue la charpente de l'organisme et protège des organes fragiles tel que le système nerveux central. De plus, il renferme la moëlle osseuse, source des cellules lympho et hématopoïétiques, et intervient dans le métabolisme du calcium et du phosphate.

C.1) Organisation du tissu osseux

La structure d'un os n'est pas homogène (Figure 8). À l'oeil nu, on distingue des régions formées d'un tissu plein, l'os compact, et d'autres où existent de très nombreuses cavités séparées par de minces travées osseuses, correspondant à l'os spongieux. Un os long comporte une partie médiane, la diaphyse, deux extrémités plus ou moins élargies, les épiphyses, et les plaques de croissance au niveau des métaphyses, qui séparent les épiphyses de la diaphyse et sont responsables de la croissance longitudinale de l'os. La diaphyse comporte, chez l'homme et les grands mammifères, une cavité centrale remplie d'un tissu jaunâtre, très riche en graisse, la moëlle osseuse jaune. Dans les épiphyses, il n'y a pas de grande cavité centrale, mais un tissu constitué de fines travées osseuses d'os spongieux, dont les cavités sont remplies de moëlle osseuse rouge hématopoïétique. Les travées ne sont pas disposées au hasard, mais selon des forces de pression et de traction qui s'exercent sur l'os. L'os est revêtu, sur la surface externe, d'un tissu conjonctif, le périoste, et sur la surface interne par une fine membrane appelée endoste. Le périoste et l'endoste contiennent, en plus des fibroblastes, des cellules ostéoprogénitrices.

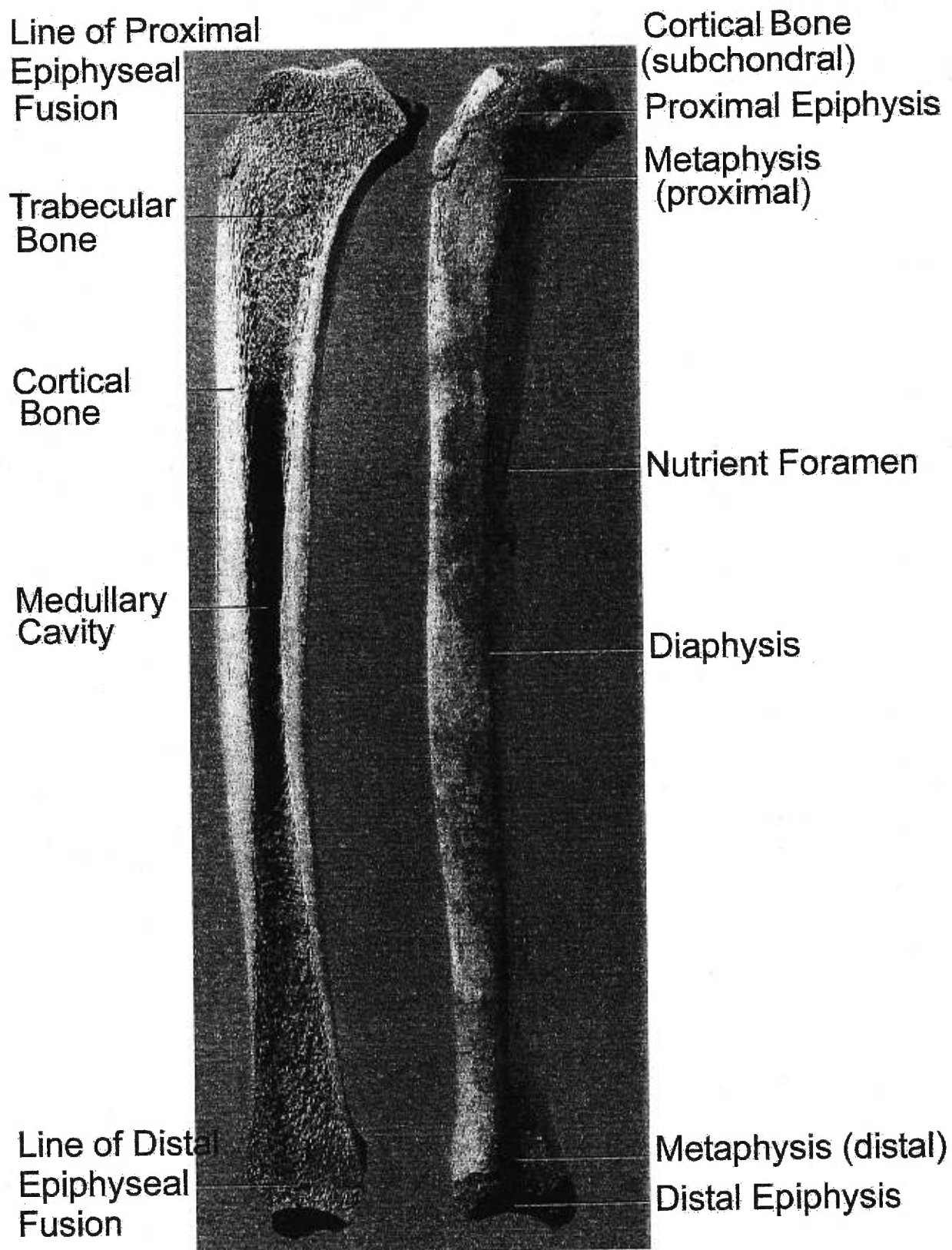


Figure 8 - Anatomie macroscopique d'un os long humain (Tibia; White et Folkens, 1991)

C.2) Histogénèse du tissu osseux

L'os est élaboré par les ostéoblastes au cours du processus de l'ossification. Celle-ci est dite primaire lorsque l'os remplace un autre type de tissu, et secondaire lorsqu'il s'agit de remaniement osseux.

C.2.1) Ossification primaire

Le processus d'ossification primaire est dit intraconjonctif quand l'os remplace directement un tissu conjonctif, et endochondrale quand un modèle cartilagineux est utilisé. L'ossification intraconjonctive peut encore être classifiée comme périostique ou intramembranaire.

C.2.1.1) Ossification intraconjonctive périostique

Dans l'ossification périostique, les ostéoblastes disposés à la surface de l'os apposent de nouvelles couches d'ostéoïde. Le périoste est lentement envahi, mais de nouvelles cellules conjonctives le reconstituent. L'ossification périostique est responsable pour la croissance des os plats et pour celle en largeur des os longs. Un phénomène identique survient sur la face endostéale, mais il est masqué par l'activité prédominante des ostéoclastes.

C.2.1.2) Ossification intraconjonctive intramembranaire

Au cours de l'ossification intramembranaire, certaines régions du mésenchyme embryonnaire, comme celles qui constituent le revêtement crânien, sont le siège d'un processus d'ossification qui débute avec l'arrivée de la vascularisation, suivi de la prolifération des cellules mésenchymateuses progénitrices qui se condensent et se différencient directement en cellules de la lignée ostéoblastique.

C.2.1.3) Ossification endochondrale

Dans l'ossification endochondrale, les progéniteurs mésenchymateux se différencient d'abord en cartilage et celui-ci est postérieurement remplacé par le tissu osseux. Pendant le développement, c'est l'arrivée d'éléments vasculaires qui paraît responsable du déclenchement de l'ossification. Des bourgeons conjonctivo-

vasculaires, constitués de gros capillaires entourés d'un tissu conjonctif riche en cellules ostéoprogénitrices, pénètrent dans le cartilage. À distance du front de vascularisation, les chondrocytes se divisent activement, formant la zone de cartilage sérié. Plus près des vaisseaux, les chondrocytes augmentent de taille formant la zone de cartilage hypertrophié, suivi d'une zone de cartilage calcifié, dont les cellules meurent. Cette région, au contact du front vasculaire, est détruite par des ostéoclastes et colonisée par des ostéoblastes qui déposent la matrice ostéoïde endochondrale primaire. L'ossification endochondrale est responsable de la formation de la majorité des os de l'organisme, soit des os longs du squelette appendiculaire, soit les vertèbres du squelette axial, et durant la vie postnatale elle se produit principalement dans les métaphyses et a pour principale conséquence la croissance longitudinale de l'os.

C.2.2) Ossification secondaire

Le remaniement osseux, ou ossification secondaire, est le remplacement d'un os existant par un nouveau tissu osseux après destruction par les ostéoclastes. Tous les os de l'organisme sont perpétuellement remaniés.

C.3) Les cellules du tissu osseux

La morphogénèse et la restructuration de l'os est la conséquence de l'activité intégrée des ostéoblastes et des ostéoclastes, qui coordonne la résorption et la formation osseuse (Figure 9). Les ostéoblastes, dont certains s'enferment dans la matrice et deviennent des ostéocytes, sont les responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire de l'os. La destruction osseuse nécessaire au remaniement de celui-ci est le fait des ostéoclastes, cellules d'origine hémopoïétique. Il existe, en outre, dans le tissu osseux, des cellules souches (cellules mésenchymateuses multipotentes et aussi des ostéoprogénitrices) et des cellules dites bordantes de l'os, dont le rôle est mal connu.

C 3.1) La lignée ostéoblastique

Les surfaces externes et internes de l'os sont presque partout recouvertes d'une couche des cellules prismatiques, qui sont des ostéoblastes typiques, ou par des

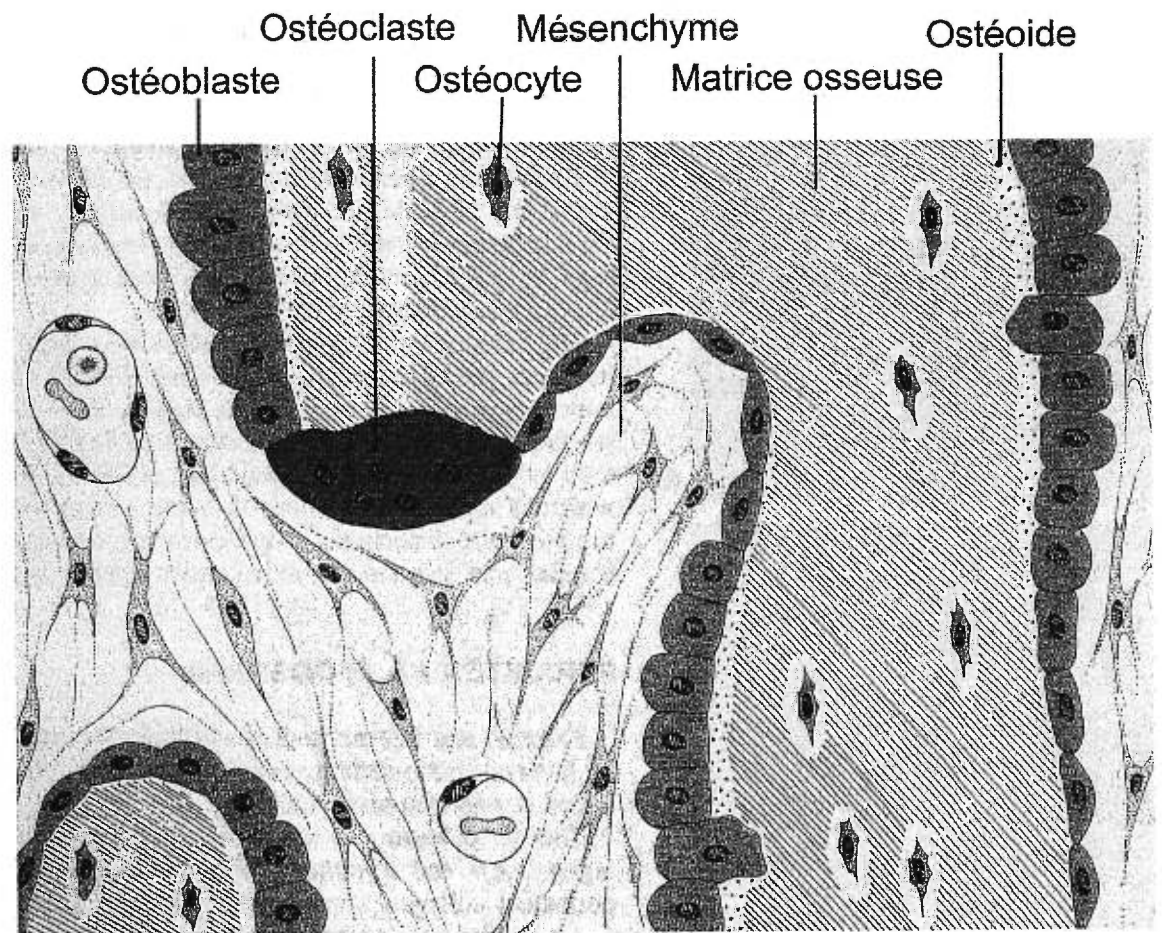


Figure 9 -Représentation schématique de l'histologie d'une trabécule osseuse pendant le processus d'ossification intramembranaire.

cellules aplaties, minces et allongées, avec très peu d'organites, appelés cellules bordantes de l'os. Ces dernières, considérées comme des ostéoblastes à la fin de leur période productive, n'ont pas une activité importante de synthèse. La formation osseuse est assurée par les ostéoblastes, cellules nettement polarisées, qui semblent travailler d'une façon coordonnée en déposant la matrice extracellulaire seulement de leur côté apical. En plus de participer à la synthèse de la matrice extracellulaire, les ostéoblastes agissent, d'une manière encore mal comprise au niveau moléculaire, à la régulation de la déposition et de la minéralisation de celle-la. Histologiquement, les ostéoblastes matures forment une palissade de cellules cuboïdes, chacune d'une largeur de 20 à 30 μm , avec un noyau oval, rejeté au pôle basal, non sécréteur, et des prolongements cytoplasmiques du côté apical, qui s'enfoncent dans la matrice osseuse et communiquent, à travers des systèmes de jonctions membranaire de type gap (Jeansonne *et al.*, 1979; Doty, 1981), avec des prolongements des ostéocytes ou des cellules bordantes de l'os. Les ostéocytes, des cellules étoilées ou fusiformes, sont considérées comme des anciens ostéoblastes qui ont été enfermés dans la matrice. Ils sont bien placés pour détecter des changements relatifs à une déformation mécanique de l'os, et il a été suggéré qu'ils participent à la réception et traduction du stimulus mécanique, ainsi qu'à la manutention de la matrice osseuse (Aarden *et al.*, 1994). La présence des jonctions de type gap entre les cellules de la lignée ostéoblastique a été aussi visualisée en culture (Schirmacher *et al.*, 1992; Yamaguchi *et al.*, 1994), et il a été suggéré qu'elles pouvaient expliquer l'activité coordonnée des ces cellules pendant le cycle de remodelage osseux, la régulation de l'activité des ostéoblastes par des signaux agissant au niveau des ostéocytes, ainsi que l'implication de plusieurs cellules en réponse à des signaux spécifiques, même si seulement quelques-unes sont capables de les détecter.

C.3.1.1) Embryologie de la lignée ostéoblastique

Embryologiquement, les ostéoblastes dérivent de deux sources distinctes, soit des cellules des crêtes neurales, d'origine ectodermique et responsable de la formation du cartilage, de l'os, des odontoblastes et du tissu conjonctif du squelette craniofacial, soit du mésoderme des sommites qui forment la contrepartie du squelette

axial postcranial et appendiculaire. Ces deux types d'ostéoblastes dérivent de cellules progénitrices multipotentes capables de donner naissance aussi aux chondroblastes, aux fibroblastes, aux myoblastes et aux adipocytes (Grigoriadis *et al.*, 1988). Ensuite, par une séquence d'événements largement inconnue encore, une restriction de lignée cellulaire se produit avec la formation de cellules progénitrices compromises en lignées ostéochondrogéniques (Ashton *et al.*, 1980; Aubin *et al.*, 1993) et postérieurement ostéogéniques (Aubin *et al.*, 1993 et 1995) (Figure 10). Des études récentes utilisant des approches génétiques et moléculaires ont démontré que le patron squelettique de différenciation et de croissance est soumis à un strict contrôle génétique qui implique la régulation de l'expression d'une grande quantité de gènes, comme, par exemple, des gènes homéobox, des BMPs ("bone morphogenetic proteins"), des facteurs de croissance et de différenciation, et des hormones (Erlebacher *et al.*, 1995; Jacenko *et al.*, 1994; Desbois *et al.*, 1995; Brickell, 1995).

C.3.1.2) Les cellules de la lignée ostéoblastique

Malgré son origine embryologique et le type d'ossification auquel il participe, le phénotype d'un ostéoblaste mature est établi par sa capacité de produire l'os. Par des critères morphologiques, histochimiques et dérivés des analyses de prolifération via incorporation de thymidine tritiée, quatre étapes de maturation du développement des ostéoblastes ont été identifiés dans l'os *in situ*: les préostéoblastes, les ostéoblastes, les ostéocytes et les cellules bordantes de l'os (Figure 10) (Aubin *et al.*, 1993, 1995). Les ostéoblastes sont des cellules postprolifératives, cuboïdes, fortement positives pour la phosphatase alcaline qui recouvrent la matrice osseuse dans les régions d'intense production d'ostéoïde. Ces cellules peuvent être reconnus aussi par leur répertoire de synthèse, soit des protéines de la matrice (collagène type I, phosphatase alcaline, ostéocalcine, ostéopontine, entre autres), soit certains récepteurs d'hormones (le récepteur de PTH/PTHrP, par exemple), soit des cytokines et des facteurs de croissance. Le préostéoblaste est le précurseur immédiat de l'ostéoblaste et est identifié par sa localisation dans les couches cellulaires adjacentes aux ostéoblastes, mais encore à l'intérieur du périoste et sans contact direct avec la matrice osseuse. Contrairement aux ostéoblastes, ils possèdent une capacité de

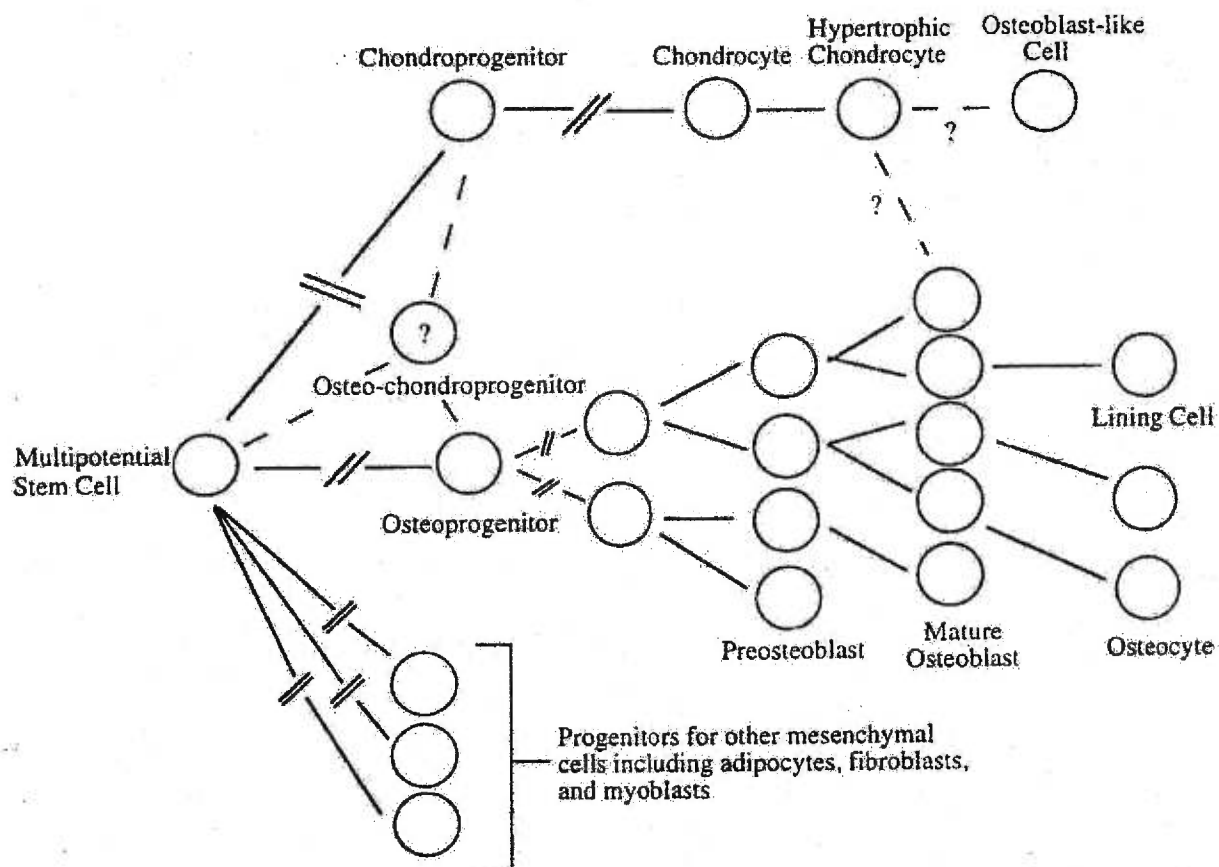


Figure 10 - Représentation schématique de la différenciation des ostéoblastes (Aubin *et al.*, 1995).

Les corrélations potentielles entre les lignées ostéoblastique et chondrogénique sont aussi indiquées.

prolifération, bien que limitée, ainsi qu'une capacité de synthèse réduite (collagène type I, phosphatase alcaline, ostéopontine). Une petite proportion (10 à 20%) des ostéoblastes est incorporée dans la matrice nouvellement formée et deviennent des ostéocytes, cellules postprolifératives avec une capacité de synthèse très limitée. Chez l'adulte, la majorité des surface osseuses quiescentes sont recouvertes par des cellules bordantes de l'os, considérées comme une forme d'ostéoblaste inactif par rapport à la production de la matrice, mais qui peuvent être réactivées par des signaux spécifiques, comme l'action locale de la parathormone (Dobnig and Turner, 1995; Dempster *et al.*, 1993). Les cellules bordantes ont aussi été impliquées dans la régulation de l'activité résorptive des ostéoclastes dans des régions de non résorption, en les empêchant d'avoir un contact direct avec la surface osseuse, ainsi que dans la phase initiale de la résorption osseuse, en dégradant l'ostéoïde dans la région à être résorbée par des ostéoclastes (Heersche et Kanehisa, 1988).

C.3.2) Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules volumineuses (50 à 100µm de diamètre), multinuclées (2 à 30 noyaux), observées à la surface de l'os et capables de détruire la matrice minéralisée. Ils sont caractérisés par l'expression abondante des récepteurs de l'hormone calcitonine (Lin *et al.*, 1991), d'une pompe à protons (H⁺-ATPase) membranaire (Blair *et al.*, 1989) et de la phosphatase acide résistant au tartrate (TRAP pour "tartrate-resistant acid phosphatase"; Ek-Rylander *et al.*, 1991). L'ostéoclaste a une durée de vie *in vivo* de deux semaines au maximum et une demi-vie de 6 à 10 jours (Loutit et Townsend, 1982) et conséquemment sa population a besoin d'être continuellement renouvelée pour assurer la résorption osseuse.

C.3.2.1) L'embryologie des ostéoclastes

Les ostéoclastes dérivent d'un précurseur hémoïétique, encore non identifié avec précision mais probablement de la lignée mononuclear phagocytaire (Loutit et Nisbet, 1982; Udagawa *et al.*, 1990; Fujikawa, 1996), qui, après un contact direct avec des cellules stromales de la moelle, se différencie en pré-ostéoclastes TRAP-positifs, et ensuite en ostéoclastes capables de résorber l'os. L'initiation de la

résorption osseuse requiert le recrutement des précurseurs des ostéoclastes, leur différenciation, ainsi que l'induction de l'activité résorptive dans la cellule mature nouvellement formée.

C.3.2.2) Mécanisme d'action des ostéoclastes

Pour réaliser sa fonction, l'ostéoclaste isole une région de l'os, un processus que implique l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Fisher *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1993; Crippes *et al.*, 1996). La surface cellulaire au contact de l'os présente une différenciation sous forme de bordure en brosse, qui, s'appuyant sur la surface osseuse, délimite une petite chambre où sont sécrétés l'HCl et autres substances lytiques responsables de la dissolution de la phase minérale de l'os (Blair, 1998). Le collagène est dégradé par la cathepsine K, une protéinase à thiol active à pH acide et produite en grande quantité par les ostéoclastes (Li *et al.*, 1995; Bossard *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1996). Les produits de la dégradation sont ensuite résorbés par transcytose (Nesbitt et Horton, 1997; Salo *et al.*, 1997).

C.3.3) Régulateurs de la fonction des cellules osseuses

Les ostéoblastes et les ostéoclastes sont régulés par une grande quantité de facteurs systémiques et locaux qui affectent le métabolisme osseux. Les facteurs systémiques classiques sont les hormones impliquées dans l'homéostasie du calcium, comme la PTH et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ainsi que la calcitonine (CT), les glucocorticoïdes, les hormones stéroïdes sexuels, l'hormone thyroïdienne et les rétinoïdes. Les facteurs locaux, comme ceux de différenciation et de croissance, les cytokines et les prostaglandines, peuvent moduler l'action des facteurs systémiques, ou encore agir de façon autocrine ou paracrine. Plusieurs facteurs ont été extraits de l'os, comme par exemple l'IGF I et II, le TGF β , le BMP, les FGF α et β , le PDGF, l'EGF, le M-CSF, entre autres, produits soit par des cellules osseuses, soit par des macrophages, lymphocytes, et d'autres cellules présentes dans l'environnement (révisé par Gowen, 1992; Suda *et al.*, 1996; et Canalis, 1996). Ces facteurs sont généralement multifonctionnels, leur effet est influencé par des interactions entre cellules ou entre les cellules et la matrice, ou encore par le degré de différenciation de la cellule. Tous

agissent sur des cellules osseuses en culture, quelques uns stimulent la formation de l'os *in vivo* (TGF β et BMP), d'autres jouent un rôle dans le développement (FGF et BMP) et d'autres encore sont impliqués dans la réparation des fractures (PDGF, FGF, TGF β). Cependant, aucun n'est spécifique de l'os. En plus, il a été démontré que d'autres médiateurs comme les enképhalines, la substance P et le α -CGRP, originaires des terminaisons nerveuses, ainsi que des peptides comme l'OGP ("osteogenic growth peptide") et certains peptides dérivés de la molécule de PTHrP, peuvent aussi participer à la régulation de l'activité des cellules osseuses (Kontinen *et al.*, 1996; Rosen *et al.*, 1998; Bab *et al.*, 1992; Bab, 1995; Karaplis et Vautour, 1997).

C.4) La matrice osseuse

La matrice osseuse est le produit de la sécrétion des cellules ostéoblastiques. Dix jours après sa déposition, elle est minéralisée et ensuite sert de support au squelette. À travers des actions coordonnées des ostéoblastes et des ostéoclastes, la matrice minéralisée, constituée à 80% de hydroxyapatite, $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{CaOH}_2$, sert de réservoir soit d'ions, soit de facteurs de croissance, qui sont libérés selon la demande métabolique.

C.4.1) Les protéines de la matrice osseuse

Au fur et à mesure que les techniques de dissection chimique des composants de la matrice osseuse minéralisée ont été développées, les composants structuraux majoritaires de la matrice osseuse ont été identifiés et caractérisés (Gehron, Bianco et Termine, 1992; Young *et al.*, 1993). La partie organique de la matrice est constituée de 90% de collagène et de 10% de protéines non-collagéniques.

C.4.1.1) Le collagène

Dans l'os, le collagène est presque entièrement de type I (Eyre, 1980) étant synthétisé comme procollagène, dont les deux extrémités, N et C-terminales, sont séparées du reste de la molécule avant l'incorporation dans les fibres de collagène. Ces propeptides, libérés de façon équimolaire à la production de molécules de

collagène, peuvent être mesurés en utilisant un radioimmunoassay (RIA) disponible commercialement et sont employés comme marqueurs biochimiques de la formation osseuse (Melkko *et al.*, 1990). La synthèse, sécrétion et déposition du collagène est coordonnée avec celle des protéines non-collagéniques et la déposition de l'hydroxyapatite est dépendante de la déposition correcte de ces protéines par des cellules de la lignée ostéoblastique.

C.4.1.2) Les protéines non-collagéniques

Les protéines non-collagéniques de la matrice sont regroupées en différentes classes, comme les protéoglycans (versican, decorin, biglycan), des glycoprotéines (phosphatase alcaline, ostéonectine, ostéocalcine), et des protéines de fixation à la matrice (thrombospondine, fibronectine, vitronectine, ostéopontine, sialoprotéine de l'os). L'ordre de déposition de ces protéines par les ostéoblastes change selon le degré de différenciation de ces cellules et selon l'état fonctionnel de chaque cellule dans une même étape de différenciation (Aubin *et al.*, 1993, 1995). Certaines sont retrouvées dans le plasma en cas de surplus, reflétant le métabolisme osseux et sont, pour cela, souvent utilisées en clinique comme marqueurs de l'état fonctionnel de l'os. Deux de ces protéines méritent une description plus détaillée, la phosphatase alcaline, un marqueur pan-ostéoblastique, et l'ostéocalcine, caractéristique des ostéoblastes et odontoblastes en plein état de synthèse et de déposition de matrice.

C.4.1.2.1) La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est impliquée dans la minéralisation de la matrice et est le marqueur de l'os le plus utilisé dans la clinique. Trois isoenzymes codées par différents gènes sont présentes dans le plasma: celle provenant des os, foie et reins, une intestinale et une autre placentaire (Weiss *et al.*, 1986). Le gène de l'isoenzyme présente dans les os, foie et reins, a été localisé sur le chromosome 1 (Weiss *et al.*, 1988). L'enzyme fonctionnelle est un dimère interlié par des ponts dissulfures, avec un poids moléculaire variant de 50 à 80 kDa selon le tissu et l'espèce d'origine (Fishman, 1990). Elle est associée à la membrane cellulaire par une ancre de type phosphoinositol (Noda *et al.*, 1987). Sa fonction dans le processus de minéralisation

est encore mal comprise. Cependant il a été démontré qu'elle augmente la concentration locale des ions phosphates par l'enlèvement de groupements phosphate d'autres protéines, et parallèlement elle hydrolyse le pyrophosphate inorganique, qui est un des inhibiteurs de la minéralisation (Wuthier et Register, 1985; révisé par Whyte, 1994). Des mutations résultant en perte de fonction de cette enzyme se traduisent par l'hypophosphatasia, caractérisée par l'ostéomalacie et le rachitisme, ce qui indique que la phosphatase alcaline est essentielle pour un processus de minéralisation normal (Charles *et al.*, 1992; révisé par Whyte, 1994).

C.4.1.2.2) L'ostéocalcine

L'ostéocalcine est la protéine non-collagénique la plus abondante de la matrice osseuse, responsable pour 1-2% des protéines totales de l'os (Hauschka *et al.*, 1975; Price *et al.*, 1976). Elle est produite presque exclusivement par des ostéoblastes et odontoblastes, et est considérée comme le marqueur le plus spécifique de l'activité des ostéoblastes (Aubin *et al.*, 1993, 1995). Elle est composée de 49 acides aminés, présente un poids moléculaire de 5,8 kDa, et est unique du fait qu'elle possède trois résidus d'acide glutamique capables d'être carboxylés en γ -carboxy acide glutamique par un processus dépendant de la vitamine K, ce qui dote la molécule d'une affinité très forte pour l'hydroxyapatite (Poser *et al.*, 1980). La sécrétion d'ostéocalcine est dépendante de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, qui augmente son expression génique (Morrison *et al.*, 1990). La signification physiologique de l'ostéocalcine est encore inconnue, mais sa structure est hautement conservée pendant l'évolution (Nishimoto et Price, 1985). L'ostéocalcine attire les précurseurs des ostéoclastes (Glowacki *et al.*, 1991), ce qui suggère qu'elle peut être impliquée dans la régulation de la résorption osseuse. L'étude des os des souris nulles pour l'ostéocalcine (Ducy *et al.*, 1994) ont fourni d'importantes pistes de son rôle physiologique. Ces souris minéralisent et résorbent l'os normalement, mais possèdent des ostéoblastes qui déposent une plus grande quantité de matrice extracellulaire. Par conséquent, les os de ces souris contiennent plus de matrice et de minéral et sont plus résistants que les os des souris normales. Ces résultats suggèrent l'hypothèse qu'un des rôles de l'ostéocalcine est de ralentir l'activité anabolique des ostéoblastes (Kronenberg, 1997).

La présence de l'ostéocalcine dans le plasma, consécutive à une synthèse *de novo* et soumise à une clearance rénale (Delmas *et al.*, 1983), est considérée par des cliniciens comme un marqueur de la formation osseuse. L'ostéocalcine sérique peut être mesurée en utilisant un RIA (radioimmunoassay) ou un ELISA (enzyme-linked adsorbent assay), les deux étant disponibles commercialement.

II) OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

La découverte du gène PHEX, apparenté avec les endopeptidases de la famille de la Néprilysine (The HYP Consortium, 1995), nous a incité à entreprendre une étude consacrée à un double but: (1) identifier la fonction de PHEX et (2) comprendre par quel mécanisme sa perte de fonction mène au rachitisme familial hypophosphatémique.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer la distribution tissulaire et l'ontogenèse de Phex par hybridation *in situ* (ISH). Nous avons décidé d'examiner un nombre maximal de tissus en utilisant des coupes histologiques d'embryons de souris à partir du 10^{ième} jour (e10) jusqu'à la naissance (e19) et aussi de souris nouveau-nées (p3 et p7). Ces études seront aussi complétées par l'utilisation de la technique d'hybridation de Northern. L'ensemble de ces travaux est présenté au deuxième chapitre de cette thèse (Ruchon *et al.*, 1998).

Après avoir déterminé la distribution des ARNm de Phex, nous avons étudié l'expression de la protéine chez la souris normale et son mutant Hyp. Nous avons utilisé un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine PHEX humaine, pour examiner par la technique de buvardage de type Western la présence de la protéine dans des extraits tissulaires d'os et de dents. Nous avons aussi utilisé cet anticorps pour examiner par immunohistochimie la distribution cellulaire de Phex dans ces tissus. Finalement, dans le but de déterminer si la perte de fonction de Phex avait des conséquences sur le processus de développement des ostéoblastes, nous avons

comparé par ISH, chez la souris normale et son mutant *Hyp*, l'expression de NEP, d'ostéocalcine et du récepteur de PTH/PTHrP. L'ensemble de ces travaux est présenté au troisième chapitre de cette thèse (Ruchon *et al.*, 2000, *J Bone Miner Res*, sous presse).

Au cours de nos études sur l'expression de Phex dans le tissu osseux, nous avons réalisé que NEP y était aussi exprimée. Nous avons donc décidé d'examiner le patron d'expression de NEP dans l'os, surtout au niveau des cellules ostéoblastiques, en utilisant principalement les techniques d'ISH et d'immunohistochimie. La présence de NEP dans l'os suggérait un rôle possible de cette enzyme dans la dégradation de peptides osseux. Nous avons donc testé la capacité de NEP d'hydrolyser, *in vitro*, une série de peptides ostéogéniques synthétiques comme le PTHrP₁₋₃₄ ("parathyroid hormone-related peptide"₁₋₃₄), l'ostéostatine (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉), l'OGP ("osteogenic growth peptide"), la calcitonine, le α -CGRP (" α -calcitonin gene-related peptide") et le PTH₁₋₃₄ ("parathyroid hormone 1-34"). L'ensemble de ces travaux sur la NEP dans le tissu osseux est présenté au quatrième chapitre de cette thèse (Ruchon *et al.*, 2000).

Lors de la mise en place d'une stratégie de RT-PCR afin d'obtenir une partie de l'ADNc de Phex de souris, nous nous sommes aperçus qu'en utilisant des régions de séquence très conservées parmi les membres de la famille de la NEP, nous pouvions dessiner des oligonucléotides dégénérés pour essayer de découvrir d'autres membres de cette famille. Cette stratégie a été testée en utilisant des ARNm de testicule de souris adulte et a abouti à la découverte d'un nouveau membre de la famille de la NEP, appelé NL1 pour "NEP-like 1". L'ensemble des travaux rapportant le clonage de son ADNc complet, sa caractérisation biochimique et enzymatique, ainsi que sa distribution tissulaire et cellulaire, est présenté au cinquième chapitre de cette thèse (Ghaddar *et al.*, 2000).

CHAPITRE 2 - ARTICLE

PEX mRNA IS LOCALIZED IN DEVELOPING MOUSE OSTEOBLASTS AND ODONTOBLASTS

Andréa Frota Ruchon, Mieczyslaw Marcinkiewicz, Géraldine Siegfried,
Harriet S. Tenenhouse, Luc DesGroseillers, Philippe Crine and Guy Boileau

J Histochem Cytochem **46**:459-468, 1998

SOMMAIRE

Cette étude a été entreprise dans le but de déterminer quels sont les types cellulaires exprimant le gène PHEX et de répertorier son ontogenèse. Ce gène, initialement appelé PEX (Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome), a été découvert à la suite des études génétiques sur le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X et son produit présente une forte homologie avec les membres de la famille des endopetidases (NEP, ECE et KELL), protéines membranaires de type II, comportant une courte queue cytoplasmique, un seul domaine transmembranaire et un long domaine extracellulaire, où se trouve le site actif de l'enzyme. La méthodologie utilisée a été celle de la localisation extensive des ARNm par hybridation *in situ* (ISH) et par Northern blot (NB).

Pour atteindre cet objectif, une partie de l'ADNc de Phex a été obtenue par RT-nested PCR à partir des ARNm testiculaires de souris, sous-clonée ensuite dans le plasmide pCRII. Le même plasmide a servi à confectionner les sondes d'ARNc marquées soit au ^{35}S pour l'ISH soit au ^{32}P pour le NB. Afin de cibler un nombre maximal de tissus, nous avons examiné des coupes histologiques des embryons de souris à partir du 10^{ème} jour (e10) jusqu'à la naissance (e19) et chez la souris postnatale (p3 et p7). Les résultats de l'ISH ont démontré la présence des ARNm de Phex dans les os des embryons à partir de e15, coïncidant avec la déposition de la matrice osseuse. L'examen à l'échelle microscopique a démontré avec plus de précision la présence de ARNm de Phex dans les ostéoblastes de squelette en formation et dans les odontoblastes des dents en développement. A la suite de l'ISH nous avons procédé à l'hybridation à la Northern de tissu osseux et dentaire de souris nouveau-nées et adultes. Dans ces tissus, un transcrit d'environ 7 kb a été détecté alors que les tissus contrôles (poumon, foie, thymus, cerveau) ont été tous négatifs.

En conclusion, nos résultats ont démontré, pour la première fois, la présence de l'ARNm de Phex dans les ostéoblastes et odontoblastes, au moins à partir du 15^{ième} jour du développement embryonnaire et suggèrent un rôle fonctionnel de Phex dans l'ossification et dans la formation de la dentine.

ARTICLE

Pex mRNA Is Localized in Developing Mouse Osteoblasts and Odontoblasts

Andréa Frota Ruchon, Mieczysław Marcinkiewicz, Géraldine Siegfried, Harriet S. Tenenhouse, Luc DesGroseillers, Philippe Crine, and Guy Boileau

Département de Biochimie (AFR,GS,LD,PC,GB) and Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire (MM), Institut de Recherches Cliniques de Montréal et Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada; Department of Pediatrics (HST), McGill University–Montreal Children's Hospital Research Institute and Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada; and Departamento de Morfologia (AFR), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

SUMMARY Mutations in PEX, a phosphate-regulating gene with homology to endopeptidase on the X chromosome, were recently identified in patients with X-linked hypophosphatemia (XLH), an inherited disorder of phosphate homeostasis characterized by growth retardation and rachitic and osteomalacic bone disease. To understand the mechanism by which loss of PEX function elicits the mutant phenotype, a study of its mRNA localization and ontogenesis was undertaken. Using the reverse transcriptase–nested polymerase chain reaction (RT-nested PCR) with polyA⁺ RNA purified from mouse testis, a 337-bp Pex cDNA fragment was generated and cloned in the pCRII plasmid. The cDNA was used to generate sense and anti-sense Pex riboprobes for in situ hybridization (ISH) and Northern analysis. To survey a large number of different tissues, sagittal sections of embryos and newborn mice were examined. ISH showed the presence of Pex mRNA in osteoblasts and odontoblasts. Pex gene expression was detectable on Day 15 of embryonic development, which coincides with the beginning of intercellular matrix deposition in bones. Finally, Northern analysis of total RNA from calvariae and teeth of 3-day-old and adult mice showed that the abundance of the 7-kb Pex transcript is decreased in adult bones and in nongrowing teeth. The present study demonstrates that Pex mRNA is expressed in bones and teeth and suggests that this putative endopeptidase plays an important role in the development of these tissues. (*J Histochem Cytochem* 46:459–468, 1998)

KEY WORDS

bone
 teeth
 extracellular matrix
 ontogenesis
 X-linked hypophosphatemia
 in situ hybridization
 Northern blot analysis

A POSITIONAL CLONING approach was recently used to identify PEX (Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome) as the candidate gene for X-linked hypophosphatemia (XLH) (The HYP Consortium 1995). XLH is a Mendelian disorder of phosphate homeostasis characterized by growth retardation, rachitic and osteomalacic bone disease, hypophosphatemia, and renal defects in phosphate reabsorption and vitamin D metabolism (Rasmussen and Tenenhouse 1995). Two mouse models, Hyp (Eicher et al. 1976) and Gy (Lyon et al. 1986), with phenotypic features that are similar to XLH pa-

tients have been described. In the Hyp mouse, the Pex gene harbors a deletion of its 3' end (Beck et al. 1997; Strom et al. 1997), whereas in the Gy mouse the promoter region and the first three exons are deleted (Strom et al. 1997). Studies of these mutant mice contributed greatly to our present understanding of the pathophysiology of the human disease.

Human and mouse PEX/Pex cDNAs have now been cloned and sequenced (Du et al. 1996; Beck et al. 1997; Guo and Quarles 1997; Strom et al. 1997). Amino acid sequence comparisons have demonstrated structural homologies between PEX/Pex and members of the neutral endopeptidase family as previously observed in the partial sequence of the candidate gene (The HYP Consortium 1995). The peptidases of the neutral endopeptidase family are Type II integral membrane glycoproteins with a relatively short cytoplasmic N-termi-

Correspondence to: Guy Boileau, Département de Biochimie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Qc, Canada H3C 3J7.

Received for publication July 15, 1997; accepted December 10, 1997 (7A4405).

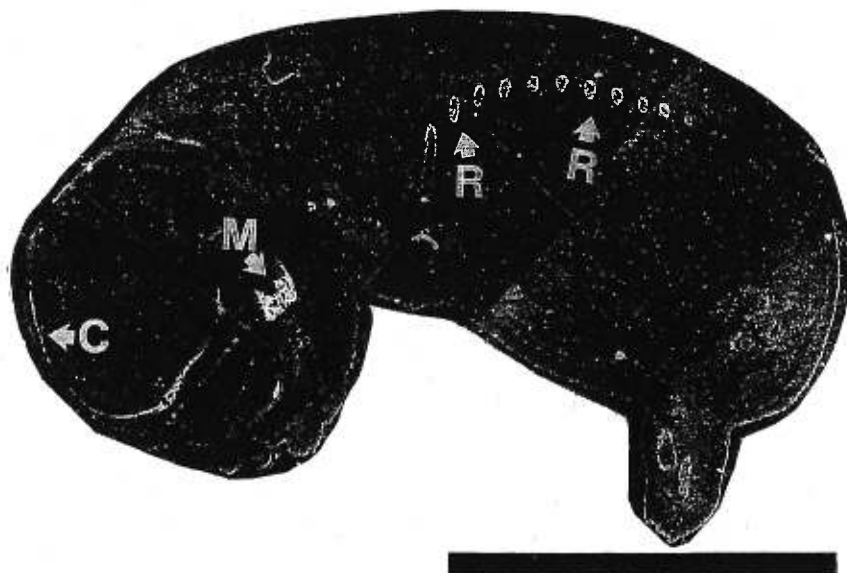


Figure 1 Emulsion autoradiography showing ISH pattern for Pex mRNA at the anatomic level in a sagittal section from a mouse embryo at e16. A significant concentration of Pex mRNA is seen in developing bones (arrows) including calvaria (C), mandible (M), and ribs (R). Bar = 1 cm.

nal region, a single transmembrane domain, and a long extracytoplasmic domain, which contains the active site of the enzyme. Known members of the neutral endopeptidase family include neutral endopeptidase-24.11 (NEP), endothelin-converting enzymes (ECEs), and the erythrocyte cell surface protein KELL (for a review see Turner and Tanzawa 1997). NEP [also known as nepilysin, common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA), CD10, or enkephalinase] is a widely distributed peptidase involved in the degradation of several bioactive peptides, such as the enkephalins, the atrial natriuretic peptides, and the endothelins (Turner and Tanzawa 1997). The ECEs are involved in the bioactivation of Big endothelins into endothelins, but no function has yet been attributed to KELL.

The mechanism by which loss of PEX function elicits the bone and renal abnormalities observed in XLH patients is not clear. There are no data suggesting the presence of PEX/Pex mRNA in the kidney (Du et al. 1996; Beck et al. 1997; Grieff et al. 1997). In contrast, PEX/Pex mRNA was detected in bones by Northern blot hybridization and in other adult and fetal tissues, such as lungs, liver, muscles, and ovaries by RT-PCR and RNase protection assays (Du et al. 1996; Beck et al. 1997).

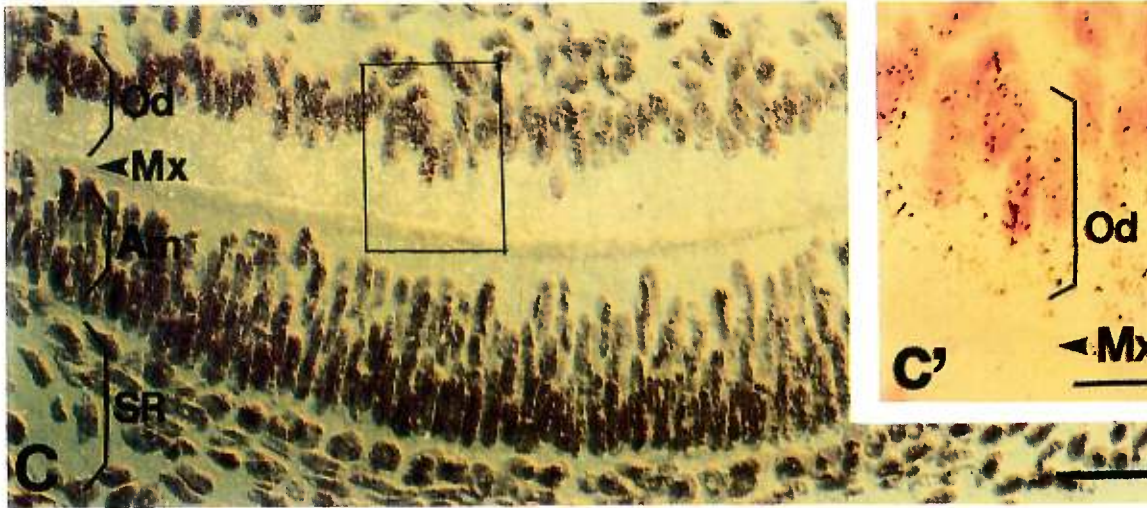
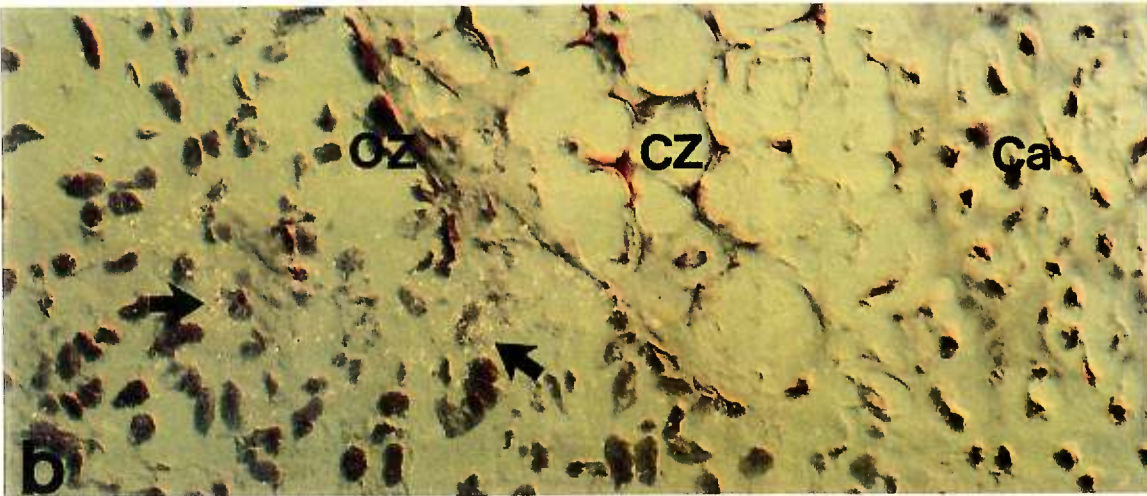
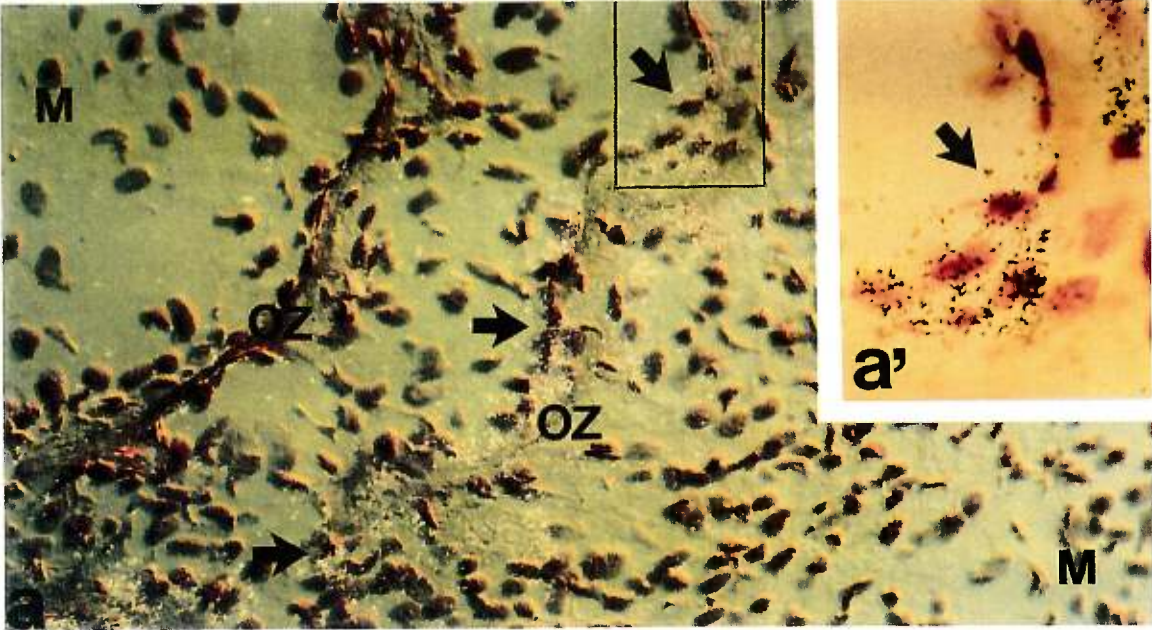
To identify a specific role for PEX/Pex, we were interested first in its tissue and cell distribution. For this reason, using ISH we examined Pex mRNA temporal and spatial patterns of expression on sagittal sections of embryonic mice from Day 13 to 19 and in newborn mice. At this period of development, most tissues are already formed and many are functional. For example, the ossification process starts on Day 14.5 post coitum (Rugh 1991). We demonstrate by ISH that Pex mRNA is expressed in osteoblasts and odontoblasts and suggest a specific role for this putative peptidase in bone and tooth development. Northern analysis was used to examine the presence of Pex mRNA in adult mouse tissues. This analysis revealed decreased concentrations of Pex mRNA in the adult bones and non-growing teeth.

Materials and Methods

Animals

For ISH, we used unfixed, frozen tissues from fetuses of CD1 time-pregnant female mice. The fetuses were grouped according to embryonic age—10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 and 19 intrauterine days of life (e10, e11, etc.) and post-natal Day 3 and 7 (p3 and p7) and were prepared as de-

Figure 2 Sites of Pex mRNA expression in primordium of mandibular bone (a) and vertebrae (b) at day e16, and incisor at e19 (c), at a cellular level seen under Nomarski's optics. Silver labeling is seen as white spots (or dark in a' and c') on a color background. In the mandibular bone primordium (a), Pex mRNA is detected in the osteoblasts (arrows) present in the intraconjonctive ossification zone (OZ) surrounded by unlabeled mesenchymal cells (M). A group of osteoblasts is shown at higher magnification in a'. The presence of Pex mRNA (arrows) in vertebrae within endochondral ossification zone (OZ) is shown in b. Note unlabeled adjacent calcified zone (CZ) and cartilage (Ca). (c) A layer of labeled odontoblasts (Od) is shown. A group of odontoblasts is shown at higher magnification in c'. This layer is separated from a layer of unlabeled ameloblasts (Am) by the dentino-enamel matrix (Mx). The stellate reticulum (SR) of enamel organ is also unlabeled. Bars: a-c = 25 μ m; a'-c' = 10 μ m.



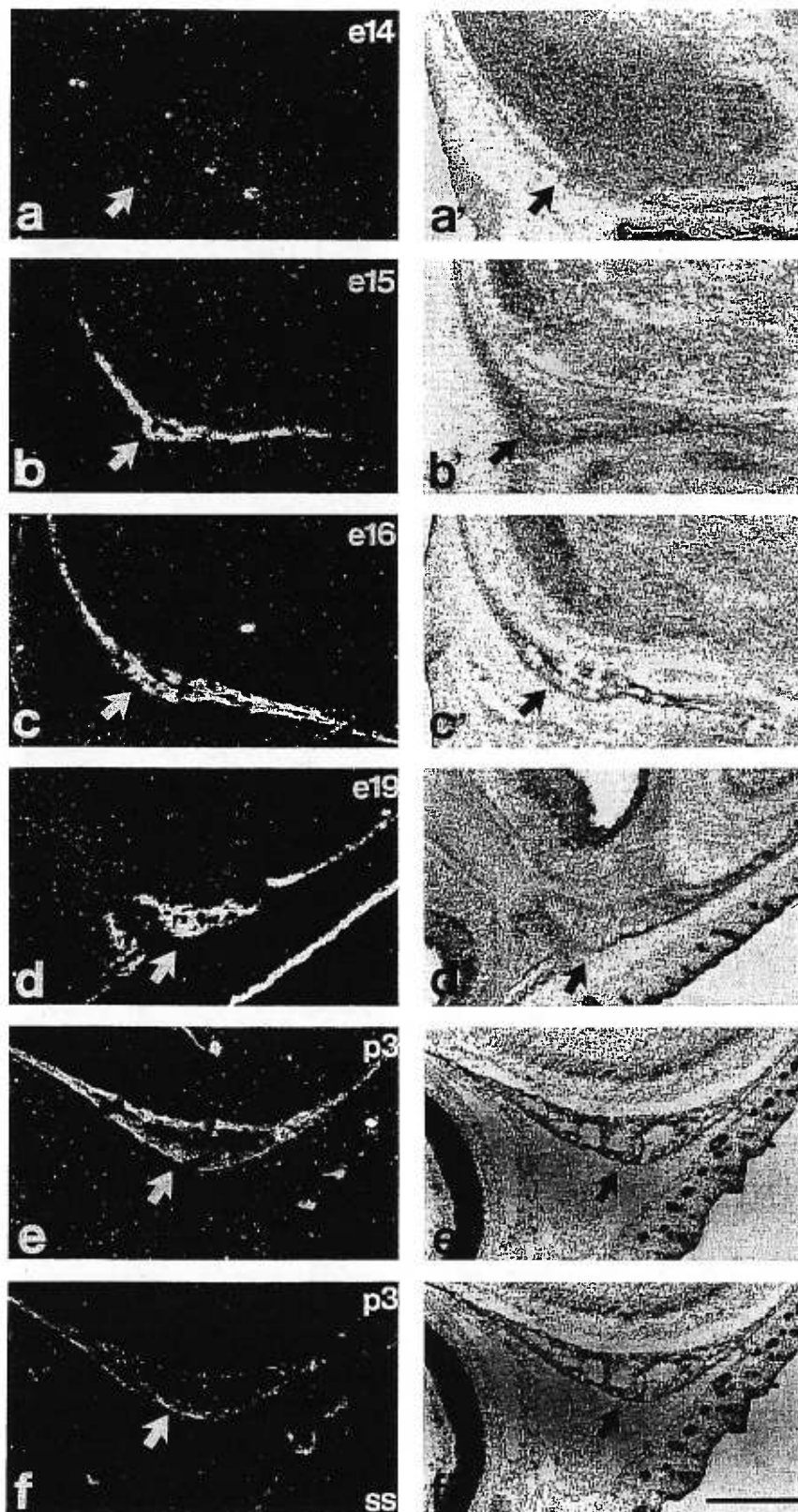


Figure 3 Sites of Pex mRNA expression in developing mouse calvaria on e14 (a), e15 (b), e16 (c), e19 (d), and p3 (e). Labeling is seen as white spots on darkfield (arrows in a-f) and as black labeling on brightfield (arrows in a'-f'). (f) Control hybridization obtained with sense riboprobes. Bar = 500 μ m.

scribed (Marcinkiewicz et al. 1993). Whole embryos and newborn mice were rapidly removed, cooled in ice-cold PBS, embedded in Tissue-Tek OCT compound (Miles; Elkhart, IN), frozen at -30°C in isopentane, and cut into $10\text{-}\mu\text{m}$ sections. The sections were mounted on 0.5% gelatin-coated slides and stored at -80°C .

DNA Manipulations

All DNA manipulations, including the reverse transcription from RNA, PCR, and cloning, were done according to standard protocols (Sambrook et al. 1989; Ausubel et al. 1994). DNA sequencing was performed on double-stranded DNA (Tabor and Richardson 1987).

Cloning of a Mouse Partial Pex cDNA

To obtain a mouse Pex probe for ISH and Northern blot analysis, degenerate oligonucleotides corresponding to conserved regions among members of the neutral endopeptidase family were designed using the published human PEX gene sequence (The HYP Consortium 1995) and were used in an RT-nested PCR reaction with polyA⁺ RNA purified from testis of CD1 mice (Charles River; Montréal, Québec, Canada). The expected 337-bp DNA fragment was generated and cloned in plasmid pCRII (Invitrogen; Carlsbad, CA). Sequencing of the DNA insert showed more than 97% identity with the human PEX gene sequence (The HYP Consortium 1995) and it is identical to a DNA stretch spanning the region between asparagine 454 and proline 566 of the published cDNA sequence of mouse Pex (Du et al. 1996; Beck et al. 1997; Strom et al. 1997).

Preparation of cRNA Probes

The pCRII plasmid containing the Pex cDNA fragment was linearized with Xho1 and used as a template in an in vitro transcription assay to synthesize a single-stranded anti-sense RNA probe with SP6 RNA polymerase. For control, sense RNA probe was synthesized with T7 RNA polymerase after linearization of the plasmid with Kpn1. For ISH, Pex riboprobes were labeled with both [³⁵S]-UTP and [³⁵S]-CTP (1250 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL) because very low mRNA levels were reported previously (The HYP Consortium 1995; Du et al. 1996; Beck et al. 1997). For Northern blot analysis, probes were labeled with [³²P]-UTP (800 Ci/mmol; Dupont/NEN, Wilmington, DE). The 18S rRNA probe (a generous gift from Dr. M. Uhler) is of bovine origin and strongly cross-hybridizes to a number of different mammalian species.

In Situ Hybridization

ISH was undertaken using RNase-free solutions, starting with frozen cryostat tissue sections that were slowly immersed in cold formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) and maintained in this solution for 45–60 min, then washed extensively with PBS. The tissues were treated for 10 min with acetic anhydride in 0.1 M TEA. After dehydration with alcohol, the tissue sections were dried and then incubated overnight at 55°C with a hybridization solution consisting of 75% formamide, 10% polyethylene glycol, 3 × SSC (1 × SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na citrate, pH 7.2),

50 mM phosphate buffer, pH 7.2, 1 × Denhardt's (made from 50 × stock solution: 1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone, and 1% bovine serum albumin in water), 0.5 mg/ml yeast tRNA, and 0.1 mg/ml sonicated denatured salmon sperm DNA. To increase the signal/noise ratio, the dithiothreitol (DTT) concentration was set at 200 mM (Miller et al. 1993). After hybridization, the sections were washed sequentially in 2 ×, 1 ×, 0.5 ×, and 0.1 × SSC containing 10 mM DTT for 10, 15, 20 and 60 min at 20°C, 20°C, 50°C, and 55°C, respectively. After the washing step in 1 × SSC, the sections were incubated with RNase A at 200 μg/ml for 30 min at 37°C to remove unbound cRNAs. Sections were then dehydrated in a series of alcohol baths and dried. Hybridization was examined on X-ray film (exposure time 5 days), followed by autoradiography using NTB-2 emulsion (Kodak; Rochester, NY) for 30 days at 4°C and development in D19 solution (Kodak). The sections were stained with hematoxylin-eosin and viewed under dark- and brightfield illumination. Some observations were done using Nomarski's attachment.

Alkaline Phosphatase Activity

Localization of alkaline phosphatase activity (Roach and Shearer 1989) was performed with an azo dye coupling method (Alkaline Phosphatase Substrate Kit, cat. # SK-5300 Vector Blue) as recommended by the manufacturer (Vector Laboratories; Burlingame, CA).

RNA Extraction and Northern Blot Analysis

Northern blot analysis was performed using total RNA from newborn and adult calvariae and teeth, and from newborn brain, lung, and liver. For this purpose, the frozen tissues were mixed with TRIzol Reagent (Life Technologies/Gibco-BRL; Burlington, Ontario, Canada) and disrupted with a Polytron. Total RNA was extracted according to Chomczynski (1993), as recommended by the manufacturer. As estimated by spectroscopy at 260 nm, 16 μg of total RNA samples was loaded per lane in 1% agarose gel containing 20 mM HEPES, pH 7.8, 1 mM EDTA, and 6% formaldehyde. After electrophoresis, the RNA was transferred from the gel to a nylon membrane and fixed to the filters by long-wave UV irradiation. The filters were prehybridized at 65°C for 90 min in a solution composed of 5% SDS, NaPO₄ 0.4 M, pH 7.2, EDTA 1 mM, 0.1% BSA, 50% formamide (Gibco/BRL) and were hybridized overnight at 65°C in the presence of the [³²P]-UTP-labeled cRNA probe. After hybridization, the filters were washed in 0.1 × SSC, 0.1% SDS, 1 mM EDTA at 70°C for 2 hr and exposed at -70°C for 6 days to X-ray film (Kodak) with an intensifying screen. Once the exposure step was completed, the blots were boiled in 0.1% SDS, 1 mM EDTA for 10–15 min and re-probed with 18S rRNA.

Results

Pex ISH at Anatomic Resolution in Mouse Embryo

The Pex expression pattern was analyzed by ISH using anti-sense riboprobes on histological sections obtained from embryonic and postnatal mice (Figures 1–5). ISH at anatomic resolution was examined after emulsion autoradiography on embryonic Day 16 (e16) (Figure

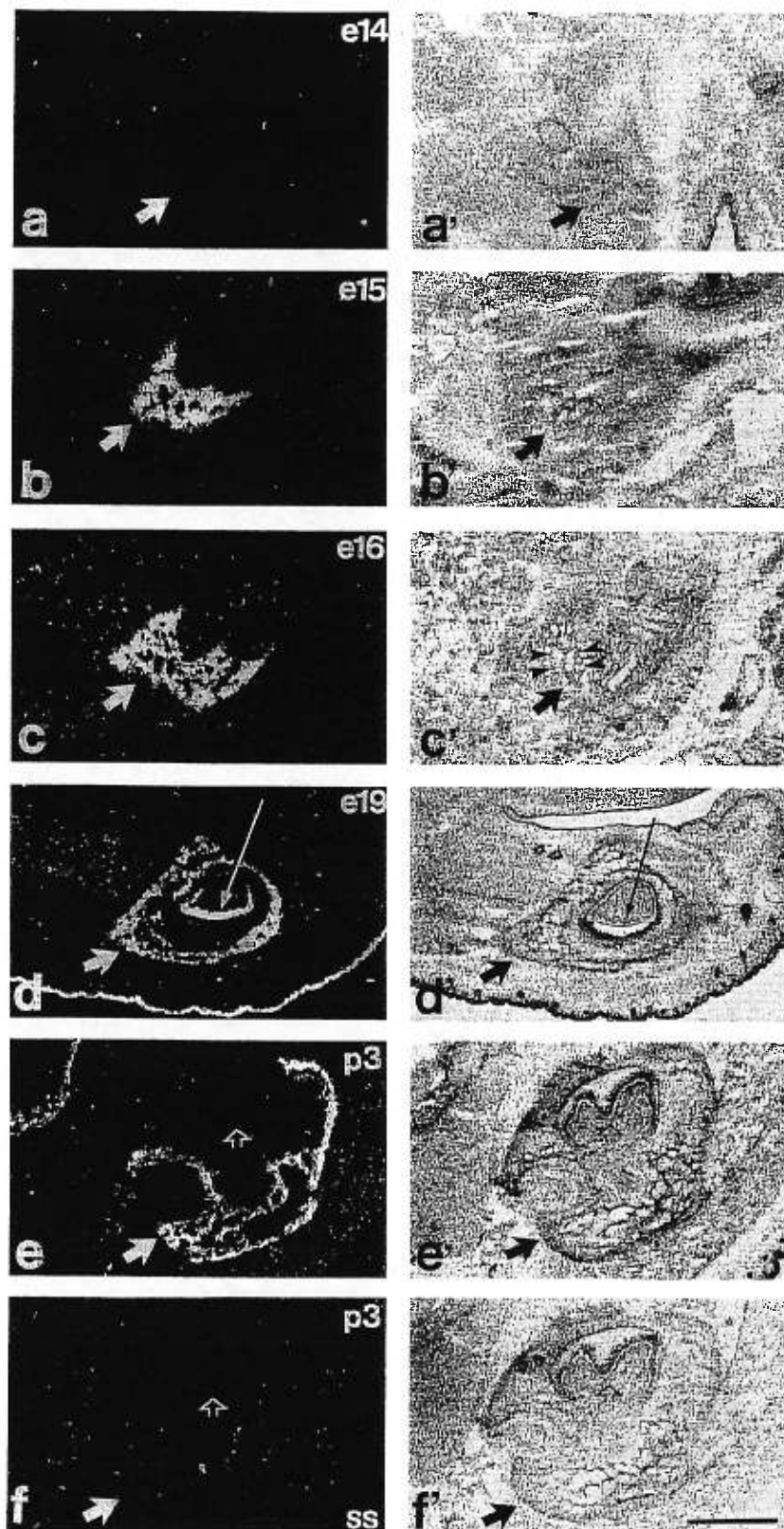


Figure 4 Sites of Pex mRNA expression in mandible bone on e14 (a), e15 (b), e16 (c), e19 (d), and p3 (e) (short arrows). The presence of Pex mRNA is also evident in developing incisor (long arrows) on e19 (d). A second molar at an early stage of development is unmarked (open arrow in e). The same sections are shown after hematoxylin–eosin staining (a'–f'). Area delineated by four arrowheads in c' is shown at higher magnification in Figure 2a. (f) Control hybridization obtained with sense riboprobes. Bar = 500 μ m.

1). Pex mRNA was readily detectable in regions of calvaria, mandible, and ribs. Although not apparent in Figure 1, the vertebrae and long bones also contained Pex mRNA on e16, whereas later, around birth, Pex mRNA could also be detected in developing teeth. Overall, Pex mRNA was localized within alkaline phosphatase territory (not shown). Controls were performed with sense riboprobes, which produced nonspecific background elevated in skin (see also Figures 3d and 4d) and skeletal muscles (not shown). Other tissues, including kidney, lung, liver, and brain, were negative.

Pex mRNA in Osteoblasts

To identify cells synthesizing Pex mRNA, representative tissues were examined under higher microscopic magnification. Figures 2a and 2a', which are higher magnifications of the area shown in Figure 4c, demonstrate the presence of Pex mRNA on e16 in mandibular intramembraneous ossification centers. This topographically heterogeneous region is composed of an ossification zone (OZ) characterized by the presence of (a) a bone extracellular matrix with a dense cell population on the border zone and (b) an undifferentiated mesenchyme (M). ISH revealed the presence of Pex mRNA within cells bordering bone extracellular matrix. This topography suggests that Pex-expressing cells are osteoblasts. The majority of osteoblasts display Pex ISH labeling (Figure 2a').

Hybridization sites were also identified in vertebral endochondral ossification centers (Figure 2b). Pex mRNA was seen within an ossification zone (OZ) adjacent to an unlabeled calcified zone (CZ) and the cartilage (Ca). Bone extracellular matrix was well delineated within OZ, with a significant concentration of Pex-labeled cells on a border zone. There was no apparent hybridization labeling outside of OZ.

Pex mRNA in Odontoblasts

Within tooth, Pex mRNA was concentrated in the layer of odontoblasts (Od) (Figure 2c, which represents a higher magnification of the area shown in Figures 5b and 2c'). In contrast, the layer of ameloblasts (Am) and the stellate reticulum of the enamel organ (SR) were unlabeled. Because the dentino-enamel matrix separates the odontoblast epithelium from the ameloblast epithelial layer, the cell population expressing Pex mRNA is particularly well-defined in this tissue.

Pex mRNA Ontogeny

To determine temporal and tissue-specific patterns of Pex gene expression, the calvaria, mandible, and teeth were examined at the stages preceding and following the onset of chondrification (e11), ossification (e14.5), and odontogenesis (e14). ISH results are shown in Figures 3-5.

Figure 3 shows the presence of Pex mRNA in the calvaria from e15 to p3. Although rudimentary calvaria is already visible on e14 (Figures 3a and 3a'), Pex mRNA is not detectable at this time but is evident thereafter. It is worth noting the presence of bone extracellular matrix within rudimentary calvaria at e15 but not e14. This matrix was seen as a deposition of acellular eosinophilic material along and within a space delineated by a front of osteoblasts (data not shown). Pex mRNA remains present in the calvaria during later gestation and early postnatal development.

Figure 4 depicts Pex mRNA distribution in the mandible from e15 to p3. Despite the absence of the bone extracellular matrix, which is not present early on, the rudiments of the mandible bone are evident by e14. Similar to calvaria, a dramatic elevation of Pex mRNA is evident on e15 (Figure 4b). Pex mRNA remains present until p3.

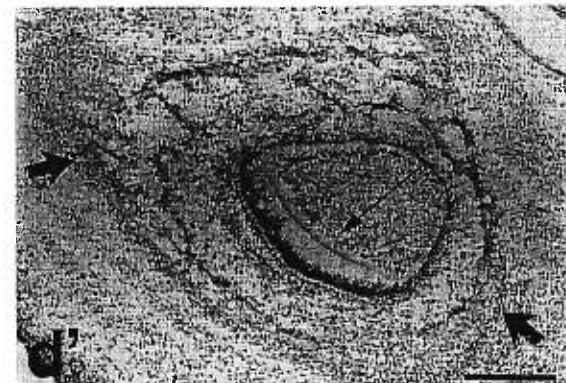
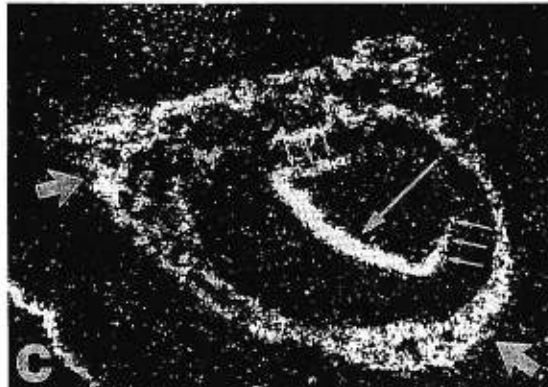
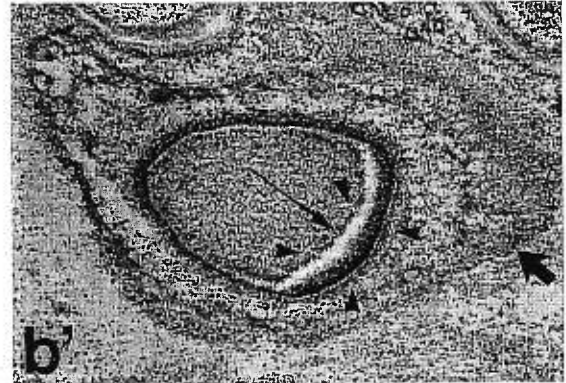
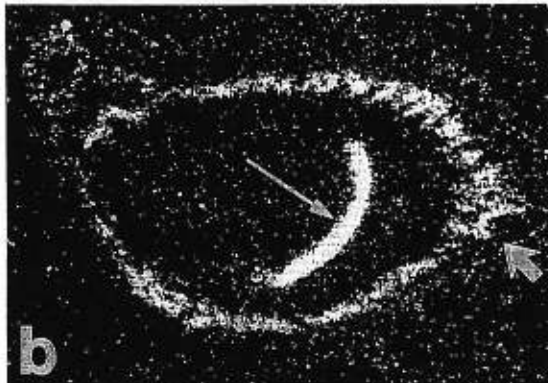
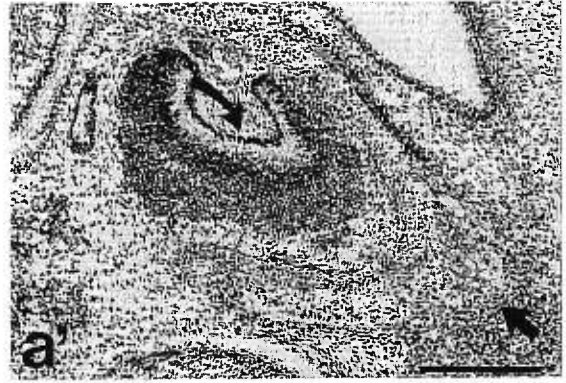
In addition to bones, Pex mRNA labeling can be observed in both incisors and molars, although the onset of expression varies with time of tooth development (Figures 4 and 5). All teeth shown in Figure 5 are from the same section of e19 mouse and include one molar (Figures 5a and 5a'), one inferior incisor (Figures 5b and 5b'), and one superior incisor (Figures 5c and 5c'). Incisors are strongly labeled, whereas rudimentary molars not. The presence of dental extracellular matrix was noted within the two incisors but not in the molar. In addition to incisors, first molars showed PEX mRNA labeling on p3, whereas second molars were positive on p7 (results not shown).

Characterization of Pex mRNA in Adult Bone and Teeth

To verify the presence of Pex mRNA in adult mouse, Northern analysis was performed with total RNA obtained from p3 and adult tissues. A Pex transcript of approximately 7 kb was detected in calvariae and teeth (Figure 6). With 18S RNA as an internal control for mRNA loading, it is clear that PEX mRNA levels in calvariae are higher on p3 than in adulthood. Pex mRNA was observed in p3 and adult teeth. Knowing that incisors, but not molars, present continuous growth in rodents, we isolated total RNA from adult incisors and molars and compared their levels of Pex mRNA. This comparison demonstrated that adult incisors express higher mRNA levels of Pex than adult molars. Pex mRNA was not detectable in newborn lungs, liver, and brain by Northern analysis.

Discussion

This report provides histochemical evidence for Pex mRNA expression in murine embryonic and postnatal bones and teeth. In these tissues, Pex mRNA was de-



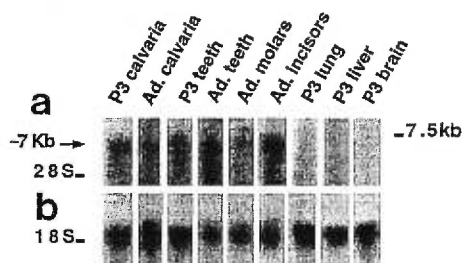


Figure 6 Northern blot analysis of Pex mRNA levels in mouse p3 and adult calvariae, teeth, adult molars, and incisors, p3 lung, p3 liver, and p3 brain. Data shown are from three different Northern blot experiments (Lanes 1–3, 4–6, and 7–9). (a) About 16 μ g total RNA/lane was hybridized with a [32 P]-UTP-labeled mouse Pex cRNA probe. A 7-kb transcript (arrow) was identified in calvariae and teeth. Pex mRNA was undetectable in p3 mouse lung, liver and brain. (b) 18S ribosomal RNA shown after hybridization with 18S cRNA probe.

ected in osteoblasts and odontoblasts, respectively. With both ISH and Northern analysis, bones and teeth were the only tissues in which the presence of the Pex mRNA could be detected, suggesting that these two tissues are privileged sites for Pex expression in the developing mouse. A significant concentration of Pex mRNA was also detected in adult incisors, which grow continuously in rodents, whereas in adult calvariae and in nongrowing molars Pex mRNA expression appeared to be considerably lower. Taken together, these data suggest a role for Pex in the development of bones and teeth.

Osteoblasts and chondroblasts/chondrocytes are important cell components of developing bone. Major products of osteoblasts and chondrocytes are the extracellular matrix of bone and cartilage, respectively. The bone extracellular matrix is composed of 90% collagen and 10% noncollagenous proteins (Desbois and Karsenty 1995; Nefussi et al 1997), including osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein, and osteonectin. Our ISH results provide evidence for the presence of Pex mRNA in osteoblasts, localized in close proximity (border zone) to the extracellular matrix, suggesting that Pex may play a role in matrix elaboration, deposition, and/or mineralization. In addition, we demonstrate a temporal relationship between the onset of Pex mRNA expression and the onset of matrix deposition. Although not identical to the situation observed during bone development, Pex mRNA expression in

teeth also suggests a striking correlation with matrix deposition.

Our results are in concordance with the clinical features of Hyp and Gy mice, which harbor large deletions in the Pex gene (Beck et al. 1997; Strom et al. 1997). Both mutant animal models exhibit abnormalities in bone and tooth formation, including rickets, osteomalacia, and formation of an interglobular dentin (Eicher et al. 1976; Lyon et al. 1986; Abe et al. 1992). In Hyp mice, mineralization of bone extracellular matrix is delayed (Ecarot-Charrier et al. 1988; Ecarot et al. 1992). Therefore, loss of Pex function appears to be responsible for the bone mineralization defect in Hyp mice. The precise mechanism by which Pex may regulate mineralization of the extracellular matrix is unclear. However, the Pex protein structure suggests that it may function as a peptidase (The HYP Consortium 1995; Turner and Tanzawa 1997). Therefore, one can postulate that Pex is a key component controlling the bioactivity of one or several peptides influencing osteoblast and odontoblast proliferation and/or differentiation. It may also be involved in proteolysis of extracellular matrix proteins. In this regard, an interesting candidate is osteocalcin, a 46 amino-acid peptide produced and secreted exclusively by osteoblasts and odontoblasts (Desbois et al. 1994; Desbois and Karsenty 1995). Studies performed with knockout mice suggest that osteocalcin interferes with the mineralization process (Ducy et al. 1996), a finding compatible with the plasma levels of osteocalcin in Hyp mice relative to normal mice (Gundberg et al. 1992).

Like patients with XLH, both Hyp and Gy mutant mice develop hypophosphatemia secondary to impaired renal phosphate reabsorption (Rasmussen and Tenenhouse 1995). The relationship between the renal phosphate transport defect in XLH, Hyp, and Gy mice and the loss of Pex function is not clear. A possible role of PEX/Pex may be to metabolize a heretofore unidentified circulating peptide hormone involved in regulation of renal phosphate transport and phosphate homeostasis. A factor that inhibits phosphate uptake by normal mouse proximal tubule cells in primary culture was recently reported in Hyp mouse serum (Lajeunesse et al. 1996), a finding consistent with data from parabiosis experiments between normal and Hyp mice (Meyer et al. 1989) and kidney cross-transplantation studies in Hyp vs normal mice (Nesbitt et al. 1992). This hypothetical phosphaturic factor has not

Figure 5 Pex mRNA present in developing teeth (long arrows) and mandibular bone (short arrows) in e19 mouse. Early (a), medium (b), and more advanced (c) tooth developmental stages correlate with different levels of Pex mRNA, being undetectable in molar primordium (curved arrow in a) and more extended in incisors (b,c). Note lateral extension of Pex mRNA distribution in the more developed incisor (small, thin arrows in c). (d) Control hybridization obtained with sense riboprobes. Area delineated by four arrowheads in b' is shown at higher magnification in Figure 2c. Bar = 200 μ m.

yet been identified and its source has not been established. We suggest that osteoblasts and odontoblasts may be involved in the inactivation of this hypothetical factor. Alternatively, Pex could be involved in the processing of an inactive precursor into a bioactive peptide that stimulates phosphate reabsorption by the kidney.

In conclusion, we demonstrate the presence of Pex mRNA in both embryonic and adult bones and teeth. Cells expressing Pex have been identified as osteoblasts and odontoblasts. Therefore, Pex could be a useful marker for these two cell types. In adult bones, the levels of Pex mRNA were lower than those in embryos. In adult teeth, Pex mRNA concentration remained elevated in incisors and was lower in molars. These results suggest that Pex is involved in the development of bone and tooth tissues.

Acknowledgments

Supported by grants from FCAR (to LDG, PC, and GB) and the Medical Research Council of Canada (MT-12686, to MM). AFR is supported by the Canadian International Development Agency (CIDA), Canada and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

We are grateful to Ms J. Marcinkiewicz for skillful technical help and Mr C. Charboneau for photographic work.

Literature Cited

- Abe K, Masatomi Y, Nakajima Y, Shintani S, Moriwaki Y, Sobue S, Ooshima T (1992) The occurrence of interglobular dentin in incisors of hypophosphatemic mice fed a high-calcium and high-phosphate diet. *J Dent Res* 71:478-486
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, Greene Publishing and Wiley-Interscience
- Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS (1997) Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 99:1200-1209
- Chomczynski P (1993) A reagent for single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15:532-537
- Desbois C, Hogue DA, Karsenty G (1994) The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* 269:1183-1190
- Desbois C, Karsenty G (1995) Osteocalcin cluster: implications for functional studies. *J Cell Biochem* 57:379-383
- Du L, Desbarats M, Viel J, Glorieux FH, Cawthorn C, Ecarot B (1996) cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics* 36:22-28
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundersen C, Bradley A, Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452
- Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L (1992) Defective bone formation in Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in favor of an intrinsic osteoblast defect. *J Bone Miner Res* 7:215-220
- Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, Travers R, Desbarats M, Bouchard F, Hinek A (1988) Defective bone formation by transplanted Hyp mouse bone cells into normal mice. *Endocrinology* 123:768-773
- Eicher EM, Southard JL, Scriver CR, Glorieux FH (1976) Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4667-4671
- Grieff M, Mumm S, Waelz P, Mazzarella R, Whyte MP, Thakker RV, Schlessinger D (1997) Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 231:635-639
- Gundberg CM, Clough ME, Carpenter TO (1992) Development and validation of a radioimmunoassay for mouse osteocalcin: paradoxical response in the Hyp mouse. *Endocrinology* 130:1909-1915
- Guo R, Quarles LD (1997) Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 12:1009-1017
- Lajeunesse D, Meyer RA, Hamel L (1996) Direct demonstration of a humorally-mediated inhibition of renal phosphate transport in the Hyp mouse. *Kidney Int* 50:1531-1538
- Lyon MF, Scriver CR, Baker LRI, Tenenhouse HS, Kronick J, Mandla S (1986) The Gy mutation: another cause of X-linked hypophosphatemia in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4899-4903
- Marcinkiewicz M, Day R, Seidah NG, Chrétien M (1993) Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and α -melanotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4922-4926
- Meyer RA, Meyer MH, Gray RW (1989) Parabiosis suggests a humoral factor is involved in X-linked hypophosphatemia in mice. *J Bone Miner Res* 4:493-532
- Miller MA, Kolb PE, Raskind MA (1993) A method for simultaneous detection of multiple mRNAs using digoxigenin and radioisotopic cRNA probes. *J Histochem Cytochem* 41:1741-1750
- Nefussi JR, Brami G, Morowski D, Oboeuf M, Forest N (1997) Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation in vitro. *J Histochem Cytochem* 45:493-503
- Nesbitt T, Coffman TM, Griffiths R, Drezner MK (1992) Cross-transplantation of kidneys in normal and Hyp mice: evidence that the Hyp mouse phenotype is unrelated to an intrinsic renal defect. *J Clin Invest* 89:1453-1459
- Rasmussen H, Tenenhouse HS (1995) Mendelian hypophosphatemias. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York, McGraw Hill, 3717-3745
- Roach HI, Shearer JR (1989) Cartilage resorption and endochondral bone formation during the development of long bones in chick embryos. *Bone Miner* 6:289-309
- Rugh R (1991) *The Mouse: Its Reproduction and Development*. New York, Oxford Science Publications, Oxford University Press
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ford N, Nolan C, Fergusson M, eds. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Strom TM, Francis F, Lorenz B, Böddrich A, Econs MJ, Lehrach H, Meitinger T (1997) Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* 6:165-171
- Tabor S, Richardson CC (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4767-4771
- The HYP Consortium (1995) A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nature Genet* 11:130-136
- Turner AJ, Tanzawa K (1997) Mammalian membrane endopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 11:355-364

CHAPITRE 3 - ARTICLE

DEVELOPMENTAL EXPRESSION AND TISSUE DISTRIBUTION OF PHEX PROTEIN: EFFECT OF THE *HYP* MUTATION AND RELATIONSHIP TO BONE MARKERS

Andréa Frota Ruchon, Harriet S. Tenenhouse, Mieczyslaw Marcinkiewicz,
Géraldine Siegfried, Jane E. Aubin, Luc DesGrosceillers, Philippe Crine and
Guy Boileau

J Bone Miner Res , 2000, in press.

SOMMAIRE

Cette étude est la suite de l'article précédent, où nous avons démontré la présence des ARNm de Phex dans les os et les dent de souris. Ici, nous utilisons un anticorps monoclonal dirigé contre PHEX humaine pour montrer la présence de la protéine dans des extraits tissulaires d'os et de dents par Western blot, et au niveau cellulaire, à la surface des ostéoblastes, ostéocytes et odontoblastes, par immunohistochimie. En outre, nous démontrons que les niveaux de la protéine Phex diminuent avec l'âge, confirmant nos résultats avec les ARNm et suggérant une corrélation entre la présence de Phex et la croissance des os et des dents.

Par la suite, nous regardons l'expression de Phex chez la souris *Hyp*. Ce mutant naturel porte, selon des études génétiques, une large délétion de la partie 3' du gène Phex et est le modèle animal utilisé pour étudier le rachitisme familial hypophosphatémique lié au chromosome X. En utilisant les techniques d'hybridation *in situ*, ribonuclease protection assay, Western blot et immunohistochimie, nous démontrons l'absence des ARNm et de la protéine Phex chez ce mutant.

Pour finaliser, nous vérifions si l'absence de fonction de Phex influence l'expression d'autres gènes par les ostéoblastes. Nous étudions l'expression de NEP, une autre endopeptidase présente dans les ostéoblastes et capable de dégrader, *in vitro*, certains peptides ostéogéniques, ainsi que l'expression des marqueurs de différenciation tardive des ostéoblastes, comme l'ostéocalcine et le récepteur de PTH/PTHrP. Nous démontrons une augmentation des ARNm codant pour l'ostéocalcine pendant la période embryonnaire, augmentation qui disparaît après la naissance, donc transitoire. Par contre, pas de différences significatives ont été remarquées entre la souris *Hyp* et le contrôle normal, en ce qui concerne la NEP et le récepteur de PTH/PTHrP.

En conclusion, nos résultats montrent Phex comme une glycoprotéine présente dans les ostéoblastes, ostéocytes et odontoblastes, dont le niveau d'expression dépend de l'âge. Également, nous rapportons l'absence de Phex, ARNm et protéine, chez la souris *Hyp*.

**Developmental Expression and Tissue Distribution of
Phex Protein: Effect of the *Hyp* Mutation and
Relationship to Bone Markers**

**Andréa Frota Ruchon^{1,4}, Harriet S. Tenenhouse², Mieczyslaw
Marcinkiewicz³, Géraldine Siegfried², Jane E. Aubin⁵, Luc
DesGroseillers¹, Philippe Crine¹ and Guy Boileau^{1,6}**

¹Département de Biochimie, Université de Montréal, Montréal, Canada

²Department of Pediatrics and Human Genetics, McGill University
Montreal Children's Hospital Research Institute
Montreal, Canada

³Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire,
Institut de Recherches Cliniques de Montréal et Département de Médecine,
Université de Montréal, Montréal, Canada

⁴Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza (CE), Brasil

⁵Department of Anatomy and Cell Biology
University of Toronto, Toronto, Canada

Running Title: Phex Protein in Bones and Teeth

⁶To whom correspondence should be addressed at: Département de
Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal,
Qc, Canada, H3C 3J7. Tel: (514) 343-6328; FAX: (514) 343-2210;
e-mail: boileaug@bch.umontreal.ca

ABSTRACT

Mutations in *PHEX*, a phosphate-regulating gene with homology to endopeptidases on the X chromosome, are responsible for X-linked hypophosphatemia (XLH). The murine *Hyp* homologue has the phenotypic features of XLH and harbours a large deletion in the 3' region of the *Phex* gene. We characterized the developmental expression and tissue distribution of Phex protein, using a monoclonal antibody against human PHEX, examined the effect of the *Hyp* mutation on Phex expression, and compared neprilysin, osteocalcin, and PTH/PTHrP receptor gene expression in bone of normal and *Hyp* mice. *Phex* encodes a 100 - 105 kDa glycoprotein, which is present in bones and teeth of normal mice but not *Hyp* animals. These results were confirmed by *in situ* hybridization and ribonuclease protection assay. Phex protein expression in femur and calvaria decreases with age, suggesting a correlation between Phex expression and bone formation. Immunohistochemical studies detected Phex protein in osteoblasts, osteocytes, and odontoblasts, but not in osteoblast precursors. In contrast to Phex, the abundance of neprilysin mRNA and protein is not significantly altered in *Hyp* bone. Similarly, osteocalcin and PTH/PTHrP receptor gene expression are not compromised in bone of *Hyp* mice. Our results are consistent with the hypothesis that loss of Phex function affects the mineralizing activity of osteoblasts rather than their differentiation.

Key words: X-linked hypophosphatemia, osteoblast, osteocyte, odontoblast, endopeptidase.

INTRODUCTION

X-linked hypophosphatemia (XLH) is the most frequently occurring form of inherited rickets in humans, with an incidence of 1 in 20,000 individuals^{1,2}. It is a dominant disorder of phosphate homeostasis characterized by growth retardation, rachitic and osteomalacic bone disease, hypophosphatemia and renal defects in phosphate reabsorption and vitamin D metabolism². The gene responsible for XLH was identified by positional cloning and designated *PHEX* (formerly *PEX*) to signify a Phosphate regulating gene with homologies to Endopeptidases on the X chromosome³. To date, 113 mutations in the *PHEX* gene have been identified in XLH patients³⁻⁸ (<http://data.mch.mcgill.ca/PHEXdb>). These mutations are scattered throughout the gene and the majority is predicted to result in the loss of functional PHEX protein.

Previous studies have examined PHEX/Phex (*PHEX/Phex* refers to human and mouse genes, respectively) mRNA tissue distribution by RT/PCR⁹⁻¹², ribonuclease protection assay⁹ and Northern analysis^{9,10,12,13} in humans and mice. Evidence for the presence of PHEX/Phex mRNA was found in mouse bones⁹⁻¹¹, in human fetal bones^{9,12} and lung^{9,13} as well as in adult human ovary¹³. Using *in situ* hybridization (ISH) on mouse embryo sections, we found that bones and teeth were the major sites of Phex mRNA expression in the developing mouse¹⁴.

The precise physiological role of PHEX is unknown and the mechanisms whereby loss of PHEX function causes renal phosphate wasting, abnormal regulation of vitamin D metabolism and impaired bone mineralization are not understood. Homology of PHEX to the M13 family of zinc metallopeptidases, which includes neprilysin (NEP, neutral endopeptidase 24.11) and endothelin-converting enzyme 1 and 2 (ECE-1 and ECE-2), has raised important questions regarding PHEX function at the molecular level. It is postulated that PHEX is involved in the activation or inactivation of a peptide hormone(s) which plays a key role in the regulation of bone mineralization, renal inorganic phosphate handling and vitamin D metabolism. This peptide hormone could be phosphatonin, the putative phosphaturic factor secreted by mixed mesenchymal tumors derived from patients with Oncogenic

Hypophosphatemic Osteomalacia (OHO)¹⁵⁻¹⁷. OHO patients present with a renal phosphate leak, dysregulated vitamin D metabolism, and bone disease, much like XLH patients, and it has been hypothesized that the overproduction of phosphatonin by mesenchymal tumors is likely responsible for this phenotype¹⁵. However, the molecular identity of phosphatonin has yet to be established.

Much of our knowledge of XLH derives from studies of murine *Hyp* and *Gy* homologues, which exhibit the same phenotypic features that characterize patients with XLH^{18,19}. Previous genetic studies have demonstrated that *Hyp* mice harbour a large deletion in the 3' region of the *Phex* gene spanning 18 to 33 kb, which includes the putative active site of the protein and suggests a loss of function mutation^{9,20}. The *Hyp* mouse is characterized by hypophosphatemia resulting from a defect in Na⁺-phosphate cotransport across the renal brush border membrane^{21,22}, abnormal renal vitamin D metabolism²³⁻²⁵, and a defect in osteoblast-mediated mineralization²⁶⁻²⁹ (for review, see ³⁰). This naturally occurring mutant provides a unique model in which to investigate the molecular and biochemical events linking *Phex* mutations to defects in renal phosphate reabsorption, vitamin D metabolism and bone mineralization.

In the present study, we used a monoclonal antibody raised against human PHEX to characterize the developmental expression and tissue distribution of Phex protein. In addition, we examined the effect of the *Hyp* mutation on Phex protein and mRNA expression, and compared the expression of neprilysin, osteocalcin and PTH/PTHrP receptor in bone of normal and *Hyp* mice. We demonstrate that Phex protein is present in osteoblasts, osteocytes, and odontoblasts of normal but not *Hyp* mice. In addition, despite the loss of Phex expression, neprilysin, osteocalcin and PTH/PTHrP receptor expression are not compromised in *Hyp* mice, consistent with the presence of mature osteoblasts in mutant bone. Our results support the view that abnormal bone formation in *Hyp* mice is not caused by impaired differentiation of osteoblasts but rather by a defect in their ability to mineralize the matrix.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mutant *Hyp* hemizygote and normal embryonic (e17), postnatal (P4) and adult male mice were used in the present study. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The animals were obtained by breeding C57B1/6J *Hyp*^{+/+} females with C57B1/6J ^{+/Y} males. The original breeding pairs were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The sex of e17 mice was determined by PCR of genomic DNA from mouse tail using the primers F4230 (AGGTCTACAGCCAGGTAGAA) and R4231 (CAAAGACCCATAGGTACCCA), which detect a mouse Y chromosome repetitive sequence³¹. E17 and P4 normal males were distinguished from *Hyp* male littermates by PCR of tail genomic DNA using primers from the 5' (F449 - AAGCAGATGCCAAGCCACTG and R633 - ATCAGGGGACACATACAAACGG) and 3' (F1784 - AAAATGGAAACCTTGATCCGTGG and R1893 - GCCGGCTTTCTTCCAATAATAG) regions of the *Phex* gene. A PCR fragment of 184 bp was obtained with DNA from both normal and *Hyp* mice with 5' primers whereas a 108 bp fragment was obtained with DNA from normal but not from *Hyp* mice with 3' primers. Adult *Hyp* mice were identified by their lower body weight, shorter tail, and hypophosphatemia¹⁸.

Monoclonal antibodies

To produce monoclonal antibodies to PHEX/Phex, part of the coding region of the human PHEX cDNA (from Lys₁₂₁ to Glu₂₉₄, GenBank accession number U75645) was amplified by PCR and cloned in plasmid pGEX-GST (Pharmacia Biotechnologies, Baie d'Urfé, Qc). The recombinant plasmid was used to transform *Escherichia coli* strain AP401 for production of PHEX-GST fusion protein. Induction of synthesis and purification of the PHEX protein fragment was performed as recommended by the supplier (Pharmacia Biotechnologies, Baie d'Urfé, Qc). BALB/c mice were immunized by intraperitoneal injection of 200 µg of PHEX

protein fragment in complete Freund's adjuvant. Booster injections and fusion of spleen cells with myeloma cells were performed as described³². Culture supernatants were tested for PHEX/Phex protein recognition by immunoblotting of protein extracts from LLCPK₁ cells transfected with PHEX cDNA and later in mouse bone proteins extracts. Four hybridoma culture supernatants were found to recognize PHEX/Phex protein. One of them designated as 13B12 was used in this work.

The anti-neprilysin (NEP) monoclonal antibody 18B5 was previously described³³, and its specificity was determined by immunoblot analysis of protein extracts from cells transfected either with PHEX, NEP or ECE-1 cDNAs as described (Ruchon *et al.*, submitted).

Transfection of cultured mammalian cell lines

Recombinant NEP, ECE-1 and PHEX proteins were obtained by transfection of MDCK (NEP and ECE-1) or LLC-PK₁ cells (PHEX) with mammalian expression vectors containing the appropriate cDNA. cDNAs for human PHEX and rabbit NEP were previously cloned in our laboratory^{9,34}. Human ECE-1 cDNA was a generous gift from Dr. O. Valdenaire (Roche, Basel). Transfections were performed as previously described³⁵.

Protein extraction and immunoblotting analysis

Lyophilized tissues were homogenized (10% w/v) in 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1% n-octylglucoside, and a cocktail of protease inhibitors (2 g/ml leupeptin, 2 g/ml aprotinin, 2 mM β -mercaptoethanol, 100 g/ml A-PMSF, 10 M pepstatin), incubated on ice for 1h, and centrifuged at 13,000 rpm for 30 min at 4°C. After quantification of total proteins in the supernatants (DC protein assay kit, Biorad, Mississauga, On), 60-100 g of protein were resolved by SDS-PAGE on a 10% gel, transferred to a nitrocellulose membrane and immunoblotted with the 13B12 anti-PHEX monoclonal antibody and/or 18B5 anti-NEP monoclonal antibody. Immunoreactivity was revealed by chemiluminescence using the Renaissance Kit (NEN life Science Products, Boston, MA). Membranes were then stripped as recommended by the manufacturer and

reprobed with an anti-actin immunopurified IgG (A2066, Sigma, Mississauga, On).

Protein deglycosylation

Peptide:N-glycosidase F, also known as PNGase F, was purchased as a kit (New England BioLabs, Beverly, MA) and used as recommended by the supplier. Briefly, protein extracts were incubated with PNGase F for 60 min at 37 °C immediately before loading onto gels for electrophoresis.

Immunohistochemistry

For immunohistochemical studies, 4-day-old normal and *Hyp* mice were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg i.p.), cannulated through the left ventricle and ascending aorta and perfused for 30 sec with lactate ringer solution (Abbott), followed by 4% formaldehyde for 20 min. After perfusion, the heads and limbs were cut from each mouse and immersed in the same solution for an additional 12-18h at 4°C. Tissues were dehydrated in graded ethanol solutions, cleared with xylene, and embedded in paraffin without decalcification since mineralization is not complete at this developmental stage.

Immunohistochemistry was performed on sagittal sections (5 –10 µm) of heads and limbs. The 13B12 anti-PHEX monoclonal antibody was used as the primary antibody at a 1/100 dilution. The HistomouseTM-SP Kit (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA), designed for examination of mouse tissues with mouse primary antibodies, was used as recommended by the manufacturer. Immunoreactivity was detected with the HorseRadish Peroxidase-Streptavidin-Biotin amplification method, using AEC chromogen/substrate system, which yields an intense red deposit that is seen around the antigen/antibody/enzyme complex. The sections were counterstained with hematoxylin, also furnished in the kit. Controls were performed using preimmune mouse IgGs.

In situ hybridization (ISH)

ISH was performed essentially as described¹⁴ except for the RNase A concentration which was 20 µg/ml instead of 200 µg/ml. Sense and antisense

riboprobes labeled with both [³⁵S]-UTP and [³⁵S]-CTP (1250 Ci/mmol; Amersham Arlington Heights, IL.) were prepared by *in vitro* transcription of appropriate linearized plasmids. Plasmids used were: for Phex, previously described pCRII plasmid containing the Phex cDNA¹⁴; for NEP, plasmid pT7T3D-Pac (purchased from ATCC, Rockville, MD, catalogue # 570653) containing a 1460 bp mouse NEP cDNA insert, corresponding to the last 233 amino acid residues of the coding region (from Gln 521 to the stop codon) and all the 3'UTR; for osteocalcin, pBluescript containing a 420 bp cDNA, spanning nucleotides 32 to 451 of the published sequence³⁶; for PTH/PTHrP receptor, pBluescript containing a 528 bp cDNA from nucleotides 193 to 721 of the nucleotide sequence data (Genbank, Accession number X78936).

Hybridization was examined on X-ray film (exposure time 6 to 120 hours), followed by autoradiography using NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY) for 8 to 30 days. The sections were stained with hematoxylin/eosin and viewed under dark- and bright-field illumination.

Ribonuclease protection assay

The 3' Phex and β -actin cDNA constructs used for riboprobe synthesis were described previously⁹. For Nep riboprobe synthesis, a 414 bp cDNA fragment, corresponding to nucleotides 1590 to 2003 of the mouse Nep cDNA sequence, was subcloned into pCR2.1 plasmid and linearized with CvnI. The Phex, Nep and β -actin cDNAs were transcribed using either T3 or T7 RNA polymerases and [α -³²P]UTP (800 Ci/mmol; ICN, Mississauga, On) as described previously^{9,37}.

The ribonuclease protection assay was performed as described previously^{9,37}. Briefly, total RNA (20 μ g) was isolated from calvaria of P4 normal and *Hyp* male mice using TRIzol Reagent (GIBCO/BRL), hybridized with the appropriate labeled riboprobes (5×10^5 cpm) at 50° C for 18h, and treated with 2 μ g/ml RNase T1 at 30° C for 1h. The protected fragments (Phex, 246 bp; Nep, 351 bp and β -actin, 137 bp) were precipitated, heat denatured and electrophoresed on 6% denaturing polyacrylamide gels. The gels were dried and exposed to a PhosphorImager screen for quantification of radioactive signals under conditions where linearity is achieved,

and to Kodak Biomax MR1 film for photography.

RESULTS

Specificity of monoclonal antibody 13B12

A monoclonal antibody designated 13B12, directed against the N-terminal domain of the recombinant human PHEX protein (Lys₁₂₁-Glu₂₉₄), was developed. The specificity of this antibody was assessed using protein extracts from cells transfected with human PHEX, rabbit NEP or human ECE-1 cDNAs. Immunoblot analysis showed that the antibody recognizes a PHEX band migrating at approximately 105 kDa (LLCPK1-PHEX cells in Fig. 1A). This antibody did not recognize recombinant NEP or ECE-1 proteins (MDCK-NEP and MDCK-ECE1 cells in Fig. 1A), but the latter were detected by their corresponding antibodies (data not shown).

Monoclonal antibody 13B12 detects a glycoprotein in bone extracts

We next used monoclonal antibody 13B12 to examine Phex protein expression in bone extracts. 13B12 detected a protein of approximately 100 kDa in extracts of femur derived from postnatal day 4 (P4) normal mice (Fig. 1B). This molecular mass is slightly lower than that observed for recombinant PHEX produced in LLC_{PK}₁ cells, which is estimated at 105 kDa. However, both proteins migrated with an apparent molecular mass of 82 kDa after treatment with PNGase F (Fig. 1B), suggesting that the difference observed between the bone and recombinant proteins results from specific glycosylation patterns. We consistently observed a doublet after PNGase treatment of recombinant PHEX. The exact nature of the difference between these two forms of PHEX is unknown, but it could be due to incomplete deglycosylation. Although PNGase F removes most N-linked oligosaccharide side chains, complex sugars are known to be resistant to this treatment.

Phex in bones and teeth of newborn and adult mice

Our previous studies have suggested that Phex mRNA abundance decreases with age¹⁴. Therefore, we examined Phex protein levels in the bones and teeth of P4 and adult mice. Immunoblotting showed the presence of Phex in protein extracts of

bones (calvaria and femur) and teeth (incisors), whereas extracts from kidney, liver, lung, ovary and testis were negative (Fig. 1C). This is consistent with previous ISH data showing that Phex was expressed only in bones and teeth¹⁴. Our results also showed high levels of Phex protein in P4 femur and calvaria and a marked decrease in the abundance of the protein in adult tissues (Fig. 1C). These data suggest that there is a temporal relationship between the presence of Phex and bone growth and/or mineralization.

Immunocytochemical localization of Phex in osteoblasts, osteocytes and odontoblasts

To localize Phex expression at the cellular level, sections of incisors (Fig. 2A and 2C), mandible (Fig. 2A and 2G), calvaria (Fig. 2E) and femur (data not shown) derived from 4-day-old mice were examined by immunocytochemistry using monoclonal antibody 13B12. In incisors, Phex was observed in odontoblasts (Fig. 2A and C; od in C). In bone, the protein was detected in osteoblasts and osteocytes (ob and ot in Fig. 2E). Pronounced Phex immunostaining was also detected on cellular processes of osteocytes, osteoblasts and odontoblasts. These processes traverse bone matrix and dentine (arrowheads in Fig. 2E and 2C) indicating that Phex is in close contact with the extracellular matrix in bones and teeth. In contrast, Phex immunoreactivity was not detected in either preosteoblasts, osteoblastic precursors or periosteal cells at the periosteal surface of flat (po, op and pc in Fig. 3) and long bones (data not shown), providing evidence that Phex is a marker of differentiated osteoblastic cells. Controls performed with preimmune mouse IgGs were negative.

Absence of Phex in Hyp mouse

In the *Hyp* mouse, the 3' deletion in the *Phex* gene begins at exon 16 and spans 18 to 33 kb of the gene^{9,20}. To determine whether Phex mRNA could be detected in tissues from these animals, we first performed ISH studies with P4 normal and *Hyp* male littermates. The results showed the presence of Phex mRNA in the normal mouse (arrows in Fig. 4A) but not in the *Hyp* littermate (thin arrows in Fig. 4B). Similar results were obtained by ribonuclease protection assay (Fig. 5). A

protected Phex RNA fragment of approximately 246 bp was evident in P4 normal calvaria (first two lanes in Fig. 5A). However, this fragment was not detected in calvaria obtained from 16 P4 *Hyp* mice (data not shown). Fig. 5B presents a quantification of the ribonuclease protection data.

These results were confirmed at the protein level by immunohistochemical (Fig. 2A to H) and immunoblotting studies (Fig. 6). The immunohistochemistry revealed that whereas Phex is clearly present in 4-day postnatal normal mice (Fig. 2A, C, E and G), no Phex protein was detectable in bones and teeth from age-matched P4 *Hyp* mice (arrows in Fig. 2B, 2D, 2F and 2H). It is interesting to note that osteoid area (non-mineralized bone matrix, stained in pink) is enlarged in calvaria of P4 *Hyp* mice (asterisk in Fig. 2F) when compared to age-matched normal mice. Immunoblotting performed on proteins extracted from P4 and adult calvaria also demonstrated the absence of Phex protein in *Hyp* mice (Fig. 6). Of note is the age-related decrease of Phex protein in calvaria from normal mice (C in Fig. 6). No Phex protein was detected in kidney and liver extracts prepared from normal mice.

Neprilysin, osteocalcin and PTH/PTHrP receptor in Hyp mouse

To determine whether the absence of Phex in *Hyp* mice affects the expression of other bone proteins, we evaluated the expression of neprilysin, osteocalcin, and PTH/PTHrP receptor, known to be present in differentiated osteoblasts.

Neprilysin mRNA distribution, as determined by ISH, appeared similar in both control and *Hyp* mice (data not shown). By ribonuclease protection assay, a slight but non-significant increase in neprilysin mRNA levels was observed in *Hyp* calvaria relative to normal counterparts (Fig. 5B). We also estimated neprilysin protein levels by immunoblotting, using an anti-NEP monoclonal antibody (Fig. 7). The results showed the presence of neprilysin in P4 calvaria (C) and kidney (K), but not in the liver (L). The abundance of neprilysin protein appeared similar in normal and *Hyp* mice (Fig. 7).

Osteocalcin and PTH/PTHrP receptor are late markers in the osteoblastic lineage and, like Phex, are expressed by mature osteoblasts. Embryonic (E17) and

postnatal (P4) sections of normal and *Hyp* mice were used for ISH with osteocalcin and PTH/PTHrP receptor riboprobes. Results confirmed previous data showing that osteocalcin mRNA expression is confined to mouse bones and teeth (Fig. 8A-D). Interestingly, increased levels of osteocalcin mRNA could be observed in *Hyp* mouse skeleton at E17 (arrows in Fig. 8C) as compared to normal (thin arrows in Fig. 8A). This remarkable difference in mRNA levels does not persist, since P4 *Hyp* and normal mice display similar levels of osteocalcin mRNA (Fig. 8B and 8D). The increase in the osteocalcin mRNA levels at E17 appears specific since the mRNA levels of PTH/PTHrP receptor, another marker for the same developmental stage, is not increased in the *Hyp* mouse compared to the normal mouse (Fig. 8E and 8G). PTH/PTHrP receptor mRNA levels are also similar in normal and *Hyp* mice at P4 (Fig. 8F and 8H).

DISCUSSION

In the present study, we provide immunocytochemical evidence for Phex protein expression in osteoblasts, osteocytes and odontoblasts of normal mice, using a specific monoclonal antibody raised against an expressed protein fragment corresponding to amino acids 121 to 294 of the PHEX protein. We also detected Phex protein in extracts of bones and teeth derived from postnatal and adult mice, but not in corresponding extracts of lung, liver, kidney, ovary, or testis. In addition, we observed a decrease in Phex protein abundance as a function of age, consistent with our previous *in situ* hybridization studies which showed a temporal relationship between Phex expression and bone growth and/or mineralization¹⁴. Of interest was the absence of Phex protein in osteoblast precursors, indicating that Phex protein is a marker of differentiated bone forming cells. This observation is in agreement with results obtained in osteoblast-like cell cultures^{11,38}. Finally, the high levels of Phex detected in osteocytes make this protein an interesting marker to study the later stages of osteoblastic cell differentiation.

This paper also demonstrates that the *PHEX/Phex* gene encodes a 100 to 105 kDa glycoprotein as determined by SDS-PAGE. Digestion with PNGase F, which removes most N-linked oligosaccharide side chains, decreased the molecular mass of the protein by approximately 20 kDa, indicating that 20% of the mass of the native protein is composed of sugars. Phex has nine putative N-glycosylation sites. Whether all these sites are glycosylated in the native protein is unknown, but site directed mutagenesis experiments have shown that in NEP, an endopeptidase showing significant homology with Phex, all 5 sites are utilized³⁹.

It is of interest that we were unable to detect Phex protein expression in mouse lung and ovary whereas previous reports documented Phex mRNA expression in these tissues^{9,13}, albeit at a lower level than that in bone⁹. The discrepancy between Phex mRNA and protein expression may be explained by differences in the sensitivity of the techniques used and/or tissue-specific differences in translation.

We also examined the effect of the murine *Hyp* mutation on Phex protein expression. We show that Phex protein is absent from *Hyp* osteoblasts, osteocytes

and odontoblasts. Although in a previous study³⁸ Phex protein was not detected in bone extracts and cultured osteoblasts derived from *Hyp* mice, the antibody used had been raised against a Phex peptide encoded by the 3' region of the Phex cDNA, which is deleted in *Hyp* mice^{9,20}. Thus, the antibody would not recognize the predicted truncated Phex protein that might be produced in the mutant strain. The antibody used in the present study is directed against a region of the Phex protein that is retained in *Hyp* mice, thereby providing unequivocal evidence for a CRM (cross reacting material) negative mutation in this mouse model. This suggests that the predicted truncated protein is likely subject to rapid degradation by endoplasmic reticular quality control mechanisms⁴⁰.

In agreement with histomorphometric data^{41,42,43}, we found that the osteoid area is enlarged in P4 *Hyp* calvaria when compared to that in age-matched normal mice. While this enlargement could be due to excessive matrix accumulation, previous studies failed to provide evidence for abnormal matrix deposition in *Hyp* bone^{44,45}. However, there is considerable evidence for a mineralization defect in *Hyp* bone from histomorphometric studies^{41,42,43}. Taken together, the findings are consistent with the notion that the increase in osteoid area in *Hyp* mice can be ascribed to impaired matrix mineralization.

Previous studies demonstrated that phosphate supplementation of *Hyp* mice heals the rachitic bone disease but fails to correct the osteomalacic lesions⁴¹. Moreover, bone cells isolated from *Hyp* mice are unable to produce normal bone after transplantation into a normal environment and are not corrected by phosphate or 1,25-dihydroxyvitamin D²⁶⁻²⁹. On the basis of these findings it was suggested that the mineralization defect in *Hyp* mice is caused not only by hypophosphatemia, arising from the renal phosphate leak^{21,22} (see³⁰ for a review), but also by an intrinsic osteoblast defect²⁶⁻²⁹. This hypothesis is further supported by the demonstration that mice homozygous for the disrupted Na⁺-phosphate cotransporter gene, *Npt2*, do not develop rickets and osteomalacia in the face of significant hypophosphatemia⁴⁶. Moreover, immortalized osteoblasts derived from *Hyp* mice accumulate significantly less calcium and exhibit a pronounced defect in bone nodule mineralization in culture when compared to immortalized osteoblasts from normal mice⁴⁷. In this

regard, our current and previous ontogeny studies, demonstrating that the onset of Phex expression coincides with the beginning of matrix deposition in bone¹⁴, are also compatible with a primary osteoblast defect in *Hyp* mice.

To determine whether the loss of Phex protein could affect the expression of other osteoblast markers, we examined the expression of neprilysin, osteocalcin and PTH/PTHrP receptor genes at embryonic day 17 and at postnatal day 4 in normal and *Hyp* mice. We recently demonstrated that neprilysin, an endopeptidase with significant homology with Phex, can degrade several peptides known to stimulate osteoblast differentiation and/or bone formation (Ruchon et al., submitted). Ribonuclease protection assays and western blotting indicated that the relative abundance of neprilysin mRNA and immunoreactive protein was not significantly different in normal and *Hyp* mouse bones. These results suggest that neprilysin and Phex are probably not involved in modulating the same cellular functions, consistent with our observations that neprilysin is expressed early in all cells of osteoblastic lineage (Ruchon et al., submitted), while Phex expression is restricted to mature osteoblasts and osteocytes. It was recently reported that neprilysin-like activity is higher in cultured osteoblasts derived from *Hyp* mice when compared to normal osteoblasts⁴⁸. However, since the neprilysin-like activity was not fully inhibited by thiorphan, a specific neprilysin inhibitor, it is possible that an as yet unidentified enzyme with catalytic properties similar to neprilysin may be up-regulated in *Hyp* mouse osteoblasts⁴⁹.

Our *in situ* hybridization data show increased osteocalcin mRNA levels in bones of *Hyp* mice relative to normal mice at embryonic day 17, but not in postnatal animals, suggesting stage-specific, complex transcriptional and/or post-transcriptional control mechanisms of osteocalcin gene expression. The increase in osteocalcin mRNA levels in E17 *Hyp* mouse bone, without concomitant changes in other markers (Nep, PTH/PTHrP receptor) expressed in the mature osteoblast, suggests that loss of Phex function may affect the expression of only specific genes. The increase in osteocalcin may be indicative of an accelerated pattern of osteocalcin gene expression in the mutant strain. However, given that quantitation of gene expression by *in situ* hybridization may not be reliable, the physiological relevance

of the increase in osteocalcin mRNA in the prenatal period of mutant mice requires further study. Both Phex and osteocalcin are expressed by mature osteoblasts and their expression coincides with the beginning of matrix deposition and/or mineralization in mouse bones^{14,50,51}. It has been suggested that osteocalcin plays a role in the regulation of matrix mineralization^{52,53} and osteoclast chemotaxis⁵⁴. Furthermore, disruption of the two bone-specific osteocalcin genes resulted in excessive bone formation due to increased osteoblast activity⁵⁵. *Hyp* mice show an enlargement of the osteoid seam, suggesting that bone matrix mineralization is retarded, however whether this correlates to the increased levels of osteocalcin in *Hyp* mice is not clear. *Hyp* mice have elevated circulating levels of osteocalcin⁵⁶, but *in vitro* studies assessing the levels of osteocalcin mRNA in calvaria-derived cell cultures failed to demonstrate differences between normal and *Hyp* osteoblasts⁵⁷. More studies are needed to clarify the relation between loss of Phex function, the levels of osteocalcin and the bone formation defects observed in *Hyp* mice.

In summary, we provide *in vivo* evidence for Phex protein expression in osteoblasts, osteocytes and odontoblasts. We show that expression of this 100 to 105 kDa glycoprotein decreases with age and is not detectable in osteoblast precursors and in osteoblasts, osteocytes and odontoblasts of *Hyp* mice. In contrast, the expression of osteoblast markers, osteocalcin, PTH/PTHrP receptor and neprilysin, is not compromised in *Hyp* bone. Our results suggest that the primary skeletal defect in *Hyp* mice is not caused by abnormal osteoblast differentiation but rather by an impairment in mineralization by the osteoblast.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from FCAR and Medical Research Council of Canada (MRC) to GB, LD, PC and HST, and from MRC to MM and JEA. AFR is supported by the Canadian International Development Agency (CIDA) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

REFERENCES

1. McKusick VA 1994 Mendelian inheritance in man: Catalogs of human genes and genetic disorders, 11th ed., John Hopkins University Press, Baltimore, MD.
2. Rasmussen H., Tenenhouse HS 1995 Mendelian hypophosphatemias. In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. McGraw Hill Book Co, New York, 3717-3745.
3. The HYP Consortium 1995 A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nature Genet* **11**:130-136.
4. Holm IA, Huang X, Kundel LM 1997 Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* **60**:790-797.
5. Rowe PS, Oudet CL, Francis F, Sinding C, Pannetier S, Econs MJ, Strom TM, Meitinger T, Garabedian M, David A, Macher MA, Questiaux E, Popowska E, Pronicka E, Read AP, Mokrzycki A, Glorieux FH, Drezner MK, Hanauer A, Lehrach H, Goulding JN, O'Riordan JL 1997 Distribution of mutations in the PEX gene in families with X-linked hypophosphataemic rickets (HYP). *Hum Mol Genet* **6**:539-549.
6. Francis F, Strom TM, Hennig S, Böddrich A., Lorenz B, Brandau O, Mohnike KL, Cagnoli M, Steffens C, Klages S, Borzym K, Pohl T, Oudet C, Econs MJ, Rowe PS, Reinhardt R, Meitinger T, Lehrach H 1997 Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked hypophosphatemic rickets. *Genome Res* **7**:573-585.
7. Dixon PH, Christie PT, Wooding C, Trump D, Grieff M., Holm I, Gertner JM, Schmidtke J, Shah B, Shaw N, Smith C, Tau C, Schlessinger D, Whyte MP, Thakker RV 1998 Mutational analysis of the PHEX gene in X-linked dominant hypophosphataemia. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:3615-3623.
8. Filisetti D, Ostermann G, von Bredow M, Strom T, Filler G, Ehrich J, Pannetier S, Garnier JM, Rowe P, Francis F, Julienne A, Hanauer A, Econs M, Oudet C 1999 Non-random distribution of mutations in the *PHEX* gene, and under-detected

missense mutations at non-conserved residues. *Eur J Hum Genet* **7**, 615-619.

9. Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS 1997 Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* **99**:1200-1209.

10. Du L, Desbarats M, Viel J, Glorieux FH, Cawthorn C, Ecarot B 1996 cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Gemonics* **36**:22-28.

11. Guo R, Quarles LD 1997 Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* **12**:1009-1017.

12. Lipman ML, Panda D, Bennett HPJ, Henderson JE, Shane E, Shen Y, Goltzman D, Karaplis AC 1998 Cloning of human Pex cDNA. Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity. *J Biol Chem* **273**:13729-13737.

13. Grieff M, Mumm S, Waeltz P, Mazzarella R, Whyte MP, Thakker RV, Schlessinger D 1997 Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* **231**:635-639.

14. Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G 1998 Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* **46**:1-10.

15. Kumar R 1997 Phosphatonin - a new phosphatoretic hormone ? (Lessons from tumor induced osteomalacia and X-linked hypophosphatemia). *Nephrol Dial Transplant* **12**:11-13

16. Econs MJ, Drezner MK 1994 Tumor-induced osteomalacia - unveiling a new hormone. *N Engl J Med* **330**:1679-1681.

17. Rowe PS 1994 Molecular biology of hypophosphataemic rickets and oncogenic osteomalacia. *Hum Genet* **94**:457-467.

18. Eicher EM, Southard JL, Scriver CR, Glorieux FH 1976 Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**:4667-4671.

19. Lyon MF, Scriver CR, Baker LRI, Tenenhouse HS, Kronick J, Mandla S

1986 The Gy mutation: another cause of X-linked hypophosphatemia in mouse. *Proc Natl Acad Sc. USA* **83**:4899-4903.

20. Strom TM, Francis F, Lorenz B, Böddrich A, Econs MJ, Lehrach H, Meitinger T 1997 Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* **6**:165-171.

21. Tenenhouse HS, Scriver CR 1978 The defect in transcellular transport of phosphate in the nephron is located in brush-border membranes in X-linked hypophosphatemia (Hyp mouse model). *Can J Biochem* **56**:640-646.

22. Tenenhouse HS, Werner A, Biber J, Ma S, Martel J, Roy S, Murer H 1994 Renal Na(+)-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. *J Clin Invest* **93**:671-676.

23. Tenenhouse HS 1983 Abnormal renal mitochondrial 25-hydroxyvitamin D3-1-hydroxylase activity in the vitamin D and calcium deficient X-linked Hyp mouse. *Endocrinology* **113**:816-818.

24. Tenenhouse HS, Yip A, Jones G 1988 Increased renal catabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in murine X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Invest* **81**:461-465.

25. Tenenhouse HS, Jones G 1990 Abnormal regulation of renal vitamin D catabolism by dietary phosphate in murine X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Invest* **85**:1450-1455.

26. Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, Travers R, Desbarats M, Bouchard F, Hinek A 1988 Defective bone formation by transplanted Hyp mouse bone cells into normal mice. *Endocrinology* **123**:768-773.

27. Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L 1992 Defective bone formation in Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in favor of an intrinsic osteoblast defect. *J Bone Miner Res* **7**:215-220.

28. Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L 1992 Effect of dietary phosphate deprivation and supplementation of recipient mice on bone formation by transplanted cells from normal and X-linked hypophosphatemic mice. *J Bone Miner Res* **7**:523-530.

29. Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L 1995 Effect of

1,25-dihydroxyvitamin D₃ treatment on bone formation by transplanted cells from normal and X-linked hypophosphatemic mice. *J Bone Miner Res* **10**:424-431.

30. Tenenhouse HS 1999 X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant* **14**:333-341.

31. Prado VF, Lee CH, Zahed L, Vekemans M, Nishioka Y 1992 Molecular characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence that detects transcripts in the testis. *Cytogenet Cell Genet* **61**:87-90.

32. Crine P, LeGrimellec C, Lemieux E, Labonte L, Fortin S, Blachier A, Aubry M 1985 The production and characterization of a monoclonal antibody specific for the 94,000 dalton enkephalin-degrading peptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem Biophys Res Commun* **131**:255-261.

33. Jalal F, Jumaire C, Bawab W, Corbeil D, Malo C, Berteloot A, Crine P 1992 Polarized distribution of neutral endopeptidase 24.11 at the cell surface of cultured human intestinal epithelial caco-2 cells. *Biochem J* **288**:945-951.

34. Lemay G, Waksman G, Roques BP, Crine P, Boileau G 1989 Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells. *J Biol Chem* **264**:15620-15623.

35. Roy P, Chatellard C, Lemay G, Crine P, Boileau G 1993 Transformation of the signal peptide/membrane anchor domain of a type II transmembrane protein into a cleavable signal peptide. *J Biol Chem* **268**:2699-2704.

36. Celeste AJ, Rosen V, Buecker JL, Kriz R, Wang EA, Wozney JM 1986 Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J* **5**:1885-1890.

37. Tenenhouse HS, Roy S, Martel J, Gauthier C 1998 Differential expression, abundance, and regulation of Na⁺-phosphate cotransporter genes in murine kidney. *Am J Physiol* **275**:F527-F534.

38. Ecarot B, Desbarat M 1999 1,25-(OH)₂D₃ down-regulates expression of PheX, a marker of the mature osteoblast. *Endocrinology* **140**:1192-1199.

39. Lafrance MH, Vézina C, Wang Q, Boileau G, Crine P, Lemay G 1994 Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-

24.11. Biochem J **302**:451-454.

40. Hammond C, Helenius A 1995 Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* **7**:523-529.

41. Marie PJ, Travers R, Glorieux FH 1981 Healing of rickets with phosphate supplementation in the hypophosphatemic male mouse. *J Clin Invest* **67**:911-914.

42. Marie PJ, Travers R, Glorieux FH 1982 Bone response to phosphate and vitamine D metabolites in the hypophosphatemic male mouse. *Calcif Tissue Int* **34**:158-164.

43. Marie PJ, Travers R, Glorieux FH 1982 Healing of bone lesions with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the young X-linked hypophosphatemic male mouse. *Endocrinology* **111**:904-911.

44. Van der Rest M, de Miguel E, Glorieux FH 1981 The collagen crosslinking in the hypophosphatemic male mouse. *Calcif Tissue Int* **33**:77-79.

45. Delvin EE, Richard P, Desbarats M, Ecarot-Charrier B, Glorieux FH 1990 Cultured osteoblasts from normal and hypophosphatemic mice: calcitriol receptors and biological response to the hormone. *Bone* **11**:87-94.

46. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS 1998 Targeted inactivation of *NPT2* in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:5372-5377.

47. Xiao ZS, Crenshaw M, Guo R, Nesbitt T, Drezner MK, Quarles LD 1998 Intrinsic mineralization defect in *Hyp* mouse osteoblasts. *Am J Physiol* **275**:E700-E708.

48. Lajeunesse D, Delalandre A 1998 Evidence that the putative phosphaturic product present in *Hyp* mouse may be modified, not produced, by osteoblasts and bone marrow stromal cells. *Bone* **5**:SA076.

49. Dubois SG, Lajeunesse D 1999 Evidence that a neutral endopeptidase-like activity of *Hyp* mouse osteoblasts is responsible for the elaboration of the inhibitor of phosphate uptake by renal cells. *J Bone Miner Res* **14**:S224.

50. Liu F, Malaval L, Gupta AK, Aubin JE 1994 Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast

differentiation: polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level. *Dev Biol* **166**:220-234.

51. Desbois C, Hogue DA, Karsenty G 1994 The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* **269**:1183-1190.

52. Romberg RW, Werness PG, Riggs LB, Mann KG 1986 Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. *Biochemistry* **25**:1176-1180.

53. Price PA, Williamson MK, Haba T, Dell RB, Jee, WSS 1982 Excessive mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**:7734-7738.

54. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J 1991 A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* **45**:292-302.

55. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G 1996 Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* **382**:448-452.

56. Gundberg CM, Clough ME, Carpenter TO 1992 Development and validation of a radioimmunoassay for mouse osteocalcin: paradoxical response in the Hyp mouse. *Endocrinology* **130**:1909-1915.

57. Carpenter TO, Moltz KC, Ellis B, Andreoli M, McCarthy TL, Centrella M, Bryan D, Gundberg CM 1998 Osteocalcin production in primary osteoblast cultures derived from normal and Hyp mice. *Endocrinology* **139**:35-43.

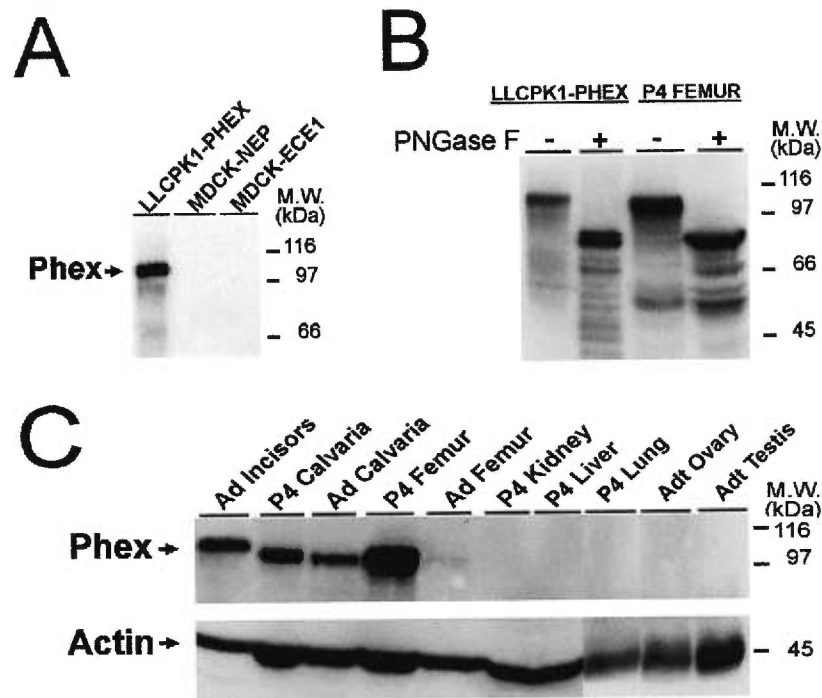
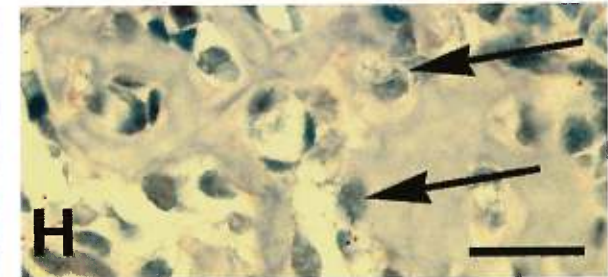
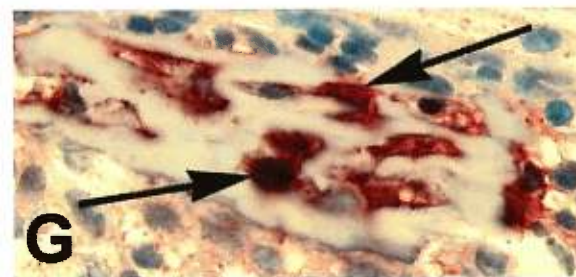
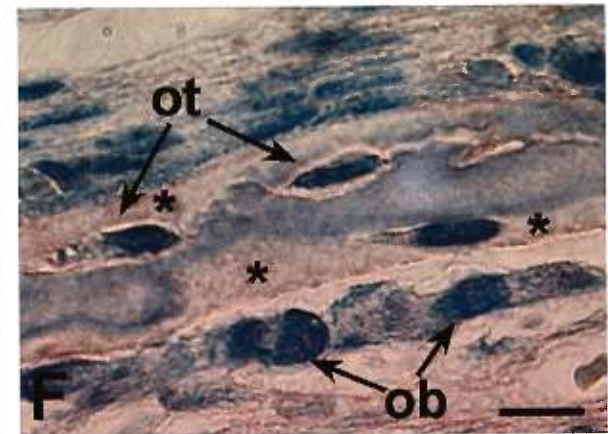
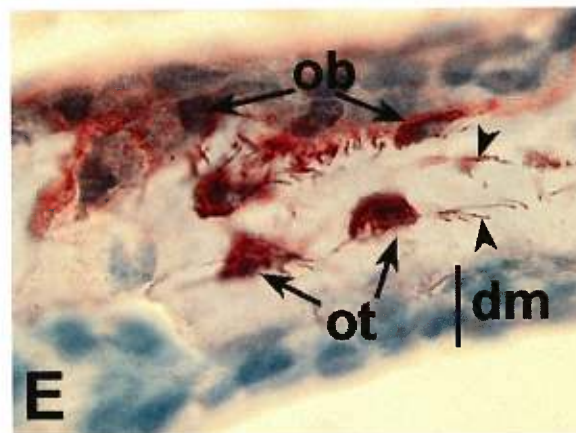
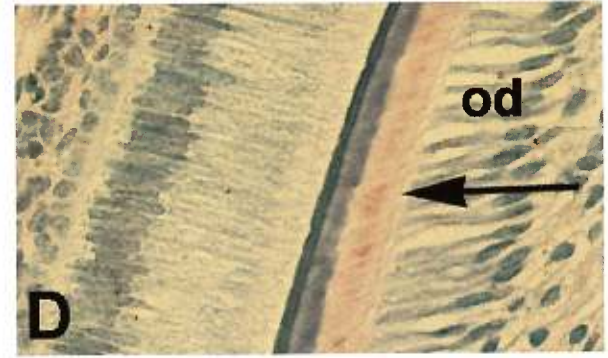
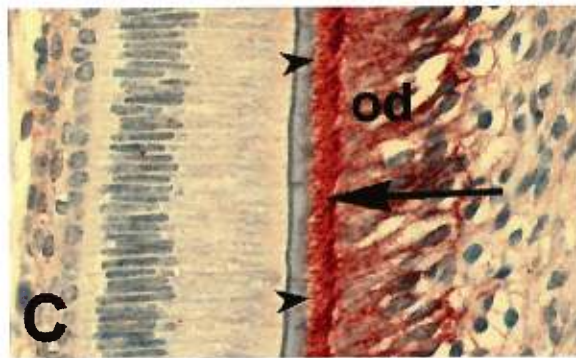
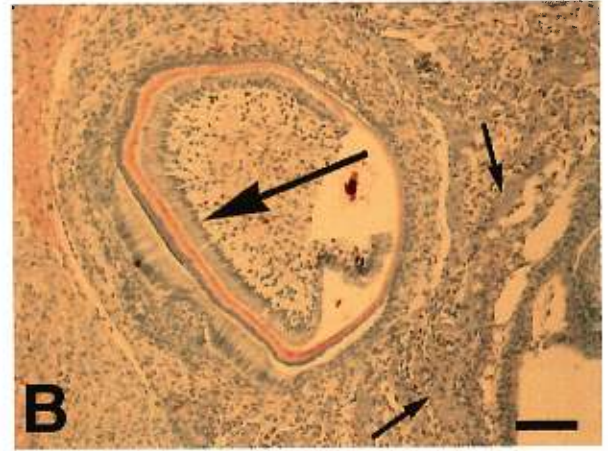


Fig. 1. Immunoblotting of recombinant and endogenous PHEX/Phex. The blots were probed with the anti-PHEX 13B12 mab. **(A)** Proteins extracted from cells transfected with either PHEX, NEP or ECE1 cDNA. **(B)** Glycosylation pattern of recombinant (LLCPK1-PHEX) and endogenous Phex (extracted from P4 femur). Protein extracts were treated in the presence (+) or absence (-) of PNGase F, under reducing conditions. **(C)** Proteins extracted from postnatal (P4) and adult (Adt) mouse calvaria, femur, kidney, liver, lung, ovary and testis. After visualization of Phex, the blot was stripped and incubated with the antibody to actin as an internal control of protein loading. The positions of Phex and actin are shown on the left, and molecular mass markers are indicated on the right side.

Fig. 2. Immunocytochemical distribution of Phex in bones and teeth of 4-day normal (A, C, E and G) and *Hyp* (B, D, F and H) mice shown at low (A and B) and high cellular resolution (C to H). Red staining is seen in incisors (A and C), calvaria (E) and mandible (A and G) of normal mice, but is absent in their *Hyp* counterparts (arrows in B, D, F and H). Osteocytes (ot), osteoblasts (ob) and odontoblasts (od) are intensely stained, as well as their extensions throughout the bone matrix and dentine (arrowheads in C and E). Note the enlargement of the osteoid in *Hyp* mouse calvaria (asterisk in F). The dura mater meningeal layer remained attached to the inner surface of calvaria and its cells are negative for Phex (dm in E). Scale bar for A and B = 100 μm (in B); C, D, G and H = 25 μm (in H); E and F = 10 μm (in F).

+ / Y

Hyp / Y

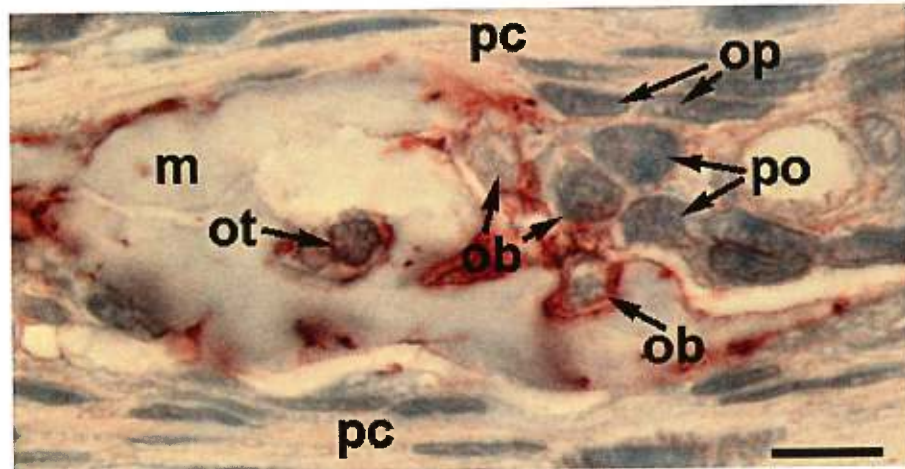


Fig. 3 - Phex immunoreactivity in trabeculae of bone of the mandible of a 4-day mouse shown at high cellular resolution. Red staining indicative of positive Phex immunoreactivity is seen associated with osteocytes (ot) embedded in the matrix (m), osteoblasts (ob) adjacent to the matrix, but not on preosteoblasts (po), osteoblast precursors (op) or on periosteal cells (pc) found in the periosteum. Scale bar = 10 μm .

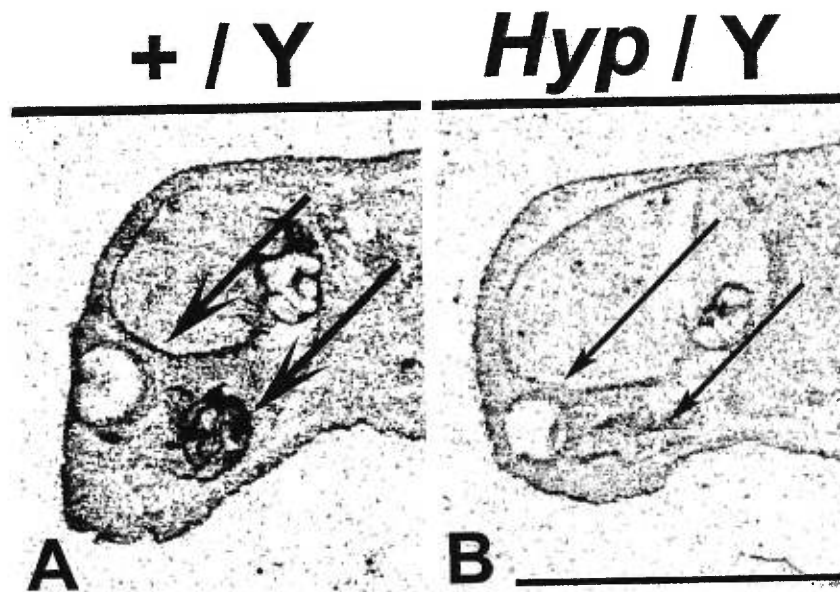
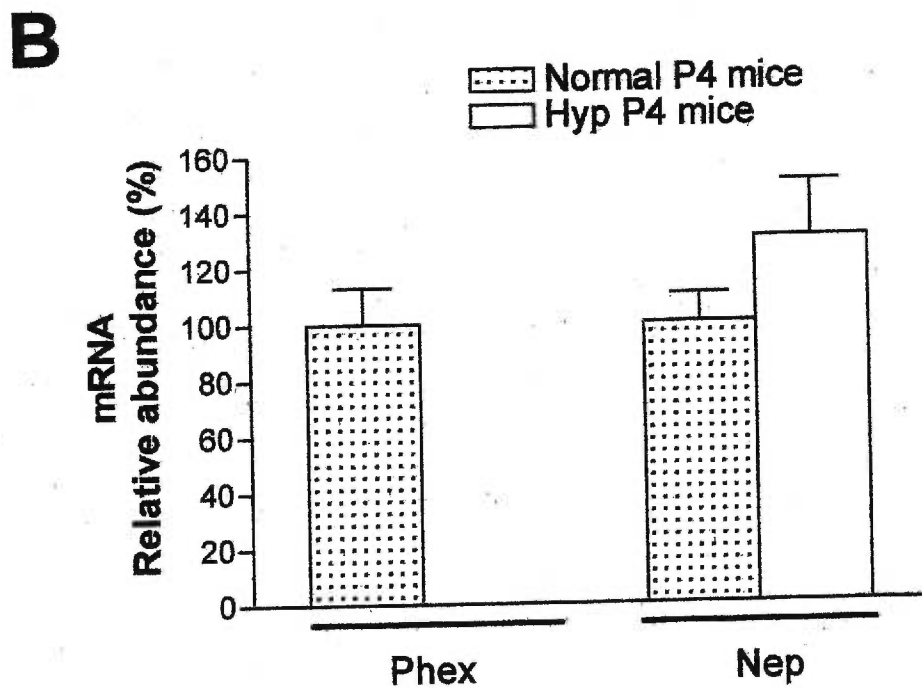
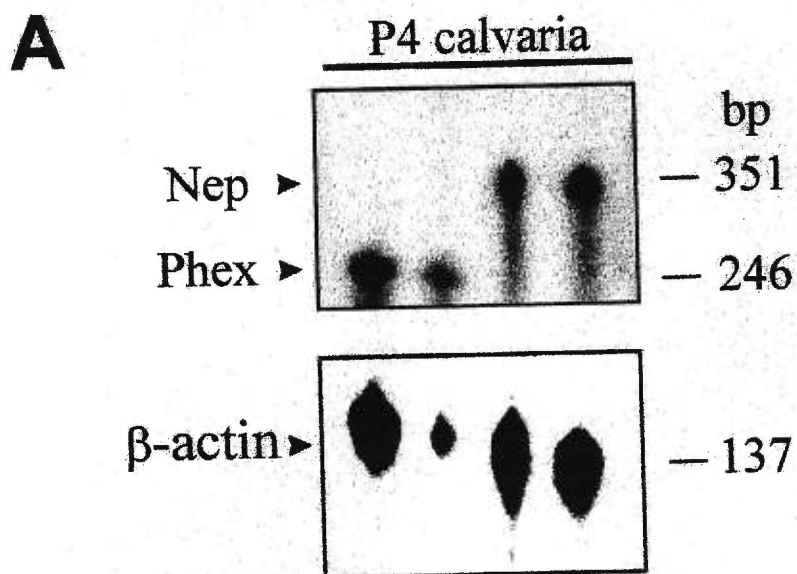


Fig. 4 - ISH comparison of *Phex* mRNA levels in normal (+/Y) and *Hyp* (*Hyp*/Y) P4 mice. The ISH patterns are presented at anatomical resolution in a sagittal plane on X-ray film after hybridization with [³⁵S]-labeled antisense riboprobes. Silver labeling is seen in dark. The arrows in A indicate positive mRNA signal in normal mouse calvaria. Only background level is revealed in calvaria and mandible of its *Hyp* littermate (thin arrows in B). Scale bar = 1 cm.

Fig. 5 - Ribonuclease protection assay of RNA from P4 mouse calvaria. Total RNA (20 μ g) was hybridized with 32 P-labeled Phex, Nep and β -actin riboprobes and treated with RNase T1. (A) Phex, Nep and β -actin protected fragments in P4 normal calvaria visualized after autoradiography. (B) Relative abundance of Phex and Nep mRNAs in normal and *Hyp* mouse calvaria. The protected fragments were precipitated and electrophoresed on polyacrylamide gels. The gels were dried and exposed to a PhosphoImager screen for quantitation of radioactive signals. Phex and Nep phosphoimage signals were related to those of β -actin under conditions in which we previously demonstrated a linear relationship between the quantity of RNA used and the resulting phosphoimager signal; 100% refers to the sum of Phex/ and Nep/ β -actin ratios in normal mice. Data represent the means \pm SD derived from 16 different mouse calvaria RNA preparations.



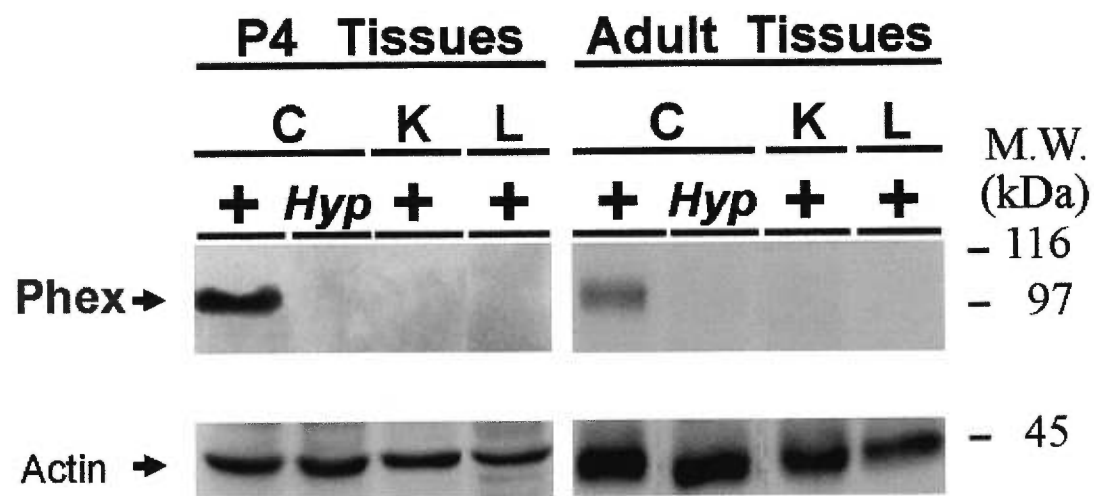


Fig. 6 - Phex protein in normal and *Hyp* mice detected by immunoblotting of protein extracts from P4 and adult calvaria (C), kidney (K) and liver (L). Protein extracts (60 - 100 μ g) derived from normal (+) and *Hyp* mice were loaded in each lane. Actin was used as an internal control for protein loading.

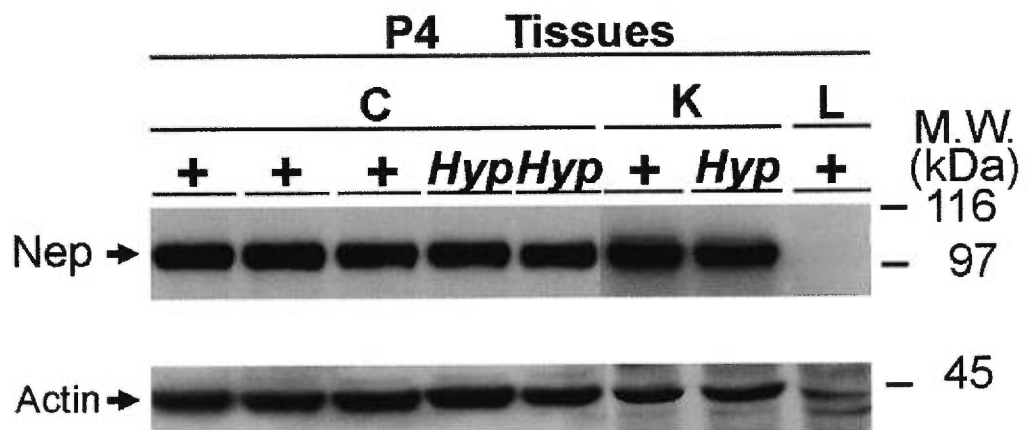


Fig. 7 - Immunoblotting of NEP in calvaria, kidney and liver protein extracts derived from normal (+) and *Hyp* P4 mice, probed with the anti-NEP 18B5 monoclonal antibody. Approximately 60 μ g of protein were loaded per lane. NEP immunoreactivity is seen as a 100 kDa molecular weight band in calvaria and kidney extracts. Actin was used as an internal control.

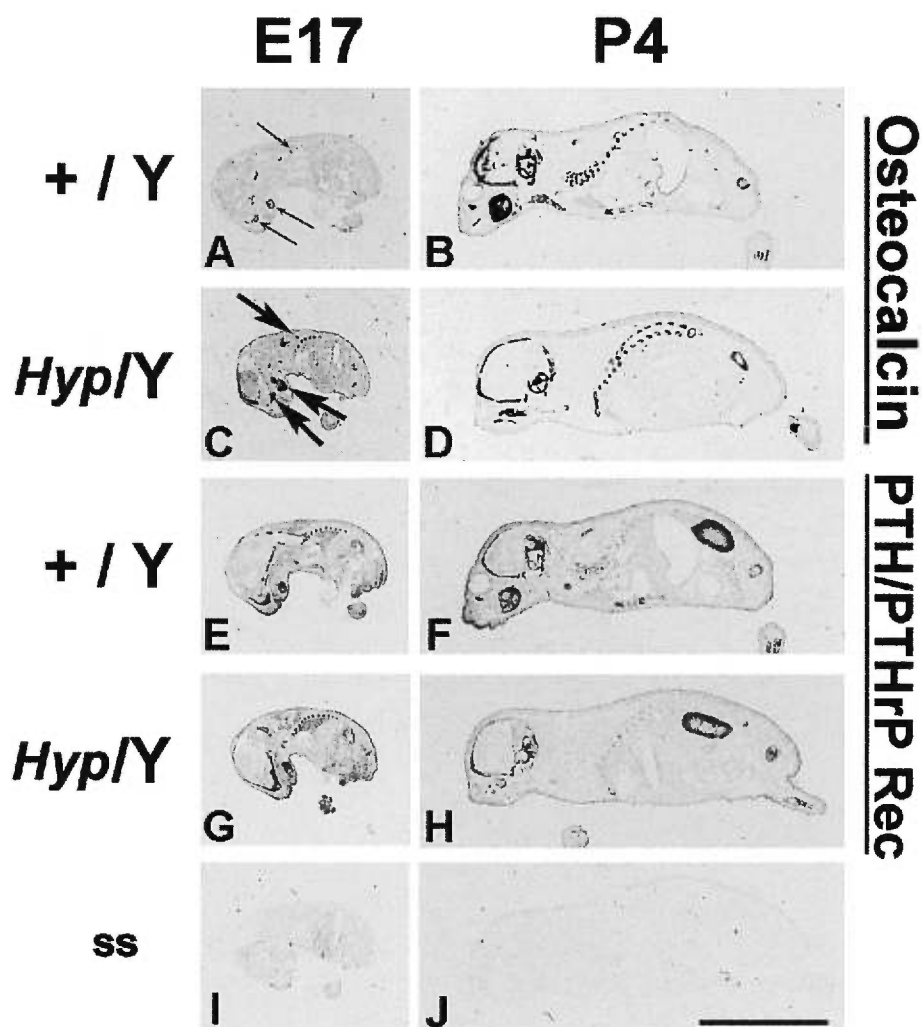


Fig. 8 - ISH of osteocalcin (A, B, C and D) and PTH/PTHrP receptor (E, F, G and H) mRNA in embryonic (E17) and postnatal (P4) normal (+/Y) and *Hyp* (*Hyp*/Y) mice. ISH is shown at anatomical resolution in a sagittal plane on X-ray films after hybridization with [³⁵S]-labeled antisense riboprobes. Silver labeling is seen in dark. The arrows in C point to a more intensely labeled osteocalcin mRNA pattern in E17 *Hyp* mouse skeleton compared with the E17 normal littermate (thin arrows in A). Control sense (ss) hybridizations are shown (in I for osteocalcin and J for PTH/PTHrP receptor). Scale bar = 1 cm.

CHAPITRE 4 - ARTICLE

CELLULAR LOCALIZATION OF NEPRILYSIN IN MOUSE BONE TISSUE AND PUTATIVE ROLE IN HYDROLYSIS OF OSTEOGENIC PEPTIDES

Andréa Frota Ruchon, Mieczyslaw Marcinkiewicz, Kim Ellefsen, Ajoy Basak,
Jane Aubin , Philippe Crine and Guy Boileau

J Bone Miner Res **15**:1266-1274, 2000.

SOMMAIRE

Malgré le fait que la présence de NEP dans des tissus squelettiques soit connue, ni sa localisation cellulaire ni sa fonction ont été établies. Cette étude a pour objectif d'examiner l'expression de NEP dans les os, au niveau des ARNm et de la protéine, en utilisant les techniques d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et de Western blot. Nos résultats démontrent la protéine NEP dans toutes les cellules de la lignée ostéoblastique, depuis le stade des précurseurs jusqu'aux ostéocytes. En plus, nous montrons que les niveaux de NEP dans l'os déclinent avec l'âge, ce que suggère une corrélation entre sa présence et la croissance osseuse.

En sachant que le métabolisme des ostéoblastes et des ostéoclastes soit sous dépendance des hormones et des facteurs peptidiques locaux de l'environnement osseux, nous avons voulu vérifier l'hypothèse d'une participation de NEP dans ce processus. Pour cela, nous avons testé la capacité de NEP d'hydrolyser, *in vitro*, une série de peptides ostéogéniques synthétiques comme le PTHrP₁₋₃₄ ("parathyroid hormone-related peptide"₁₋₃₄), l'ostéotatine (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉), l'OGP ("osteogenic growth peptide"), la calcitonine, le α -CGRP (" α -calcitonin gene-related peptide") et le PTH₁₋₃₄ ("parathyroid hormone 1-34"). Nos résultats démontrent qu'à l'exception de PTH₁₋₃₄, tous les autres peptides sont des substrats de NEP *in vitro*.

Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides

**Andréa Frota Ruchon^{#≠}, Mieczyslaw Marcinkiewicz*, Kim Ellefsen[∞],
Ajoy Basak*, Jane Aubin[°], Philippe Crine^{#∞} and Guy Boileau^{#∞∞}**

**[#]Département de biochimie, Faculté de médecine,
Université de Montréal, Montréal, Canada.**

**^{*}Laboratoires de Biochimie et Neuroendocrinologie Moléculaire,
Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Département de Médecine,
Université de Montréal, Montréal, Canada.**

**[≠]Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, Brasil**

**[∞]Bio Mep Inc A/S Université de Montréal,
Département de biochimie**

**[°]Department of anatomy and cell biology
University of Toronto, Toronto, Canada.**

Running title: Localization and role of NEP in bones.

[∞]To whom correspondence should be addressed at:

**Département de biochimie, Université de Montréal,
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Qc, Canada H3C 3J7.**

Tel: (514) 343-6328; FAX: (514) 343-2210.

ABSTRACT

The regulation of osteoblast and osteoclast metabolism is mediated by both hormones and local bone peptide factors. Peptides and hormones are under control of membrane peptidases such as neprilysin. Neprilysin (NEP) is a widely distributed cell-surface zinc-metallopeptidase that is involved in the regulation of several important physiological processes by controlling the half-life of bio-active peptides. Although NEP is known to be present in skeletal tissues, neither its cellular localization nor its function have been established. To address this question we examined NEP distribution in bones of postnatal mouse. *In situ* hybridization and immunohistochemistry demonstrated that NEP mRNA and protein are associated with bone forming cells including presumptive osteoblast precursors, preosteoblasts, osteoblasts and osteocytes. NEP levels in newborn and adult mice bones were also compared by immunoblotting. Higher amounts of NEP immunoreactivity were observed in newborn as compared with adult bones, suggesting a relationship between NEP expression and bone growth. To further explore this hypothesis, we monitored *in vitro* NEP proteolytic activity using a series of synthetic osteogenic peptides such as parathyroid hormone-related peptide (PTHrP₁₋₃₄), osteostatin (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉), osteogenic growth peptide (OGP), calcitonin, α -calcitonin gene-related peptide (α -CGRP) and parathyroid hormone (PTH₁₋₃₄). Except for PTH₁₋₃₄ all peptides were found to be NEP substrates.

Key words: Neprilysin 24.11 (NEP), peptide, bone growth, peptidases.

INTRODUCTION

Bone formation and resorption are continuous processes throughout the life of skeletal tissue. The osteoblast stimulates bone formation and the osteoclast promotes its resorption^{1,2}. The activities of osteoblasts and osteoclasts are regulated by hormones and local factors. For example, calcitonin, a systemic hormone secreted by the parafollicular cells of the thyroid gland, and parathyroid hormone (PTH), secreted by chief cells of the parathyroid gland, are both involved in bone resorption: calcitonin inhibits bone resorption activity via its binding to high affinity receptors present on osteoclasts³, while PTH, by binding to receptors present on osteoblasts,^{4,5} decreases the production of local factors that inhibits the bone resorption activity of osteoclasts.

In addition to hormones, local peptide factors, including growth factors and cytokines, have important effects on the replication, differentiation and activity of cells of the osteoblastic or osteoclastic lineage. It is thought that local factors have paracrine, autocrine and/or matricrine functions, and are often multifunctional. For example, transforming growth factor- β (TGF- β) has stimulatory effects on osteoblastic cell replication and differentiation^{6,7}, while also inhibiting formation and activation of osteoclasts⁸. Furthermore, interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factors α and β (TNF- α and TNF- β) stimulate bone resorption², while also modifying osteoblastic function⁹. Other local peptides such as PTH-related peptide (PTHrP), osteostatin (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉), osteogenic growth peptide (OGP) and α -calcitonin gene-related peptide (α -CGRP) have also been shown to be important mediators of osteoblast and osteoclast activity^{10,11,12,13,14}.

The action of hormones and local peptide factors on cell metabolism is often regulated by enzymatic activity of cell-surface peptidases. One of the best known peptidases is Neprilysin (Neutral Endopeptidase-24.11; also called NEP; Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen or CALLA, CD10 and enkephalinase) first described in the kidney by Kerr and Kenny^{15,16}. NEP is a member of a family of cell-surface zinc-metallopeptidases that also includes the endothelin-converting enzymes

(ECE-1 and ECE-2)^{17,18}, PEX (for Phosphate regulating gene with homology to Endopeptidase on the X chromosome)¹⁹, also named PHEX, the KELL blood group protein²⁰ and XCE, a recently described protein with homology to ECE and NEP²¹.

NEP shows preference for small peptide substrates and is implicated *in vivo* in the degradation of several bioactive peptides, thus controlling important physiological processes. In the brain, NEP controls the half-life of enkephalin and substance P, two neuropeptides involved in pain control^{22,23}. In the kidney and vasculature, the enzyme is believed to participate in the regulation of blood pressure by locally controlling the activity of the atrial natriuretic factor (ANF), bradykinin and endothelin-1 (ET-1)²³. The enzyme has been shown to be present in many other tissues, although its role has not always been well understood. In particular, significant accumulation of the tritium-labeled NEP inhibitor HACBO-Gly (N-[(2RS)-3-hydroxaminocarbonyl-2-benzyl-1-oxopropyl]glycine) within bone growth plates²⁴ was observed suggesting that NEP, or related enzyme(s), play(s) an important role in bone tissue metabolism.

In the present work, we performed studies with *in situ* hybridization, immunohistochemistry and immunoblotting to examine the distribution of NEP in bones of young and adult mice. Our results provide evidence for the presence of this enzyme on all bone forming cells. We also demonstrate that the levels of NEP expression is higher in bones of young animals. Furthermore, we show that, *in vitro*, several osteogenic peptides are good NEP substrates.

MATERIALS AND METHODS

Animals and preparation of samples

Both postnatal and adult male CD1 mice were used for all analyses. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. For *in situ* hybridization (ISH), we used unfixed, frozen tissues from postnatal day 4 CD1 mice. The newborn animals were prepared as described ²⁵.

For immunohistochemical studies, mice were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg i.p.) and perfused for 30 sec by a canula inserted through the left ventricle into the ascending aorta with lactated Ringer's solution (Abbott), followed by 4% formaldehyde for 20 min. After perfusion, the heads and limbs were cut from each mouse and further fixed by immersion in the same solution at 4°C for additional 12-18 h. They were then dehydrated in graded ethanol baths and processed for embedding in paraffin.

For protein extractions, the animals were anesthetized with diethyl ether and decapitated. Calvaria, femur, kidney and liver were quickly dissected, washed in PBS, immersed in liquid nitrogen for at least 5 hr, and freeze-dried at -80°C for 2 days on a Labconco system (Labconco; Kansas City, MO).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using 5 to 10 μ m paraffin sections cut in sagittal plan of P4 mice heads and limbs. The anti-NEP monoclonal antibody 18B5 ²⁶ at 1/100 dilution was used as a first antibody. The HistomouseTM-SP Kit (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) designed for examination of mouse tissues with mouse primary antibodies was employed for visualization of immunoreaction sites based on HorseRadish Peroxidase-Streptavidin-Biotin amplification method, with AEC chromogen/substrate system. This system generates intense red deposit of immunoreaction. Controls were performed using preimmune mouse IgGs.

In situ hybridization (ISH)

ISH was performed as described²⁵ except for the RNase A concentration (20 µg/ml instead of 200 µg/ml). For the preparation of riboprobes, the plasmid pT7T3D-Pac containing a mouse NEP cDNA insert was purchased from ATCC (catalog number 570653). The insert sequence (1460 bp) was confirmed and contains the last 233 amino acid residues of the coding region (from Gln 521 to the stop codon of the published mouse sequence²⁷) and all the 3'UTR. The plasmid was linearized at Xho1 and Not1 restriction sites, and T3 and T7 polymerases used for anti-sense and sense probe *in vitro* transcription, respectively, in the presence of [³⁵S]-labeled nucleotides, as described²⁵.

Hybridization was examined on X-ray film (exposure time 6 h), followed by autoradiography using NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY) for 8 days at 4°C and development in D19 solution (Kodak). The sections were stained with hematoxylin/eosin and viewed under dark- and bright-field illumination.

Transfections of cultured mammalian cell lines

Recombinant NEP, ECE-1 and PHEX proteins were obtained by transfection of MDCK (ATCC No. CCL-34, for NEP and ECE-1) or LLC-PK₁ cells (ATCC No. CRL-1392, for PHEX) with mammalian expression vectors containing the appropriate cDNA. cDNA for rabbit NEP was obtained previously in our laboratory²⁸. Human ECE-1 cDNA was a generous gift from Dr. O. Valdenaire (Roche, Basel) and human PHEX cDNA was a generous gift from Dr. H.S. Tenenhouse (Hospital for Sick Children, Montreal). Transfections were performed as previously described²⁹.

Protein Extraction and Immunoblotting Analysis

Lyophilized tissues (10% w/v) were placed in 50 mM Tris-HCl pH7.4 buffer containing 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1% n-octylglucoside and a cocktail of protease inhibitors (2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 2 mM β-mercaptoethanol, 100 µg/ml A-PMSF, 10 µM pepstatin) and homogenized with a polytron. After

incubation on ice for 1h, the samples were centrifuged for 30 min on Eppendorf microfuge at 13,000 rpm at 4°C. The supernatants were used for protein determination (DC protein assay kit - Biorad, Mississauga, On) and samples of 60-100 µg of proteins were then analyzed by immunoblotting using the 18B5 anti-NEP monoclonal antibody as the first antibody, an anti-mouse-HRP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as the second one and the Renaissance Kit (NEN life Science Products, Boston, MA) for chemiluminescent revelation. After that, membranes were stripped as recommended by the manufacturer and reprobed with an anti-actin immunopurified IgG (A2066, Sigma) at a 1/500 dilution.

Peptide hydrolysis by purified NEP and HPLC analysis

Osteogenic growth peptide (OGP), osteostatin (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉), PTHrP₁₋₃₄, calcitonin, α -CGRP (all from Bachem, USA) and PTH₁₋₃₄ (from Peninsula Laboratories, Belmont, CA) were incubated at a concentration of 20 µM in 300µl of 500 mM Mes (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid), pH 6.5 at 37 °C for 30 min in the presence of 5 µg of a purified soluble form of NEP²⁸. The hydrolysis was stopped by the addition of trifluoroacetic acid to a final concentration of 0.1%. Identification of peptide products was performed by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C18 µBondapak analytical column (Waters) with a UV detector set at 214 nm. Peptides were resolved with a linear gradient of 15% B to 85% B in 45 min at the flow rate of 0.9 ml/min [mobile phase A= 0.1% trifluoroacetic acid; mobile phase B= 80% acetonitrile (CH₃CN), 0.1% trifluoroacetic acid]. Peaks were collected and analyzed by matrix - assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-Tof MS) (Voyager DE-Pro Instrument, Perseptive Biosystems, USA). α - Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) was used as matrix for all the analysis to promote the ionization upon laser bombardment. Some of the peptide fragments containing Trp residues were detected by UV and by fluorescence (λ_{ex} = 280nm, λ_{em} = 320nm)³⁰.

RESULTS

Distribution of NEP mRNA in 4-day old mouse

To determine the sites of NEP mRNA expression, we examined cryostat sections from a 4-day old mouse by ISH (Fig. 1A). The results showed a widespread, if not ubiquitous, distribution of NEP mRNA throughout most organs formed at this stage. Abundant hybridization was observed in the retina, cerebellum, submaxillary gland, thymus, vertebral medulla with hematopoietic cells, spleen and kidney (Fig. 1A). NEP mRNA was relatively abundant in brain, bones and lungs. Control with sense riboprobes showed essentially no hybridization, except some non-specific labeling in the skin (data not shown).

Localization of NEP mRNA in bone tissue

Cellular localization of NEP mRNA in bone tissue was examined in mandible (Fig. 1B and B'), calvariae and vertebrae (data not shown). NEP mRNA was found in virtually all osteoblast lineage cells, including osteoblast precursors in the periosteum, osteoblasts and osteocytes (Fig. 1B and B'). To confirm cell identification in specimens in which cytological details were better preserved, ISH analysis results were complemented by immunohistochemical localization.

Immunohistochemical localization of NEP in bone tissue

Since NEP is a member of a family of related peptidases that includes PHEX, a protein also expressed in bones²⁵, we first examined the specificity of the NEP monoclonal antibody 18B5. Immunoblot analysis of protein extracts from cells transfected either with PHEX, NEP or ECE-1 cDNAs was performed. Monoclonal antibody 18B5 recognized only NEP as a immunoreactive band of approximately 100 kDa (MDCK-NEP cells in Fig. 2A). This antibody did not recognize recombinant proteins PHEX and ECE-1 (LLC-PK₁-PHEX and MDCK-ECE1 cells in Fig. 2A).

We next performed immunohistochemical localization of NEP in bone tissues using monoclonal antibody 18B5. NEP immunoreactivity was observed in all bone tissues examined in 4-day postnatal mouse including calvaria (Fig. 3A and B),

mandible (Fig. 3C and D), femur (Fig. 3E-G) and vertebra (data not shown). NEP immunoreactivity was present in all cells of the osteoblast lineage: osteoblast precursors, preosteoblasts, osteoblasts and osteocytes. Some, but not all, spindle-shaped cells thought to be osteoblast precursors were labelled within the fibrous periosteum (pc in Fig. 3F and G). Most cuboidal preosteoblasts with round nuclei (po in Fig. 3F) and most osteoblasts recognized by their topographic position on the bone matrix (m) (ob in Fig. 3B, D, F and G) were positively labeled. The large majority of osteocytes, present within bone matrix were intensely labelled with NEP antibodies (oc in Fig. 3B and D).

Levels of NEP-immunoreactivity in newborn and adult bone tissues

To determine whether NEP expression varied with age, total proteins were extracted from newborn (P4) and adult (6 months) mice, and analyzed by immunoblotting. NEP was detected in extracts from calvariae and femurs of newborn (P4) and adult (Adt) mouse (Fig. 2B). NEP extracted from bones co-migrated with its kidney equivalent used as a standard for comparison. As a negative control we used liver extracts. Using actin as an internal control, for normalization on immunoblots, we found much higher levels of NEP immunoreactivity in P4 calvaria and femur than in their adult counterparts.

In vitro degradation of osteogenic peptides by the proteolytic action of purified NEP

Activity of cells within bone tissue is regulated by the action of hormones and local peptides. To determine whether NEP can modulate the action of such bone peptides, we incubated 5 μ g of purified NEP with 20 μ M of OGP, osteostatin, PTHrP₁₋₃₄, PTH₁₋₃₄, calcitonin and α -CGRP under conditions described in Materials and Methods.

As demonstrated in Fig. 4A, OGP was rapidly hydrolyzed by the enzymatic action of NEP. RP-HPLC analysis of the resulting digest indicated the presence of three new peaks, and one undigested peptide peak (peak 4) eluting at 28 min (58.4% CH₃CN). The two new peaks eluting at 16.5 min (40.5% CH₃CN, designated as peak

2) and at 18.5 min (43,6% CH₃CN, designated as peak 3) were identified by mass spectrometry (MALDI-Tof) as respectively OGP₁₋₈ [ALKRQGRT, molecular weight (MW) calculated = 928, observed = 929 (M+H)⁺, 951 (M+Na)⁺ and 967 (M+K)⁺] and OGP₆₋₁₄ [GRTLYGFGG, calculated MW = 926, observed = 927 (M+H)⁺ and 949 (M+Na)⁺]. The other new peak eluting at 15.5 min (39.0% CH₃CN, peak 1) was similarly identified as OGP₉₋₁₄ [LYGFGG, calculated MW = 612, observed 634 (M+Na)⁺]. Thus, these observations clearly indicated that OGP is cleaved by NEP at Gln⁵↓Gly⁶ and Thr⁸↓Leu⁹ positions (Table 1).

The carboxy-terminal extremity of PTHrP (amino acid residues 107-139), also termed osteostatin, was found to be an extremely good NEP substrate (Fig. 4B). The initial osteostatin peak, eluting at 30 min (61,5% CH₃CN), is almost completely replaced by two new products eluting at 21.5 min (53,9% CH₃CN) and 23 min (57,7% CH₃CN) (peaks 1 and 2, respectively). Peak 1 was characterized by MALDI-Tof mass spectrometry as osteostatin₁₃₄₋₁₃₉ [LELDSR, calculated MW = 731, observed = 732 (M+H)⁺ and 754 (M+Na)⁺]. Peak 2 was identified as osteostatin₁₀₇₋₁₃₃ [TRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTSTTS, calculated MW = 2717, observed = 2718 (M+H)⁺]. As shown in Table 1, several putative NEP cleavage sites are present in osteostatin. However, mass spectrometry analysis of hydrolysis products indicated that the peptide bond between Ser²⁷ and Leu²⁸ is the only one cleaved by NEP.

PTHrP₁₋₃₄, the amino-terminal active segment of PTHrP, was also found to be a reasonably good substrate of NEP, although the kinetics of its proteolytic degradation were much slower compared to those of OGP or osteostatin (Fig. 4C). Mass spectrometry analysis of the digested products revealed that cleavage by NEP occurred exclusively in the carboxy-terminus domain of PTHrP₁₋₃₄ (Table I). This peptide was found to be cleaved predominantly at the Phe²³↓Leu²⁴ and at His²⁶↓Leu²⁷ sites leading to the two major cleavage products, namely PTHrP₁₋₂₃ (peak 1 in Fig. 4C)[AVSEHQLLHDKGKSTQDLRRRFF, R_t = 30min (61.4% CH₃CN), calculated MW = 2778, observed = 2783 (M+H)⁺ and 1391 (M+H)/2⁺] and another at R_t = 31.5 min (63.8% CH₃CN) for PTHrP₁₋₂₆ (peak 2 in Fig. 4C) [AVSEHQLLHDKGKSTQDLRRRFFLHH, calculated MW = 3165, observed = 3168 (M+H)⁺ and 1584 (M+H)/2⁺]. We also observed some minor products resulting

from the hydrolysis of the peptide bond between Leu²⁷↓Ile²⁸ after long exposure to the enzyme (data not shown), leading to PTHrP₁₋₂₇ peptide (calculated MW = 3278, observed = 3283).

Calcitonin was also found to be a good NEP substrate, while α -CGRP was hydrolyzed more slowly. In both cases, several hydrolysis products were observed (results not shown), thus confirming the results of Howell et al.³¹ and Katayama et al.³² respectively. Finally, PTH₁₋₃₄ was not cleaved by NEP. All cleavage sites identified, except the Gln⁵-Gly⁶ of OGP, are consistent with the known substrate specificity of NEP. In all cases, the proteolytic degradation of the peptides was inhibited by the addition of 10⁻⁵M phosphoramidon, a widely used NEP inhibitor (results not shown).

DISCUSSION

Bone metabolism involves the activity of cells of the osteoblast and osteoclast lineages which control the formation, mineralization and degradation of the osteoid. The activity of cells of the osteoblast and osteoclast lineages is regulated by various molecules including systemic and local peptide factors. As in other tissues, where peptides are used as messengers or mediators, cell surface peptidases must be present to modulate their activity. One of the best characterized cell surface peptidases is undoubtedly the zinc-metallopeptidase neprilysin (NEP)³³. The presence of NEP in bone tissue has been suggested in the past^{24,31}, but the identity of cells expressing NEP had not been documented. In this paper we have used *in situ* hybridization and immunohistochemical techniques to demonstrate the presence of NEP in bone forming cells of newborn mice. NEP was found, for the first time, associated with osteoblast precursor cells, preosteoblasts, osteoblasts and osteocytes, all identified based on specific morphological features and localization within the tissue. NEP-positive cells were found in all bones examined whether they were generated through intramembranous or endochondral ossification. Furthermore, we have observed a marked decrease in the level of NEP between newborn and adult animals. Whether or not this interesting observation is related to aging needs to be confirmed by future quantitative ontogeny and histochemistry studies. In both calvariae and femurs, immunoblotting showed higher expression of the enzyme in younger versus older animals suggesting a relationship between NEP and bone growth. The decrease in NEP expression in femurs appeared greater than that seen in calvaria. One explanation for this observation might be the presence of NEP in cells in bone marrow which was washed out before extracting femur proteins but was still present in calvaria, but immunohistochemistry on bones of animals of different ages may help to address this further.

In addition to providing evidence for the presence of NEP in cells of the osteoblastic lineage, our work has shown that this peptidase can cleave several peptides known to participate in osteogenesis. Indeed, OGP, osteostatin, PTHrP₁₋₃₄, calcitonin and α -CGRP were all found to be NEP substrates. Our results confirmed

previous observations on the hydrolysis of calcitonin and α -CGRP by NEP^{31,32}. Calcitonin is known to have a direct inhibitory effect on osteoclastic bone resorption³⁴, while α -CGRP, present in osteoblasts and nerve endings associated with periosteal vessels, has been suggested to be a stimulator of differentiation and/or proliferation of cells of the osteoblastic lineage³⁵. Hydrolysis of these peptides by NEP resulted in several peptide products and is thus expected to totally destroy their biological activity in bones.

Hydrolysis of OGP at bonds Gln⁵-Gly⁶ or Thr⁸-Leu⁹ is also expected to inactivate this peptide. OGP, a small 14 amino acid residue peptide with high homology with the C-terminal domain of histone H4¹³, has been shown to have stimulatory effects on osteoblastic cell proliferation and maturation, and on matrix mineralization^{36,37}. OGP is composed of two intramolecular domains: an N-terminal binding domain and a C-terminal active domain³⁸. Our data show that cleavage by NEP separates the two functional domains of OGP thus, presumably, inactivating the peptide.

PTHrP₁₋₃₄, which shows all the activities of PTHrP₁₋₃₆, one of the mature physiological secreted forms of PTHrP, is also a NEP substrate. PTHrP₁₋₃₄ binds to the PTH/PTHrP receptor on osteoblasts and stimulates both the PKA and PKC pathways, both of which have been implicated in promotion of osteoblast proliferation^{5,39}. Signaling via PKA requires the first two N-terminal amino acid residues for intracellular adenylate cyclase activation as well as residues present within the 14-34 region for binding^{40,41}. In contrast, the C-terminal domain (residues 28-34) is sufficient to activate the PKC signaling pathway⁴². Hydrolysis of PTHrP₁₋₃₄ by NEP at the Phe²³-Leu²⁴, His²⁶-Leu²⁷ and Leu²⁷-Ile²⁸ bonds in the C-terminal domain, is expected to abolish the PKA signaling activity of the peptide resulting in the loss of its bone formation activity^{43,44}. However, cleavage at these bonds is also expected to release fragments PTHrP₂₄₋₃₄, PTHrP₂₇₋₃₄ and PTHrP₂₈₋₃₄ which have been shown, at least for PTHrP₂₈₋₃₄, to be able to bind to the PTH/PTHrP receptor and stimulate PKC activity⁴². Although the role of the PKC pathway on osteoblast activity is still not fully understood, it has been suggested that stimulation of this pathway alone is not sufficient to promote bone formation^{43,44}.

The role of NEP in modulating the activity of osteostatin is more difficult to evaluate. Osteostatin (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉) has been shown to be a potent inhibitor of osteoclast function and proliferation in *in vitro* bone resorption assays^{12, 45}, findings recently supported by *in vivo* studies⁴⁶. Osteostatin activity was associated *in vitro* with the pentapeptide T-R-S-A-W present at its N-terminus⁴⁷. Thus cleavage by NEP between Ser²⁷ and Leu²⁸ in the C-terminus of the peptide would not be expected to inactivate the molecule. However, one cannot rule out the possibility that the C-terminal domain of osteostatin carries a yet unknown biological function of its own and/or that it affects the activity of the pentapeptide *in vivo*. Taken together, our results indicate that NEP may play an important role in modulating the osteogenic activity of OGP, PTHrP₁₋₃₄, osteostatin, calcitonin and α -CGRP.

As shown by the mRNA distribution pattern in newborn mice, NEP is a widely distributed peptidase. Past studies have emphasized the importance of NEP in controlling various physiological processes and in modulating cellular differentiation and proliferation (for a review see Koehne et al.⁴⁸). For example, NEP participates in the regulation of blood pressure by cleaving circulating ANP in the kidney and vascular tissue⁴⁹. In fetal human lung, the enzyme is expressed at high levels early in development, and appears to be involved in the growth of the undifferentiated airway epithelium in distal developing airways by controlling the half-life of bombesin-like peptides⁵⁰. Further evidence implicating NEP in cellular proliferation was provided by the recent observations that the enzyme reduced the proliferation of prostate and lung carcinoma cells in culture, again by controlling the half-life of bombesin-like peptides^{51,52}.

Despite its wide tissue distribution, it is striking that much higher NEP protein levels, detected by immunohistochemistry, are associated with osteoblast lineage cells compared to cells of other lineages present in the same sections, including soft connective tissue fibroblasts, epidermal cells and chondrocytic cells. The role of NEP in bones remains obscure but our results suggest that it is involved in osteogenesis at several levels. First, we propose that it acts as a modulator of proliferation and differentiation of cells of the osteoblastic lineage. This hypothesis is supported by the observation that NEP is expressed early in cells of this lineage and by the

demonstration that OGP, PTHrP₁₋₃₄ and α -CGRP, all peptides known to promote differentiation and proliferation of osteoblastic lineage cells, are NEP substrates. Since we did not observe osteoclasts in our tissue sections, we cannot conclude about the presence of NEP in these cells. However, alterations in osteoblast formation and function may, of course, also modulate osteoclast differentiation and activity. Second, we also propose that NEP modulates osteoclast-mediated bone resorption by cleaving osteostatin and calcitonin, two peptides with inhibitory effects on the activity of osteoclasts. Finally, the synthesis of PTHrP by young osteocytes has been documented⁵³. The presence of NEP on these cells may regulate the levels of PTHrP or other unidentified peptide(s) and thus the function of osteocytes in maintaining the integrity of the extracellular matrix⁵⁴. Confirmation of these hypotheses will have to await the *in vivo* use of specific NEP inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from FCAR and Medical Research Council of Canada (MRC) to G.B. and P.C., and from MRC to M.M. A.F.R. is supported by the Canadian International Development Agency (CIDA) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

REFERENCES

- 1 - Raisz LG, Rodan GA 1998 Embriology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM (eds) *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*, 3rd ed. Academic Press, New York, pp 1-22.
- 2 - Canalis E 1996 Regulation of bone remodeling. In: Favus MJ, Christakos S (ed) *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, pp 29-34.
- 3 - Lin HY, Kaji HJ, Lodish H 1991 Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* **25**:1022-1024.
- 4 - Wong GL 1984 Paracrine interactions in bone-secreted products of osteoblasts permits osteoclasts to respond to parathyroid hormone. *J Biol Chem* **259**:4019-4022.
- 5 - Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani S, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT, Jr., Kronenberg HM, Segre GV 1992 Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:2732-2736.
- 6 - Kingsley DM 1994 The TGF- β superfamily: New members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.***8**:133-146.
- 7 - Sakou T 1998 Bone morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone* **22**:591-603.
- 8 - Bonewald LF, Mundy GR 1990 Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res* **250**:261-276.
- 9 - Bowen M 1992 Interleukin 1 and tumor necrosis factor. In: *Cytokines and Bone Metabolism*. Gowen M, ed. CRC Press, Boca Raton. pp71-91.
- 10 - Lee K, Deeds JD, Segre GV 1995 Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal developments of rats. *Endocrinology* **136**:453-463.
- 11 - Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VLJ, Kronenberg HM, Mulligan RC 1994 Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the

parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* **8**:277-289.

12 - Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC 1994 Carboxyl-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts. *J Bone Miner Res* **9**:515-519.

13 - Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhlrad A, Shteyer A, Greenberg Z, Namdar M, Kahn A 1992 Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J* **11**:1867-1873.

14 - Muff R, Born W, Fisher JA 1995 Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological functions. *Eur J Endocrinol* **133**:17-20.

15 - Kerr MA, Kenny AJ 1974 The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* **137**:489-495.

16 - Kerr MA, Kenny AJ 1974 The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* **137**:477-488.

17 - Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K 1994 Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *J Biol Chem* **269**:18275-18278.

18 - Emoto N, Yanagisawa M 1995 Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* **270**:15262-15268.

19 - The HYP Consortium 1995 A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nature Genetics* **11**:130-136.

20 - Lee S, Zambas ED, Marsh WL, Redman CM 1991 Molecular cloning and primary structure of Kell blood group protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:6353-6357.

21 - Valdenaire O, Richards JG, Faull RLM, Schweizer A 1999 XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Mol Brain Res* **64**:211-221.

22 - Roques BP, Fournié-Zaluski MC, Soroca E, Lecomte JM, Malfroy B, Llorens C, Schwartz JC 1980 The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive

activity in mice. *Nature (Lond.)* **288**:286-288.

23 - Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zalusky MC, Deaumont A 1993 Neutral Endopeptidase 24.11: Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* **45**:87-146.

24 - Dutriez I, Sales N, Fournié-Zaluski MC, Roques BP 1991 Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24.11(enkephalinase) studied by in vitro autoradiography in the rat. *Experientia* **48**:290-300.

25 - Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G 1998 Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* **46**:459-468.

26 - Jalal F, Jumaire C, Bawab W, Corbeil D, Malo C, Berteloot A, Crine P 1992 Polarized distribution of neutral endopeptidase 24.11 at the cell surface of cultured human intestinal epithelial caco-2 cells. *Biochem J* **288**:945-951.

27 - Chen C-Y, Salles G, Seldin MF, Kister AE, Reinherz EL, Shipp MA 1992 Murine common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA, CD10/neutral endopeptidase 24.11): Molecular characterization, chromosomal localization and modelling of the active site. *J Immunol* **148**:2817-2825.

28 - Lemay G, Waksman G, Roques BP, Crine P, Boileau G 1989 Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells. *J Biol Chem* **264**:15620-15623.

29 - Roy P, Chatellard C, Lemay G, Crine P, Boileau G 1993 Transformation of the signal peptide/membrane anchor domain of a type II transmembrane protein into a cleavable signal peptide. *J Biol Chem* **268**:2699-2704.

30 - Moran GR, Fitzpatrick PF 1999 A continuous fluorescence assay for Tryptophan Hydrolase. *Analyt. Biochem.* **266**:148-152.

31 - Howell S, Caswell AM, Kenny AJ, Turner AJ 1993 Membrane peptidases on human osteoblast-like cells in culture: Hydrolysis of calcitonin and hormonal regulation of endopeptidase-24.11. *Biochem J* **290**:159-164.

32 - Katayama M, Nadel JA, Bunnett NW, Di Maria GU, Haxhiu M, Borson DB 1991 Catabolism of calcitonin gene-related peptide and substance P by neutral

endopeptidase. *Peptides* **12**:563-567.

33 - Crine P, Dion N, Boileau G 1997 Endopeptidase-24.11. In: Kenny AJ, Boustead CM (eds) *Cell-Surface Peptidases in Health and Disease*, 1st ed, BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp79-98.

34 - Chambers TJ, Moore A 1983 The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J Clin Endocrinol Metab* **57**:819.

35 - Bernard G, Chung SE 1990 The osteogenic stimulating effect of neuroactive calcitonin gene related peptide. *Peptide* **11**:625-632.

36 - Gurevitch O, Slavin S, Muhlrud A, Shteyer A, Gazit D, Chorev M, Vidson M, Namdar M, Berger E, Bleiberg I, Bab I 1996 Osteogenic growth peptide increases blood and bone marrow cellularity and enhances engraftment of bone marrow transplants in mice. *Blood* **88**:4719-4724.

37 - Greenberg Z, Gavish H, Muhlrud A, Chorev M, Shteyer A, Namdar M, Tartakovsky A, Bab I 1997 Isolation of osteogenic growth peptide from osteoblastic MC3T3 E1 cell cultures and demonstration of osteogenic growth peptide binding proteins. *J Cell Biochem* **65**:359-367.

38 - Greenberg Z, Chorev M, Muhlrud A, Shteyer A, Namdar M, Mansur N, Bab I 1993 Mitogenic action of osteogenic growth peptide (OGP): role of amino and carboxi-terminal regions and charge. *Biochim Biophys Acta* **1178**:273-280.

39 - Rouffet J, Barlet JP 1995 Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and bone metabolism. *Arch Physiol Biochem* **103**:3-13.

40 - Rabbani SA, Mitchell J, Roy DR, Hendy GN, Goltzman D 1988 Influence of the amino-terminus on in vitro and in vivo biological activity of synthetic parathyroid hormone-like peptides of malignancy. *Endocrinology* **123**:2709-2716.

41 - Caulfield MP, McKee RL, Goldman ME, Duong LT, Fisher JE, Gay CT, DeHaven PA, Levy JJ, Roubini E, Nutt RF et al. 1990 The bovine renal parathyroid hormone (PTH) receptor has equal affinity for two different amino acid sequences: the receptor binding domains of PTH and PTH-related protein are located within the 14-34 region. *Endocrinology* **127**:83-87.

42 - Gagnom L, Jouishomme H, Whitfield JF, Durkin JP, MacLean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH, Chakravarthy B 1993 Protein kinase C activating domains

- of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* **8**:497-503.
- 43 - Rixon RH, Whitfield JF, Gagnon L, Isaacs RJ, MacLean S, Chakravarthy B, Durkin JP, Neugebauer W, Ross V, Sung W, Willick GE 1994 Parathyroid hormone fragments may stimulate bone growth in ovariectomized rats by activating adenylyl cyclase. *J Bone Miner Res* **9**:1179-1189.
- 44 - Whitfield JF, Morley P, Willick GE, MacLean S, Ross V, Barbier J-R, Isaacs RJ 1999 Stimulation of femoral trabecular bone growth in ovariectomized rats by human parathyroid hormone (hPTH)-(1-30)NH₂. *Calcif Tissue Int* **65**:143-147.
- 45 - Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, Fucase M, Chihara K 1995 Carboxi-terminal peptides from parathyroid hormone-related protein stimulate osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* **136**:842-848.
- 46 - Cornish J, Callon KE, Nicholson GC, Reid IR 1997 Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo. *Endocrinology* **138**:1299-1304.
- 47 - Fenton AJ, Kemp BE, Hammonds RG, Mitchelhill K, Moseley JM, Martin TJ, Nicholson GC 1991 A potent inhibitor of osteoclastic bone resorption within a highly conserved pentapeptide region of PTHrP(107-111). *Endocrinology* **129**:3424-3426.
- 48 - Koehne P, Schaper C, Graf K, Kunkel G 1998 Neutral endopeptidase 24.11: its physiologic and possibly pathophysiologic role in inflammation with special effect on respiratory inflammation. *Allergy* **53**:1023-1042.
- 49 - Kenny AJ, Bourne A, Ingram J 1993 Hydrolysis of natriuretic peptides and some C-receptor ligands by endopeptidase 24.11. *Biochem J* **191**:83-88.
- 50 - Sunday ME, Hua J, Torday JS, Reyes B, Shipp MA 1992 CD10/Neutral Endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. *J Clin Invest* **90**:2517-2525.
- 51 - Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM 1998 Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Medicine* **4**:50-57.
- 52 - Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL 1991 CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyses bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:10662-10666.

- 53 - Kartsogiannis V, Moseley J, McKelvie B, Chou ST, Hards DK, Ng KW, Martin TJ, Zhou H 1997 Temporal expression of PTHrP during endochondral bone formation in mouse and intramembranous bone formation in an in vivo rabbit model. *Bone* **21**:385-392.
- 54 - Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ 1994 Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* **55**:287-99.

Table 1

| Peptide | Protein sequence with identified cleavage sites |
|----------------|---|
| OGP | ALKRQ \Downarrow GRT \Downarrow LYGFGG LYGFGG - peak 1 in Fig. 4A ALKRQGRT - peak 2 in Fig. 4A GRTLYGFGG - peak 3 in Fig.4A Undigested peptide - peak 4 in Fig. 4A |
| PTHrP1-34 | AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFF \Downarrow LHH \Downarrow L \Downarrow IAEIHTA AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFF - peak 1 in Fig. 4C AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHH - peak 2 in Fig. 4C Undigested peptide - peak 3 in Fig. 4C |
| Osteostatin | TRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTSTTS \Downarrow LELDSR LELDSR - peak 1 in Fig. 4B TRSAWLDSGVTGSGLEGDHLSDTSTTS - peak 2 in Fig. 4B |
| Calcitonin | see Howell et al. ²⁹ |
| α -CGRP | see Katayama et al. ³⁰ |

Table 1. Amino acid sequence of osteogenic peptides hydrolyzed by NEP. Hydrophobic amino acid residues are in bold. Cleavage sites identified in this study are indicated by arrows (\Downarrow for major and \downarrow for minor cleavage sites). RP-HPLC peaks identified by MALDI-Tof mass spectrometric analysis are also shown.

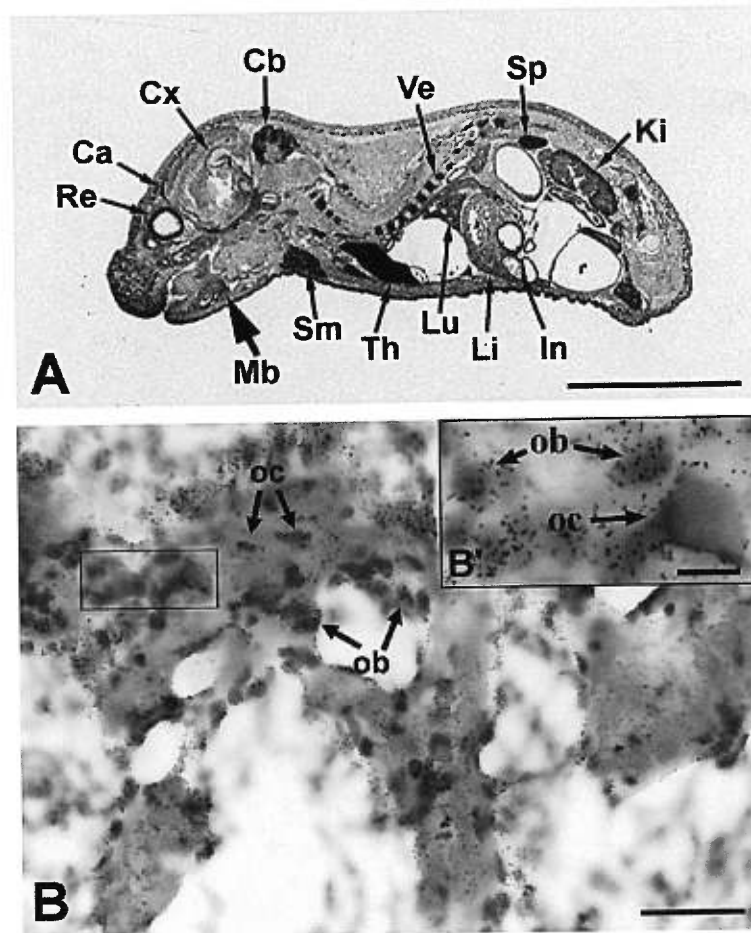


Fig. 1. NEP mRNA localization by *in situ* hybridization in a 4-day old mouse. (A) The pattern of NEP mRNA is presented at anatomical resolution in a sagittal plane on X-ray film after hybridization with [^{35}S]-labeled antisense riboprobe. (B) Sites of NEP mRNA expression in the mandible (large arrow in A) at cellular level. Silver labeling is seen as dark spots in osteoblasts (ob) and osteocytes (oc) identified by their distinct topographic positions. These cells are shown at higher magnification in (B'). The picture in (B') represents the high magnification and high resolution of the fragment in the box on the left. Abbreviations: Ca - calvaria, Cb - cerebellum, Cx - cortex, Ki - kidney, In - intestine, Li - liver, Lu - lung, Mb - mandible, Re - retina, Sm - submaxillary glands, Sp - spleen, Th - thymus and Ve - vertebra. Scale bar = 1 cm (A), 40 μm (B) and 10 μm (B').

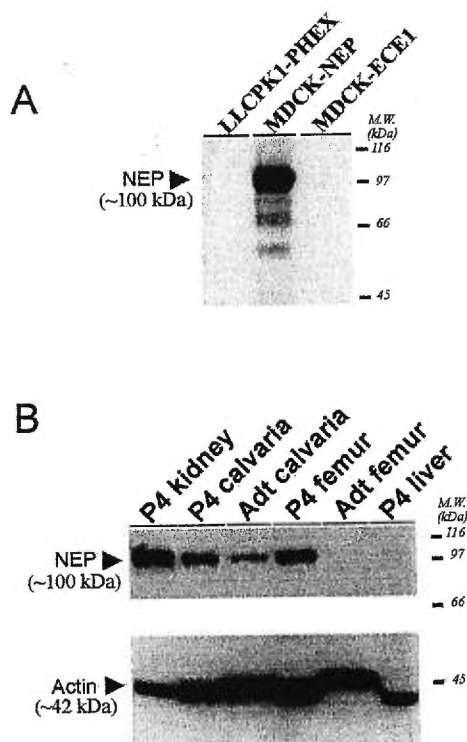
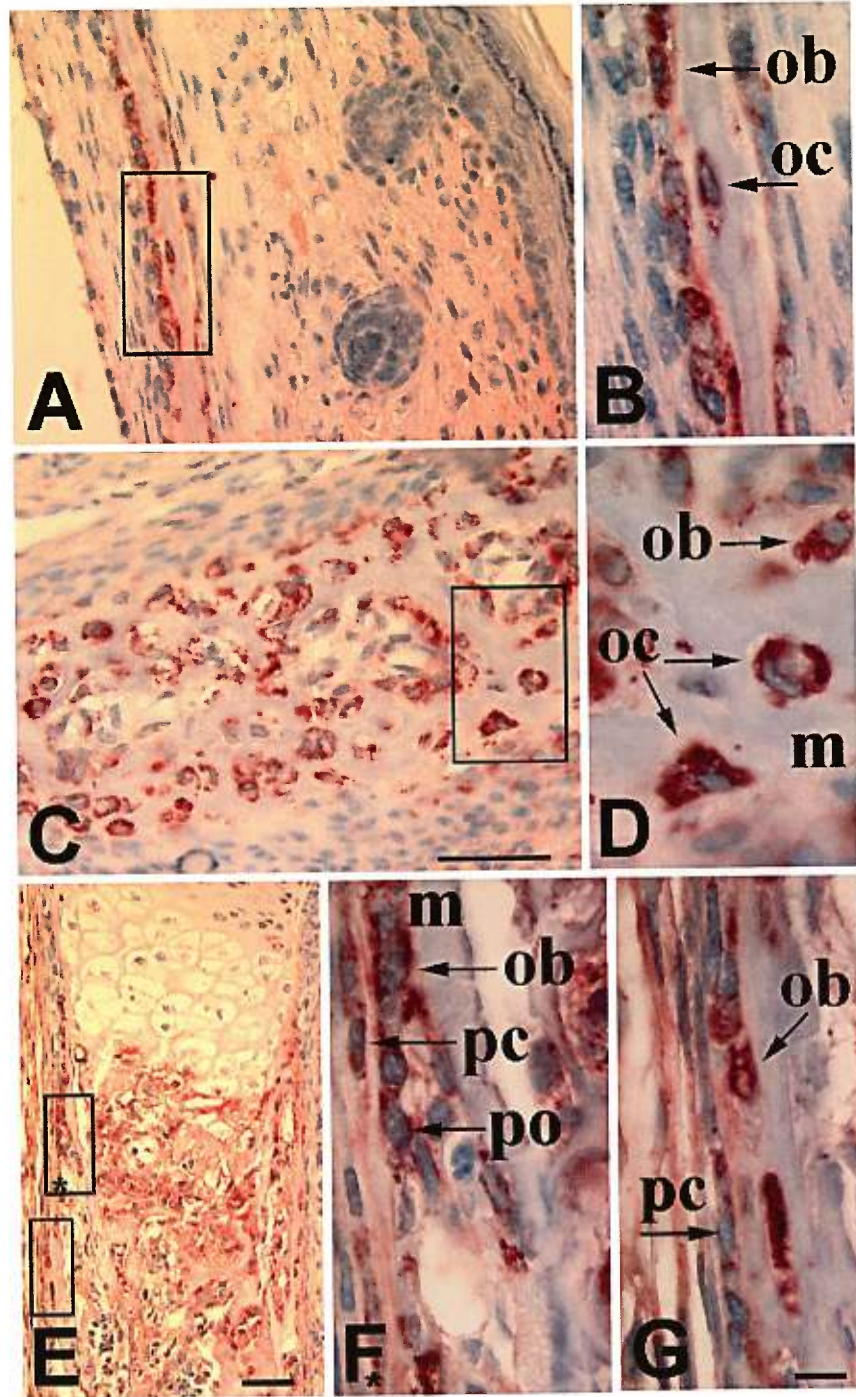


Fig. 2. Immunoblotting of recombinant and endogenous NEP. The blots were probed with the anti-NEP monoclonal antibody 18B5. (A) Proteins extracted from cells transfected with either PHEX, NEP and ECE1 cDNA as described in Materials and Methods. The position of recombinant NEP is indicated on the left and molecular mass markers are shown on the right. (B) Proteins extracted from mouse kidney, calvaria, femur and liver including postnatal (P4) and adult animals (Adt). After visualization of NEP, the blot shown in (B) was stripped and incubated with an antibody to actin, as an internal control of protein loading. The positions of NEP and actin are shown on the left, and molecular mass markers are indicated on the right side.

Fig. 3. Distribution of NEP immunoreactivity in bones of 4-day old mouse shown at low (A, C and E) and high cellular resolution (B, D, F and G). Red staining of positive immunoreactivity is seen in calvaria (A and B), mandible (C and D) and femur (E to G). Osteocytes (oc), osteoblasts (ob), preosteoblasts (po, in F) and some periosteal cells (pc, in F) are intensely labeled (arrows). F and G are highly magnified pictures of two boxes shown in E, one is indicated with an asterisk. Scale bar for A and C = 50 μm (in C); B, D, F and G = 10 μm (in G) and E = 100 μm .



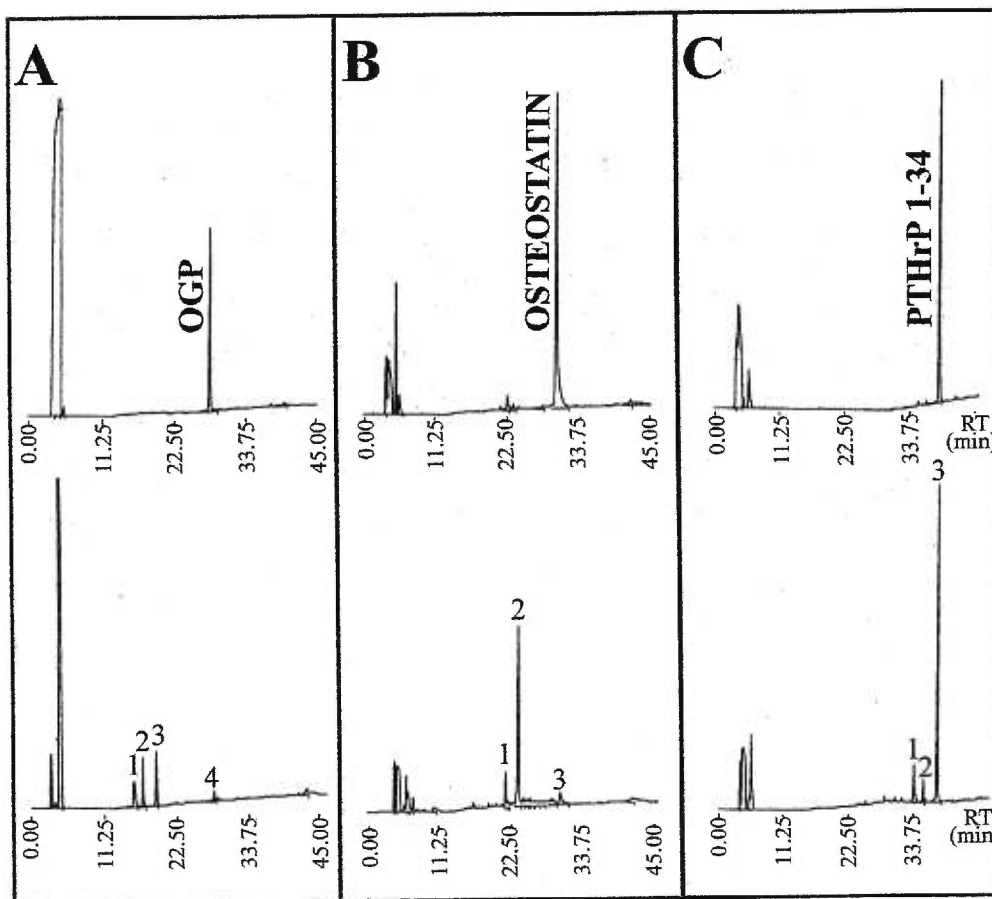


Fig. 4. Degradation of bone-related peptides by purified NEP. Peptides were incubated in the absence or the presence of NEP and analyzed by RP-HPLC under conditions described in Materials and Methods. A: osteogenic growth peptide (OGP); B: osteostatin (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉); C: PTHrP₁₋₃₄. Upper traces: in the absence of NEP; lower traces: in the presence of 5 µg of purified NEP.

CHAPITRE 5 - ARTICLE

MOLECULAR CLONING AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A NEW SOLUBLE ZINC-METALLOPEPTIDASE OF THE NEPRILYSIN FAMILY

Galia Ghaddar, Andréa Frota Ruchon, Mélanie Carpentier,
Mieczyslaw Marcinkiewicz, Nabil G. Seidah, Philippe Crine,
Luc DesGroseillers and Guy Boileau.

Biochem J 347:419-429, 2000.

SOMMAIRE

Dû à leur rôle dans le contrôle de l'activité de plusieurs peptides bio-actifs, les membres de la famille de la NEP ont été identifiés comme des cibles potentielles pour le design d'agents thérapeutiques. À présent, six membres de cette famille ont été rapportés: la NEP, l'ECE-1 et l'ECE-2 ("endothelin-converting enzyme"), le groupe KELL des protéines sanguines, la PHEX et la XCE. Afin d'identifier des nouveaux membres de cette famille de peptidases, une stratégie de RT-PCR employant des oligonucléotides dégénérés dérivés des régions conservées des séquences de NEP, ECE-1 et PHEX, a été mise en place. Nous rapportons le clonage d'un nouveau membre de la famille de la NEP, appelé NL1 pour "NEP-like 1", obtenu à partir des ARNm des testicules de souris adulte. NL1 est la glycoprotéine qui présente la plus grande identité avec NEP parmi les constituants de cette famille. Cependant, contrairement à NEP et aux autres peptidases de la famille, qui sont des protéines membranaires intégrales de type II, la NL1 est sécrétée lors de son expression par des cellules de mammifère en culture. L'enzyme recombinante exhibe une activité peptidasique semblable à celle de la NEP et est inhibée de façon efficace par le phosphoramidon et par le thiorphan, deux inhibiteurs de la NEP. Les études de localisation par Northern blot, le RT-PCR et l'hybridation *in situ* ont démontré une présence importante des ARNm de NL1 dans les testicules, plus spécifiquement dans les spermatides rondes et allongées. Cette distribution des ARNm suggère que la NL1 peut être impliquée dans la formation du sperme ou dans d'autres processus liés à la fertilité.

**Molecular cloning and biochemical characterization
of a new mouse testis soluble zinc-metallopeptidase
of the neprilysin family**

**Galia Ghaddar, Andréa Frota Ruchon^{*#}, Mélanie Carpentier^{*},
Mieczyslaw Marcinkiewicz[∞], Nabil G. Seidah[†], Philippe Crine,
Luc DesGroseillers and Guy Boileau^θ.**

Département de biochimie, Faculté de médecine,
Université de Montréal, Montréal, Canada.

[∞]Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire
and [†] Laboratoire de Biochimie Neuroendocrinologique

Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Département de médecine,
Université de Montréal, Montréal, Canada.

[#]Departemento de Morfologia,
Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, Brasil.

^θ To whom correspondence should be addressed at:

Département de biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-
Ville, Montréal, Qc, Canada H3C 3J7. Tel: (514) 343-6328; FAX: (514) 343-2210.

*These two authors have contributed equally to the work

Running title: New peptidase of the neprilysin family

Abbreviations used: NEP, Neprilysin; ECE, endothelin converting enzyme; PHEX, Phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome; XCE, X-converting enzyme; RT-PCR, reverse transcription/polymerase chain reaction; NL, NEP-like; endoH, endoglycosidase H; PNGaseF, Peptide: N-glycosidase F; ISH, *in situ* hybridization; RER, rough endoplasmic reticulum.

ABSTRACT

Because of their roles in controlling the activity of several bio-active peptides, members of the Neprilysin (NEP) family of zinc metallopeptidases have been identified as putative targets for the design of therapeutic agents. Presently, six members have been reported: these are NEP, ECE-1 and ECE-2 (endothelin-converting enzyme), the KELL blood group protein, PHEX (phosphate regulating gene with homologies to endopeptidase on the X chromosome) and XCE. In order to identify new members of this important family of peptidases, we designed an RT-PCR strategy based on conserved amino acid sequences of NEP, ECE-1 and PHEX. We now report the cloning from mouse testis of a novel NEP-like protein that we called NL1 (NL: NEP-like). NL1 is a glycoprotein that shows strongest sequence identity to NEP among the members of the family. However, in contrast to NEP and other members of the family, which are type II integral membrane proteins, NL1 was secreted when expressed in cultured mammalian cells, likely due to cleavage by a subtilisin-like convertase at a furin-like site located 22 amino acid residues in carboxy-terminus of the transmembrane domain. The recombinant enzyme exhibited NEP-like peptidase activity and was efficiently inhibited by phosphoramidon and thiorphan, two inhibitors of NEP. Northern blot analysis and *in situ* hybridization showed that NL1 mRNA is found predominantly in testis, specifically in round and elongated spermatids. This distribution of NL1 mRNA suggests that it could be involved in sperm formation or other processes related to fertility.

Key words: metallopeptidases, neprilysin, NL1, testis, germ cells.

INTRODUCTION

Peptides are used by cells from yeast to mammals to elicit physiological responses. The use of peptides as messengers usually involves the following steps: 1) production and release of the peptide by a specific cell, 2) interaction of the peptide with a receptor on the surface of the target cell, and 3) degradation of the peptide to terminate its action. The first and last steps of this scheme require the participation of proteases/peptidases. There is increasing evidence that membrane-associated zinc-metallopeptidases play important roles in both of these steps. Although activation of inactive prohormone precursors into bioactive peptides is generally performed by proteases of the subtilisin family located either in the Trans Golgi Network or in secretory granules of the cell [for a review see: 1], a few peptides require a final processing step after secretion. This step involves the action of membrane-associated zinc metallopeptidases. Two enzymes are particularly well characterized: Angiotensin Converting Enzyme (ACE) which cleaves inactive angiotensin I into angiotensin II [for a review see: 2] and Endothelin Converting Enzymes (ECEs) which cleave isoforms of big endothelin into endothelins [for a review see: 3]. In addition to their role in peptide activation, cell surface zinc-metallopeptidases have also been implicated in the termination of the peptidergic signal by degrading the active peptides into inactive fragments. One of the best known of these peptidases is probably Neprilysin (Neutral endopeptidase-24.11, NEP) which has been implicated in the physiological degradation of several bioactive peptides [for reviews see: 4,5]. In the brain, NEP controls the half-life of the enkephalins and substance P, two neuropeptides involved in pain control [6; reviewed in: 7]. In the kidney, the enzyme is believed to participate in the regulation of blood pressure by locally controlling the activity of the atrial natriuretic peptide (ANP), bradykinin and endothelin-1 (ET-1) [8-10; reviewed in: 7]. NEP has been shown to be present in many other tissues although its role is not always well understood.

Interestingly, NEP and the ECEs show significant structural similarities and appear to belong to a family of peptidases that includes PHEX (formerly PEX), a peptidase involved in the regulation of phosphate homeostasis [reviewed in: 11], the

KELL blood group protein [12] and XCE, a newly discovered enzyme present in the nervous system [13]. ACE, despite being a cell-surface Zn-metallopeptidase with some similarities to NEP, is not strictly speaking a member of the same family [14]. Because of their important role as regulators of bioactive peptide activity, these enzymes (more specifically NEP and the ECEs) have been identified as putative targets for therapeutic intervention, similar to the way inhibition of ACE is used to control blood pressure. However, the recent discovery of PHEX and XCE, and the possibility that yet other unknown members still exist, raise the problem of the specificity of the therapeutic agents to be developed.

To search for other members of the NEP family, we designed an RT-PCR strategy based on conserved regions of NEP, ECE-1 and PHEX. In the present paper, we report the molecular cloning, tissue distribution, expression and partial biochemical characterization of a new NEP-like peptidase that we called NL1 (NL for NEP-like).

MATERIALS AND METHODS

DNA manipulations

All DNA manipulations, phage library screening, and plasmid preparations were performed according to standard protocols [15,16]. Site-directed mutagenesis was performed using a PCR-based strategy as described previously [17].

mRNA purification and RT-PCR protocol for identification of new members of the neprilysin family

mRNAs were prepared from mouse testis using Quick Prep Micro mRNA purification kit (Pharmacia Biotech). First strand cDNA was synthesized from 1 µg of mRNA using the First-Strand cDNA synthesis kit (Pharmacia Biotech).

Two sense primers, oligonucleotide 3817 (5'-TGGATGGA^T/cG^A/cIG^G/_AIACI^A/cA-3') and oligonucleotide 3719 (5'-^A/_GTIGTITT^T/cCCIGCIGGI^A/_G^T/_AI^C/_TT^G/cCA-3') corresponding respectively to amino acid residues 459 to 465 and 552 to 560 of NEP sequence, and one antisense primer, oligonucleotide 3720 (5'-AIICCICCI^A/_T^C/_T^A/_GTCIGCI^G/_A^C/_T^A/_GTT^T/cTC-3') corresponding to amino acid residues 646 to 654 (see Fig. 1), were synthesized. PCR was performed with 5 µl of cDNA template and 1 µl of Taq DNA polymerase in a final volume of 100 µl, containing 1 mM MgCl₂, 2 µM of each oligonucleotide 3817 and 3720, 200 µM of each dNTP and 5% DMSO. Cycling profiles included an initial denaturation step of 5 min at 94°C, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 40°C and 1.5 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 10 min. One half of the amplified DNA was fractionated on a 2% agarose gel and fragments ranging in size between 500-700 bp were purified and resuspended in a final volume of 50 µl. A second round of PCR was done with primers 3719 and 3720, using as template either 10 µl of the first PCR reaction or 5 µl of the purified fragments, and the new PCR products were ligated in pCR2.1 vector (Invitrogen). Several identical clones corresponded to a potential new member of the NEP family. We called this member NL1 for NEP-like 1.

Cloning of full-length NL1 cDNA

The cloned NL1 PCR fragment was used as probe to screen a mouse testis λ Uni-ZAPTMXR cDNA library (Stratagene). Twelve out of a hundred positive phages were plaque purified and subcloned into pBS SK vector (Stratagene). As the longest clone analyzed presented an incomplete ORF (pBS-NL1A), 5'RACE with primers located in vector (5'-TAGTGGATCCCCCGGGCTGCAG-3', sense primer) and NL1 (5'-ACCAAACCTTTCCTGTAGCTCC-3', antisense primer, nt 1303 to 1324 of NL1; Fig. 2) was subsequently performed on the DNA of the remaining semi-purified positive clones. Amplification was performed with 1 μ l of Vent polymerase in a final volume of 100 μ l containing 50 ng of DNA, 4 mM of MgSO₄, 1 μ M of each oligonucleotide, 200 μ M of each dNTP and 10% DMSO. Cycling parameters included an initial denaturation step of 1 min at 94°C, 25 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 1 min at 72°C, and an incubation of 10 min at 72°C. A PCR fragment of the expected length was subcloned into pCR2.1 vector (clone pCR-NL1A), but sequencing revealed no initiator ATG codon. A nested 5'RACE was then performed on mouse testis cDNA using the Marathon Ready cDNA kit (Clontech) with sense oligonucleotides AP1 and AP2 (from the kit) and NL1 antisense oligonucleotides 5'-CCTGAGGGCTCGTTTTACAACCGTCCT-3' (nt 503 to 529 of NL1; Fig. 2) and 5'-CTCATCCCAGGAGAAGTGTAGCAGGCT-3' (nt 475 to 502 of NL1; Fig. 2) as recommended by the supplier. The resulting fragment was cloned into pCR2.1 vector (pCR-NL1B). Since only ten bp were missing for the initiator ATG codon, we reconstructed the 5' end of the cDNA by PCR-amplifying clone pCR-NL1A with sense primer 5'-CCACCATGGTGGAGAGAGCAGGCTGGTGTTCGGAAGAAG-3' (nt 332 to 364 of NL1; Fig. 2; the 10 missing nucleotides are underlined) and antisense primer 5'-ACCAAACCTTTCCTGTAGCTCC-3' (nt 1303 to 1324 of NL1; Fig. 2) using Vent polymerase as described above. The DNA fragment was then inserted into pCR2.1 (clone pCR-NL1C). The entire ORF was reconstituted following digestion of pBS-NL1A and pCR-NL1C with *Eco*RI and *Pf*MI. The 5' end of NL1 cDNA was excised from pCR-NL1C and ligated into pBS-NL1A at the corresponding sites, resulting in plasmid pBS-NL1B.

For expression studies, a *Bam*HI/*Apa*I fragment generated out of pBS-NL1B,

corresponding to the full length cDNA of NL1, was inserted into pCDNA3/RSV [18] vector.

Production of polyclonal antibodies

A plasmid for the production in *Escherichia coli* of a GST fusion protein with NL1 was constructed using pGEX-4T-3 expression vector (Pharmacia Biotechnologies). A 255 bp fragment from NL1 was amplified by PCR with Vent polymerase using sense primer 5'-GCTACGGGATCCGTGGCCACTATGCTTAGGAA-3' (nt 1139 to 1158; Fig. 2) and antisense primer 5'-CGATTGCTCGAGTGGGAACAGCTCGACTTCCA-3' (nt 1377 to 1396; Fig. 2). Both pGEX-4T-3 and the PCR product were digested with *Bam*HI and *Xho*I and ligated. The recombinant protein was produced and purified according to the supplier's instructions. Five weeks old female balb/c mice were immunized at monthly intervals for 3 months with 20 µg of the recombinant NL1 fragment in Freund's adjuvant and antisera were subsequently collected.

Cell culture and transfection

Human Embryonic Kidney (HEK 293) cells were maintained in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), and supplemented with penicillin at 60 µg/ml, streptomycin at 100 µg/ml and fungizone at 0,25 µg/ml. Transfections of cells with appropriate plasmids were performed by the calcium/phosphate-DNA coprecipitation method [19]. To establish permanent cell lines, G418 selection was initiated 48 h after the transfections at 400 µg/ml for 12 days and gradually decreased at 100 µg/ml.

LLC-PK₁ cells transfected with pRcCMV-sNEP were maintained as described previously [20].

Immunoblot analysis

For immunoblot analysis, cells were incubated for 16 h in synthetic DMEM medium containing 2mM sodium butyrate. Cellular proteins were solubilized as

previously described [21]. Secreted proteins recovered in culture media were concentrated approximately 10 fold by ultrafiltration. Immunoblot analysis were performed using the NEN Renaissance kit with the polyclonal antibody specific to NL1 or the α 1-antitrypsin inhibitor antibody (Calbiochem; LaJolla, CA) followed by the appropriate horseradish peroxidase-conjugated IgG (Vector Laboratories).

For the glycosylation studies, proteins were incubated with endoglycosidase H (endoH) or peptide:N-glycosidase (PNGaseF) as suggested by the distributor (NEB).

Enzymatic activity assays

NL1 activity was monitored and compared to sNEP activity using (Tyrosyl-[3,5- 3 H])(D-Ala₂)-Leu₅-enkephalin (50 Ci/mmol) (Research Products International Inc.), as already described [21,22]. K_m values were determined by the isotope-dilution method. The inhibitory effects of phosphoramidon and thiorphan were also assessed as previously described [21].

HPLC analysis of the hydrolysis of Leu-enkephalin

Five μ g of Leu₅-enkephalin were incubated at 37°C for one hour in 50mM MES, pH 6.5, with concentrated culture medium of HEK 293 cells expressing NL1 (~300 μ g of total proteins) or LLC-PK₁ cells expressing sNEP (~30 μ g of total proteins), in absence or presence of 0.1 mM phosphoramidon. Hydrolysis products were separated by reversed-phase HPLC as described previously [23]. Tyr-Gly-Gly and Phe-Leu were both identified by elution profiles of synthetic marker peptides.

Northern blot analysis

A mouse multiple tissue poly(A)⁺ mRNA blot (Clontech) was hybridized with a [32 P]dCTP random primer labelled probe in ExpressHyb solution (Clontech). The blot was washed according to the manufacturer's recommendations and exposed to Fuji RX film for 7 days at -80°C with intensifying screens.

RT-PCR screening of mouse tissues

First strand cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA from mouse tissues and oligo(dT) as primer, using Gene Amp RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer). For the PCR reactions, primers 5'-TGGCGAGAGTGTGTCAGCTATGTC-3' and 5'-CTTCCAAAATGTAGTCAGGGTAGCCAATC-3' were used with Taq polymerase. One tenth of the PCR products were visualized on a 4% agarose gel.

In situ hybridization

To construct a plasmid for the synthesis of cRNA probes for ISH, pCR-NL1A was used as template to amplify a 452 bp fragment by PCR with sense primer 5'-GGAGCCATAGTGACTCTGGGTGTC-3' (nt 416 to 439; Fig. 2) and antisense primer 5'-GACGCTCAGCAGGGGCTCAGAGTC-3' (nt 842 to 865; Fig. 2). The amplification product was inserted into pCRII vector (Invitrogen). Synthesis of riboprobes and protocols for ISH were as described previously [24].

RESULTS

Cloning and sequence analysis of mouse NL1 cDNA

In order to isolate cDNAs for new members of the NEP family, we developed an RT-PCR strategy based on fact that NEP, ECE-1 and PHEX share regions of significant sequence identity (Fig. 1). Following RT-PCR on testis mRNAs with nested primers, a DNA fragment of approximately 300 bp was amplified. This DNA fragment was cloned and the plasmids from 24 independent colonies were sequenced: 3 clones had no insert, 4 clones had DNA fragments not related to the NEP family, 7 clones had sequences corresponding to mouse NEP and 3 clones had sequences corresponding to mouse PHEX, showing that our approach efficiently allowed the identification of members of the family. Moreover, 7 identical clones had a new cDNA presenting sequence similarities to members of the NEP family. The full-length cDNA was subsequently obtained by screening a mouse testis λ cDNA library followed by 5'RACE, as described under *Materials and Methods*. Its nucleotide and deduced amino acid sequences shown in Fig. 2 confirm that we cloned a novel NEP-like protein, referred to thereafter as NL1.

NL1 cDNA spans 2925 nt, including a 5'-untranslated region of 331 nt, an open reading frame of 2295 nt from nt 332 to nt 2626, and a 3'-untranslated region of 299 nt. The sequence surrounding the proposed initiator ATG conforms to the Kozak consensus [25]. The deduced amino acid sequence of NL1 reveals a putative type II transmembrane protein of 765 amino acid residues encompassing a short N-terminal cytoplasmic tail, a unique putative transmembrane domain, and a large C-terminal extracellular domain. The ectodomain contains nine potential N-glycosylation sites (Asn-X-Ser/Thr) and ten cysteine residues corresponding to those conserved among all the members of the family, which are presumably involved in proper folding and in maintenance of the protein in an active conformation. All amino acid residues known to be part of the active site of NEP are present in NL1 (see Fig. 3). The predicted protein presents greater similarities to NEP than to any other member of the family (Table 1).

Although NL1 shares numerous features with proteins of the neprilysin family, a notable aspect distinguishes it from the others : the first conserved cysteine residue of the ectodomain is more distant (34 amino acid residues) from the predicted transmembrane domain in NL1 than it is in NEP (9 residues) or any other members of the family. Moreover, we noticed a putative furin cleavage site (-Arg₅₈-Thr-Val-Val-Lys-Arg₆₃-) between the end of the transmembrane domain and the first cysteine (Fig. 2). This observation suggests that NL1 could exist as a secreted rather than a membrane-bound protein.

NL1 expression in HEK 293 cells

HEK 293 cells were transfected with pCDNA3/RSV expression vector containing NL1 cDNA, and a permanent cell line was established as described under *Materials and Methods* (HEK/NL1 cells) . Immunoblotting with a polyclonal antibody showed that after 16h of culture, most NL1 was present in the culture medium with small amounts of the enzyme in the cell extract (Fig.4). Secreted and cell-associated NL1 had apparent molecular masses of approximately 125 and 110 kDa, respectively. To characterize the glycosylation state of NL1, we next submitted the recombinant protein to deglycosylation by peptide : N-glycosidase F (PNGase F) and endoglycosidase H (endo H). PNGase F removes high mannose as well as most complex N-linked oligosaccharides added in the Golgi complex. In contrast, endo H removes N-linked oligosaccharide side chains of the high mannose type found on proteins in the RER but which have not yet transited through the Golgi complex; thus, resistance to endo H can be used as an indication that the protein has traveled through the Golgi complex. PNGase F treatment showed that the cell-associated and secreted NL1 were N-glycosylated as their electrophoretic mobility increased following digestion (Fig. 4). However, the secreted NL1 migrated as a doublet after PNGase F treatment, with one band co-migrating with cell-associated form and the second having a slower rate of migration. Since untreated and endo H-digested secreted NL1 are seen as single bands by SDS-PAGE, our observation suggests that a proportion of secreted NL1 undergoes further post-RER postranslational modification that renders some of the

N-linked oligosaccharides resistant to PNGase F digestion.

In contrast to secreted NL1, NL1 from cell extract was sensitive to endo H treatment. This result shows differences in the glycosylation state of the two species and suggests that the cell-associated form observed in transfected cells is an intracellular species that has not traveled through the Golgi complex.

Processing of NL1 by a subtilisin-like convertase

To determine whether a member of the mammalian subtilisine-like convertase family is responsible for NL1 presence in the culture medium of transfected cells, we co-transfected transiently HEK 293 cells with a constant amount of plasmid pCDNA3/RSV/NL1 and increasing amounts of plasmid pCDNA3/CMV/PDX [26]. This latter vector promotes the expression of the α 1-antitrypsin Portland variant, α 1-PDX, a known inhibitor of subtilisin-like convertases [27]. Immunoblot analysis of the culture media of cells expressing both NL1 and α 1-PDX indicated that NL1 secretion was strongly inhibited by the presence of α 1-PDX (Fig. 5A): a relation was observed between the amounts of α 1-PDX and the level of inhibition of NL1 secretion.

To confirm that proteolysis by the subtilisin-like convertase occurred at the putative furin cleavage site identified in NL1 ectodomain (-Arg₅₈-Thr-Val-Val-Lys-Arg₆₃-), the amino acid residues Asn₆₂-Gly₆₃ were substituted for Lys₆₂-Arg₆₃ by site-directed mutagenesis in vector pCDNA3/RSV/NL1 and the mutated vector used to establish HEK 293 cells expressing the mutant protein (HEK/NL1mut cells). Immunoblot analysis of the culture media of HEK/NL1mut cells showed that the mutation totally abolished secretion of NL1 (Fig. 5B). Furthermore, an additional form of NL1 with a molecular mass of 127 kDa was detected in the extract of these cells (Fig. 5B). This new species was resistant to endo H digestion (Fig. 5B) and was found associated with membranes when HEK/NL1mut cells were fractionated according to Chidiac *et al.* [28] (result not shown).

NL1 enzymatic activity

Culture media from HEK 293 and HEK/NL1 cells were tested for enzymatic activity using as substrate (Tyrosyl-[3,5-³H])(D-Ala₂)-Leu₅-enkephalin, a known NEP substrate. Activity was detected in the culture medium of HEK/NL1 cells but not in that of HEK 293 cells. This activity increased linearly with the amounts of NL1 (Fig. 6A) and with the incubation period (Fig. 6B), indicating that degradation of the substrate was due to NL1 enzymatic activity.

We next characterized NL1 enzymatic parameters using the same substrate and compared them to those of an engineered soluble form of NEP (sNEP) [29]. NL1 affinity for D-Ala₂-Leu₅-enkephalin was slightly higher than that of sNEP as shown by their K_m values of 18 μ M and 73 μ M, respectively (Table 2). Inhibition assays showed that phosphoramidon had similar effects on NL1 and sNEP activity, with IC₅₀ values of 0.9 nM and 0.5 nM respectively, and that thiorphan, a specific inhibitor of NEP, inhibited NL1 with an IC₅₀ of 47 nM, as compared with an IC₅₀ of 8 nM for NEP (Table 2).

Very low levels of phosphoramidon-sensitive activity was detected in extracts of HEK/NL1 cells (data not shown) consistent with the small amounts of NL1 observed by immunoblotting.

To determine whether NL1 had cleavage site specificity similar to NEP, we incubated Leu₅-enkephalin in the presence of NL1 recovered from the medium of HEK/NL1 cells (Fig. 7B) or in the presence of sNEP (Fig. 7C), and analyzed the degradation products by RP-HPLC. Peaks co-migrating with standard Tyr-Gly-Gly and Phe-Leu peptides were observed in both RP-HPLC profiles, indicating that both enzymes cleaved the substrate at the Gly₃-Phe₄ peptide bond. This enkephalin-degrading activity was completely inhibited by phosphoramidon (1 μ M) (Fig. 7A).

Tissue and cellular distribution of NL1 mRNA

Tissue distribution of NL1 mRNA was determined by Northern blot analysis with a specific probe corresponding to the 5' end of the coding region of NL1 cDNA. A single transcript of 3.4 kb was detected exclusively in testis among all the mouse tissues tested (Fig. 8A). Mouse tissues were also screened by RT-PCR. Using this

more sensitive technique, expression of NL1 was observed in several other tissues including heart, brain, spleen, lungs, liver and kidney (Fig. 8B). Consistent with the Northern blot results, RT-PCR analysis, although not strictly quantitative, detected more NL1 mRNA in testis than in other tissues.

To gain more insight into NL1 mRNA distribution, we examined by ISH cryostat sagittal sections from a 4-day newborn mouse, as well as sections from a 16-day old animal (p16) and adult tissues (heart, brain, spleen, lungs, liver, kidney and testis). The presence of NL1 mRNA was detected only in adult testis (Fig. 9). Only the germinal cells in the luminal face of the seminiferous tubules were labeled (Fig. 9A and B). These cells were identified as round and elongated spermatids in all spermiogenesis maturational stages (Fig. 9B1, B2, B3 and B4). Neither spermatozoa (Fig. 9B and B5) nor spermatocytes, spermatogonies or Sertoli cells were labeled (Fig. 9B). Interstitial cells were also negative. Controls were performed with sense riboprobes, which produced only nonspecific background (data not shown). The 4-day old mouse sagittal sections and all other tissues tested were negative.

DISCUSSION

The great interest in members of the Neprilysin family as putative therapeutic targets, and the recent discovery of new members of this important family of peptidases led us to investigate whether additional members of the family remained to be identified. Using a PCR-based strategy, we cloned, from mouse testis, a partial cDNA encoding a new NEP-like enzyme that we called NL1. Analysis of the amino acid sequence encoded by the full-length NL1 cDNA revealed that this member of the family resembles NEP the most: 55% identity and 74% similarity. Recently, the primary structure of a new zinc metallopeptidase from total mouse embryo was reported [30]. This enzyme, called SEP, is found either as a soluble or a cell-associated form due to alternative splicing. NL1 shows only 3 amino acid differences with the soluble form of SEP indicating that secreted SEP and NL1 are the same enzyme. Our cloning strategy did not allow characterization of the cell-associated form of NL1 which is a minor species in mouse testis [30].

The amino acid sequence of NL1 predicts a topology of a type II integral membrane glycoprotein that is similar to the other members of the family. Treatment of the recombinant protein with PNGase F showed that indeed NL1 possesses N-linked carbohydrate side chains. However, it is not possible to determine precisely whether all nine putative N-glycosylation sites are used, but the 30 kDa decrease in molecular mass upon PNGase F treatment suggests that most are glycosylated. It has already been shown that all asparagine residues in a Asn-X-Ser/Thr consensus are glycosylated in rabbit NEP expressed in COS-1 cells and that sugar moieties increase the stability and enzymatic activity of the protein and facilitate its intracellular transport [31]. Three of NEP glycosylated Asn residues (Asn 145, Asn 285 and Asn 628) are conserved in NL1 (Asn 163, Asn 303 and Asn 643). Amongst these residues, Asn 145 and Asn 628 have been reported to influence NEP enzymatic activity [31]. In the same work, it has also been shown that the effect of sugar addition on folding and intracellular transport of NEP is a cumulative effect of all glycosylation sites rather than a contribution of any particular one. Glycosylation of NL1 may share similarities with that of NEP since we found their primary structures and enzymatic

activities to be very similar.

Surprisingly, expression of the cDNA by transfection of HEK 293 cells showed that most of the enzyme was secreted in the culture medium. The small amount of NL1 associated with the cells was endo H-sensitive, suggesting that the cell-associated enzyme is a species that has not yet left the RER. The presence of a furin cleavage site in NL1 sequence between the predicted transmembrane domain and the first conserved cysteine residue of the ectodomain led us to believe that a member of the mammalian subtilisin-like family of convertases was responsible for the presence of NL1 in the culture medium. These enzymes are involved in processing a variety of precursor proteins such as growth factors and hormones, receptors, plasma proteins, matrix metalloproteinases, metalloproteases-desintegrins and viral envelope glycoproteins [for a review see: 32]. Site-directed mutagenesis of the furin cleavage site (-Arg₅₈-Thr-Val-Val-Lys-Arg₆₃-) and expression of α 1-PDX, a potent inhibitor of mammalian subtilisin-like convertases [27], confirmed that a member of this family of endoproteases was involved in NL1 secretion presumably by cleaving in carboxy-terminus of Arg₆₃. There are only a few examples of proteins which are processed from a membrane-bound precursor to a secreted form following cleavage by subtilisin-like convertases; these include meprin and collagen XVII [33,34]. Three members of the subtilisin-like family of convertases, namely furin, PC4 and PC7, are known to be expressed in germ cells [35-38]. Whether one of these convertases generates secreted NL1 from its membrane form is under current investigation. In any case, NL1 is the only known member of the neprilysin family that is secreted. This unique feature suggests that NL1 plays its physiological role in a context different from that of the membrane-bound peptidases, thereby diversifying the role of the peptidases of the neprilysin family. It is of interest that circulating forms of NEP in blood and urine have been described, but they have generally been related to pathological or stressful conditions [39-43].

We have observed in cells expressing NL1 mutated at the furin cleavage site the appearance of a species resistant to digestion by endo H. This mutated protein was associated with cellular membranes. Taken together, these results indicate that NL1 is first synthesized and inserted in the RER membrane as a type II transmembrane

protein. During intracellular transport, NL1 is converted to a soluble form by the action of a member of the mammalian subtilisin-like convertases. The identity of the cellular compartment where this process occurs is not known. However, mammalian subtilisin-like convertases are usually active in post-Golgi compartments of the secretory pathway suggesting that processing of NL1 from the membrane bound form to the soluble form is a post-Golgi event.

Despite almost total abrogation of NL1 secretion, we observed only a slight accumulation of endo H-resistant NL1 in cells either co-expressing $\alpha 1$ -PDX and NL1 (result not shown) or expressing mutated NL1. This observation suggests that unprocessed NL1 is rapidly degraded. A similar behavior was reported for the Notch1 receptor expressed in the furin-deficient cell line LoVo [44]. The mechanism(s) by which these unprocessed proteins are degraded is still unknown. It is interesting to point out that the spliceoform of SEP that has lost a 23 amino acid peptide, including the furin cleavage site, generates a cell-associated endo H-sensitive molecule [30].

The most important observation regarding the NL1 primary structure is the conservation of residues which in NEP are essential for catalysis and binding of substrates or inhibitors. This finding suggests that NL1 could effectively act as an endopeptidase with a catalytic mechanism similar to that of NEP. This hypothesis was supported by the demonstration that D-Ala₂-Leu₅-enkephalin, a peptide substrate often used to monitor NEP activity, was also an excellent NL1 substrate. The affinity of NL1 for D-Ala₂-Leu₅-enkephalin was even higher than that of NEP, as reflected by a K_m value 4- to 5-fold lower. Furthermore, two well known NEP inhibitors, phosphoramidon and thiorphan, also abolished NL1 activity. Phosphoramidon, which inhibits NEP as well as ECE-1 activity, albeit to a lesser extent [45], had very similar effects on NL1 and NEP, with an IC_{50} value for NL1 varying not more than two-fold from the value determined for NEP. Thiorphan, considered to be a more specific inhibitor of NEP, also inhibited NL1 activity, with an IC_{50} six-fold greater than that for NEP. These results suggest that the active sites of NL1 and NEP are similar. This hypothesis is supported by the observation that secreted SEP degraded a set of peptides known to be NEP substrates, including substance P, bradykinin and atrial natriuretic peptide [30]. Taken together, these results illustrate the importance of

identifying and characterizing other member of the family for the design of highly specific inhibitors.

In agreement with the enzymatic parameters demonstrating that NL1 and NEP have similar catalytic sites, we have observed that both enzymes cleaved Leu₅-enkephalin at the same peptide bond. This result suggests that NL1 hydrolyzes peptide bonds on the amino side of hydrophobic amino acid residues as does NEP [46]. However, several other peptides will have to be tested to confirm this specificity and to determine whether NL1 has dipeptidyl carboxypeptidase activity as was shown for NEP [47-49] and more recently for ECE-1 [50].

RT-PCR experiments with specific primers for the soluble and cell-associated forms of SEP showed a wide tissue distribution of the enzyme with the soluble form of SEP being predominant in testis and the cell-associated form in other tissues [30]. Our RT-PCR results confirmed the wide tissue distribution of NL1. However, Northern blotting and *in situ* hybridization experiments indicated that expression of NL1 is predominant in germ cells of mature testis. Interestingly, proenkephalin mRNA has been shown to be expressed in germ cells and somatic cells of the testis [36,37,51-54]. Specific functions for testicular enkephalin peptides have not yet been defined, but it is believed that they could act as intratesticular paracrine/autocrine factors. In addition to their putative role as mediators of testicular cell communication, it has also been demonstrated that proenkephalin products synthesized by spermatogenic cells during spermatogenesis are stored in the acrosome of human, hamster, rat and sheep spermatozoa and are released from sperm following acrosomal reaction [55]. It has thus been proposed that proenkephalin products may act as sperm acrosomal factors during the fertilization process as well as intratesticular regulators secreted by spermatogenic cells. Since Leu₅-enkephalin was found to be a good substrate for NL1, opioid peptides originating from proenkephalin could serve as physiological substrate for this new enzyme. In this way, NL1 would serve to regulate the activity of these bioactive peptides.

Testis is the only tissue where the soluble form of SEP is predominant [30], suggesting a testis-specific alternative splicing. Expression of testis-specific molecular species of peptidases or prohormones, arising through diverse mechanisms,

has been documented in the past [56,57]. However, the physiological significance of these testis-specific species is not always clear. In the case of NL1 or SEP, it might allow local constitutive secretion by germinal cells of an otherwise cell-associated enzyme, to regulate spermatogenesis much like several other proteolytic enzymes of the seminiferous tubules [58]. Alternatively, it might allow accumulation in acrosome with proenkephalin peptides and release upon acrosomal reaction. More exhaustive studies concerning NL1 localization and physiological substrate identification will be needed to understand its role in the testis and possibly in the fertilization process.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants from Fonds pour Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and Medical Research Council of Canada (MRC) to P.C., L.D. and G.B., and from MRC to M.M. A.F.R. is supported by the Canadian International Development Agency (CIDA) and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. M.C. is supported by a studentship from National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We are grateful to Dr. Harriet S. Tenenhouse for reading the manuscript.

REFERENCES

1. Seidah, N.G. and Chrétien, M. (1995) *Methods Enzymol.* **244**, 175-188.
2. Corvol, P. and Williams, T.A. (1997) in *Cell-surface peptidases in health and disease* (Kenny, A.J. and Boustead, C.M., eds) pp. 99-117, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK
3. Turner, A.J. (1997) in *Cell-surface peptidases in health and disease* (Kenny, A.J. and Boustead, C.M., eds) pp. 137-153, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK
4. Kenny, J. (1993) *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 663-668
5. Koehne, P., Schaper, C., Graf, K., and Kunkel, G. (1998) *Allergy* **53**, 1023-1042
6. Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C., Soroca, E., Lecomte, J.M., Malfroy, B., Llorens, C., and Schwartz, J.C. (1980) *Nature* **288**, 286-288
7. Roques, B.P., Noble, F., Dauge, V., Fournie-Zaluski, M.C., and Beaumont, A. (1993) *Pharmacol. Rev.* **45**, 87-146
8. Ura, N., Carretero, O.A., and Erdos, E.G. (1987) *Kidney Int.* **32**, 507-513
9. Pham, I., el Amrani, A.I., Fournie-Zaluski, M.C., Corvol, P., Roques, B., and Michel, J.B. (1992) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20**, 847-857
10. Yamaguchi, T., Fukase, M., Arao, M., Sugimoto, T., and Chihara, K. (1992) *FEBS Lett.* **309**, 303-306
11. Tenenhouse, H.S., (1999) *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 333-341
12. Marsh, W.L. (1992) *Transfusion* **32**, 98-101

13. Valdenaire, O., Richards, J.G., Faull, R.M., and Schweizer, A. (1999) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **64**, 211-221
14. Hooper, N.M. (1994) *FEBS Lett.* **354**, 1-6
15. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., and Smith, J.A. (1988) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York
16. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
17. Le Moual, H., Dion, N., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1994) *Eur. J. Biochem.* **221**, 475-480
18. Jockers, R., Da Silva, A., Strosberg, A.D., Bouvier, M., and Marullo, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9355-9362
19. Chen, C. and Okayama, H. (1987) *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745-2752
20. Lanctôt, C., Fournier, H., Howell, S., Boileau, G., and Crine, P. (1995) *Biochem. J.* **305**, 165-171
21. Dion, N., Le Moual, H., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1995) *Biochem. J.* **311**, 623-627
22. Devault, A., Nault, C., Zollinger, M., Fournie-Zaluski, M.C., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4033-4040
23. Bawab, W., Aloyz, R.S., Crine, P., Roques, B.P., DesGroseillers, L. (1993) *Biochem. J.* **296**, 459-465
24. Ruchon, A.F., Marcinkiewicz, M., Siegfried, G., Tenenhouse, H.S., DesGroseillers, L., Crine, P., and Boileau, G. (1998) *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 459-468
25. Kozak, M. (1986) *Cell* **44**, 283-292

26. Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Munzer, J.S., Chrétien, M., Marcinkiewicz, M., and Seidah, N.G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26210-26218.
27. Anderson, A.D., Thomas, L., Hayflick, J.S., and Thomas, G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24887-24891
28. Chidiac, P., Nouet, S., and Bouvier, M. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 662-669
29. Lemay, G., Waksman, G., Roques, B.P., Crine, P., and Boileau, G. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 15620-15623
30. Ikeda, K., Emoto, N., Raharjo, S.B., Nurhantari, Y., Saiki, K., Yokoyama, M., Matsuo, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32469-32477
31. Lafrance, M.H., Vezina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P., and Lemay, G. (1994) *Biochem. J.* **302**, 451-454.
32. Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.* **327**, 625-635
33. Milhiet, P.E., Chevallier, S., Corbeil, D., Seidah, N.G., Crine, P., and Boileau, G. (1995) *Biochem. J.* **309**, 683-688
34. Schacke, H., Schumann, H., Hammami-Hauasli, N., Raghunath, M., and Bruckner-Tuderman, L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25937-25943
35. Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T., and Murakami, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 5897-5900
36. Torii, S., Yamagishi, T., Murakami, K., and Nakayama, K. (1993) *FEBS Lett.* **316**, 12-16
37. Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., and Chretien, M. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1559-1570
38. Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tadros, H.,

Mbikai, M., Chrétien, M., and Day, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3388-3393

39. Almenoff, J., Teirstein, A.S., Thornton, J.C., and Orlowski, M. (1984) *J. Lab. Clin. Med.* **103**, 420-431

40. Deschodt-Lanckman, M., Michaux, F., de Prez, E., Abramowicz, D., Vanherweghem, J.L., and Goldman, M. (1989) *Life Sci.* **45**, 133-141

41. Johnson, A.R., Coalson, J.J., Ashton, J., Larumbide, M., and Erdos, E.G. (1985) *Am. Rev. Respir. Dis.* **132**, 1262-1267

42. Soleilhac, J.M., Lafuma, C., Porcher, J.M., Auburtin, G., and Roques, B.P. (1996) *Eur. J. Clin. Invest.* **26**, 1011-1017

43. Aviv, R., Gurbanov, K., Hoffman, A., Blumberg, S., and Winaver, J. (1995) *Kidney Int.* **47**, 855-860

44. Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., and Israël, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8108-8112.

45. Turner, A.J., and Murphy, L. (1996) *Biochem. Pharmacol.* **51**, 91-102

46. Turner, A.J., Matsas, R., and Kenny, A.J. (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**, 1347-1356

47. Malfroy, B., and Schwartz, J.C. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **106**, 276-285

48. Bateman, R.C., Jackson D., Slaughter, C.A., Unnithan, S., Chai, Y.G., Moomaw, C., and Hersh, L.B. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 6151-6157

49. Beaumont, A., Le Moual, H., Boileau, G., Crine, P., and Roques, B.P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 214-220

50. Johnson, G.D., Stevenson, T., and Ahn, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**,

4053-4058

51. Kew, D., Jin, D.F., Kim, F., Laddis, T., and Kilpatrick, D.L. (1989) *Mol. Endocrinol* **3**, 1191-1196

52. Mehta, N.D., Don, J., Zinn, S.A., Millette, C., Wolgemuth, D.J., and Kilpatrick, D.L. (1994) *Endocrinology* **135**, 1543-1550

53. Kilpatrick, D.L., Borland, K., and Jin, D.F. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5695-5699

54. Kilpatrick, D.L. and Millette, C.F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5015-5018

55. Kew, D., Muffly, K.E., and Kilpatrick, D.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 9143-9147

56. Howard, T.E., Shai, S.Y., Langford, K.G., Martin, B.M., Bernstein, K.E. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4294-4302

57. Jeannotte, L., Burbach, J.P., Drouin, J. (1987) *Mol. Endocrinol.* **1**, 749-757

58. Monsees, T.K., Gornig, M., Schill, W.B., and Miska, W. (1998) *Andrologia* **30**, 185-191

Table 1. Comparison of NL1 with other members of the neprilysin family
 Region covering amino acids 70 to 765 of NL1 was compared with corresponding sequences of other members of the neprilysin family. **m**, mouse ; **r**, rat ; **h**, human ; **b**, bovine proteins.

| Protein | Identity (%) | Similarity (%) |
|---------|-----------------|-------------------|
| mNEP | 55 | 74 |
| rNEP | 54 | 73 |
| hNEP | 55 | 74 |
| rECE-1 | 39 | 60 |
| hECE-1 | 39 | 60 |
| bECE-2 | 38 | 57 |
| mPHEX | 39 | 58 |
| hPHEX | 39 | 58 |
| hKELL | 26 | 46 |
| hXCE | 36 | 56 |

Table 2. Comparison of NL1 and sNEP enzymatic parameters with D-Ala₂-Leu₅-enkephalin.

Each value is the average of the results of three (*) or four (◆) independent experiments. See Materials and Methods for details.

| Enzyme | K_m^* (μM) | $\text{IC}_{50}^\blacklozenge$ Phosphoramidon (nM) | IC_{50}^* Thiorphan (nM) |
|--------|------------------------------|--|---|
| NL1 | 18 ± 10 | 0.9 ± 0.3 | 47 ± 12 |
| sNEP | 73 ± 18 | 0.5 ± 0.1 | 8 ± 2 |

```

      450                                542
hNEP
...FIQTLD.DLTWMDAETKKRAEEKALAI.....NAFYSSGRNQ

hECE-1
...FEESLS.TLKWMDEETRKSAKEKADAI.....NAYYSPTKNE

hPHEX
...FIDMLEKENEWMDAGTKRKAKEKARAV.....NAFYASTNQ

consensus
  F  L      WMD  T  A  EKA  A      NA  YS  N
                ───────────▶
                3817

                                636
hNEP
IVFPAGILQPPFFSAQQ.S.....QHLNGINTLGENIADNGGLGQAY...

hECE-1
IVFPAGILQAPFYTRSS.P.....EPVNGRHTLGENIADNGGLKAAAY...

hPHEX
IRFPAGELQKPFFWGTEYP.....LNVKGKRTLGENIADNGGLREAF...

cons.
I  FPAG  LQ  PF                                G  TLGENIADNGGL  A
──────────▶                                  ◀──────────
3719                                          3720

```

Figure 1. Partial amino acid sequence alignment of human NEP, ECE-1 and PHEX. Numbers above the sequences identify residues in NEP sequence. Regions corresponding to degenerate oligonucleotides used for the nested PCR are underlined. Arrows below the sequences represent the degenerate oligonucleotides and the numbers correspond to the nomenclature used in the text.

Figure 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of NL1 cDNA cloned from mouse testis. The predicted transmembrane domain of NL1 is underlined and the putative furin/pro-hormone cleavage site is double underlined. The conserved cystein residues are indicated by an arrowhead, the nine potential N-glycosylation sites are indicated with a dot (•) and the HEXXH zincin consensus is boxed. Arrows and numbers in brackets show the position of the oligonucleotide primers used in PCR.

Figure 3. Amino acid sequence comparison of NL1 and NEP. Single dots stand for similarity and double dots for identity. Residues known to be important for enzyme activity, including the three zinc ligands (His 583, His 587, and Glu 646 in NEP), the catalytic Glu residue (Glu 584 in NEP), the transition state stabilizing His residue (His 711 in NEP), the residues involved in substrate binding (Arg 102, Arg 717 and Asn 542 in NEP) and the Asp residue implicated in structure maintenance of the active site (Asp 650 in NEP) are indicated with asteriks (*).

1
 NL1 MVERAGWCRKKS PGFVEYGLMVLLLLLLGAI VTLGVFYSIGKQLPLLTSLLFHFSWDERTVVKRALRDS SLKSDI
 NEP MGRSESQMDITDINAPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLXTII IAVTMIALYATYDDGI

75 *
 NL1 CTPSCVIAAARILENMDQSRNPCENFYQYACGGWLRHHVIPETNSRYSVFDILRDELEVILKGVLEDSTSQHR
 NEP CKSSDCIKSAARLIQNMDASVEPCTDFFKYACGGWLRKRVIPETSSRYSNFDILRDELEVILKDVLOPEKTEDI

149
 NL1 PAVEKAKTLYRSCMNQSVIEKRDSEPLLSVLKMGVGGWPVAMDKNWNETMGLKWELERQLAVLNSQFNRRVLIDLF
 NEP VAVQKAKTLYRSCINESAIDSRGGQPLLKLLPDIYGWVPASDNWDQTYGTSWTAEKSIAQLNSKYGKVLINFF

223
 NL1 IWNDQNSSRHVIYIDQPTLGMPSREYYFQEDNNHKVRKAYLEFMTSVATMLRKDQNSKESAMVREEMAEVLE
 NEP VGTDDKNSTQHI IHFDQPRGLPSRGGYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEQSLPIDENQLSLEMNKVME

297
 NL1 LETHLANATVPQEKRHDTVLYHRMDLMEIQERFGL----KGFNWTLFIQNVLSSEVELEFPDEEVVYVYIPYL
 NEP LEKEIANATTKPEDRNDPMLLYNKMTLAKLQNNFSLEVNGKSFWSNFTNEIMSTVNNINI QNEEEVVVYAPEYL

367
 NL1 ENLEDIIDSYSARTMQNYLVWRLVLDRI GLSLQRFKEARVDYRKALYGTTVVEEVRWRECVSYVNSNMESAVGSL
 NEP TKLKPILTKYSPRDLQNLMSWR FIMDLVSSLSRNYKESRNAFRKALYGT TSETATWRRCANVNGN MENAVGRL

441
 NL1 YIKRAF SKDSKSTVRELI EKIRSVFVDNLDELNWMDEESKKAQEKAMNIREQIGYDPYILEDNNKHLDEEYSS
 NEP YVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDL TWMDAETKKKAEEKALAIKERIGYPDDI ISNENK-LNNEYLE

515 *
 NL1 LTFYEDLYFENGLQNLKNNAQRS LKKLREKVDQNLWII GAAVVNAFYSPNRNQIVFPAGILQPPFFSKDQPQSL
 NEP LNYREDEYFENIQNLKFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNL

589 ** *
 NL1 NFGGIGMVGHEITHGFDDNGRNFDKNGNMLDWSNFSARHFQQSQCMYQYGNFSWELADNQNVNGFSTLGE
 NEP NYGGIGMVGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSANNFKDQSQCMVYQYGNFSWDLAGGQHLNGINTLGE

663 * *
 NL1 NIADNGGVRQAYKAYLRWLADGGKDQRL PGLNLTYAQLFFINYAQVWCGSYRPEFAVQSIKTDVHSPKRYRVLG
 NEP NIADNGGIGQAYRAYQNYVKNNGEEKLLPGLDLNHNKQLFFLNFAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIG

737 765
 NL1 SLQNLPGFSEAFHCPRGSPMHPMKRCRIW
 NEP TLQNSAEFADAFHCRKNS YMNPERKCRVW

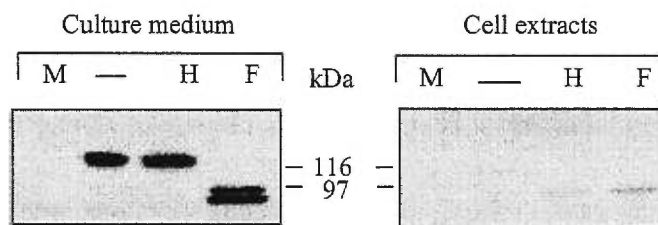


Figure 4. Immunoblot analysis of NL1-transfected HEK 293 cells. Proteins from culture medium and from cell extracts (corresponding to 1/50 of a 150 mm dish) were separated by SDS-PAGE (8% gels), transferred to nitrocellulose membranes and revealed with a NL1-specific polyclonal antibody. (M): mock-transfected cells; (-): NL1-transfected cells; (H): Endo H-treated NL1-transfected cells; (F): PNGase F-treated NL1-transfected cells. Molecular weight markers positions are shown in the center.

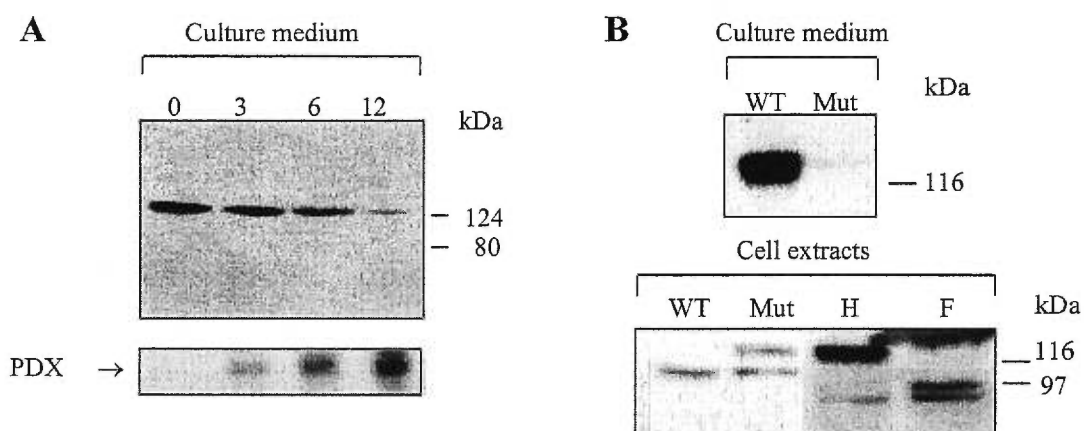


Figure 5. Analysis of NL1 processing in HEK 293 cells. (A) Proteins from culture medium of HEK 293 cells co-expressing NL1 and α 1-PDX were separated as in legend of Fig. 4 and revealed with either NL1 antibodies (upper panel) or α 1-antitrypsin inhibitor antibodies (lower panel). The amount in μ g of plasmid pCDNA3.1/CMV/PDX used in the transfections is indicated above each lane. (B) Proteins from the culture media or extracts of cells expressing either wild-type NL1 (WT) or NL1 mutated in the furin cleavage site (Mut) (corresponding to 1/20 of a 150 mm dish) were analyzed as in Fig. 4. (H): Mut proteins treated with endo H; (F): Mut proteins treated with PNGase F. Lanes H and F were exposed 3 times longer. Molecular weight markers positions are shown on the right (B).

Figure 6. NL1 enzymatic activity. (A) Activity as a function of protein amounts. Increasing volumes of culture media from HEK 293 or HEK/NL1 cells were tested for peptidase activity using (Tyrosyl-[3,5-³H])(D-Ala₂)-Leu₅-enkephalin as substrate. The amounts of NL1 detected by immunoblotting in the aliquots used to measure activity is shown above the graph. (B) Activity as a function of time. Aliquots of culture media from HEK 293 or HEK/NL1 cells containing 2.5 μg of total protein were incubated for the indicated periods of time with the same substrate as in (A).

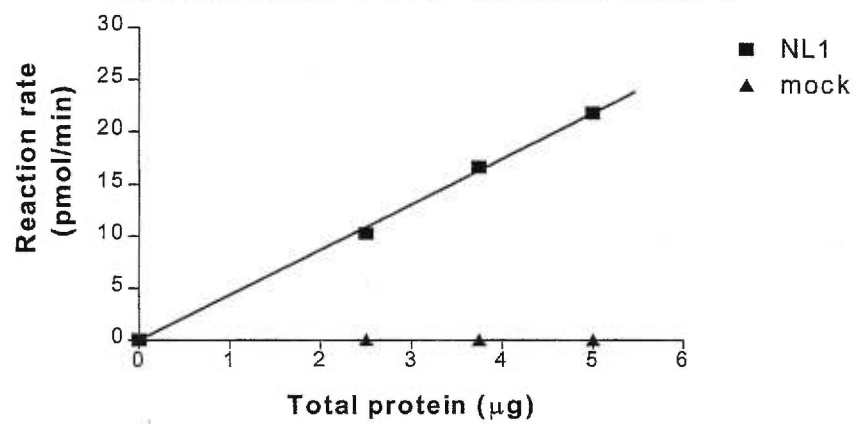
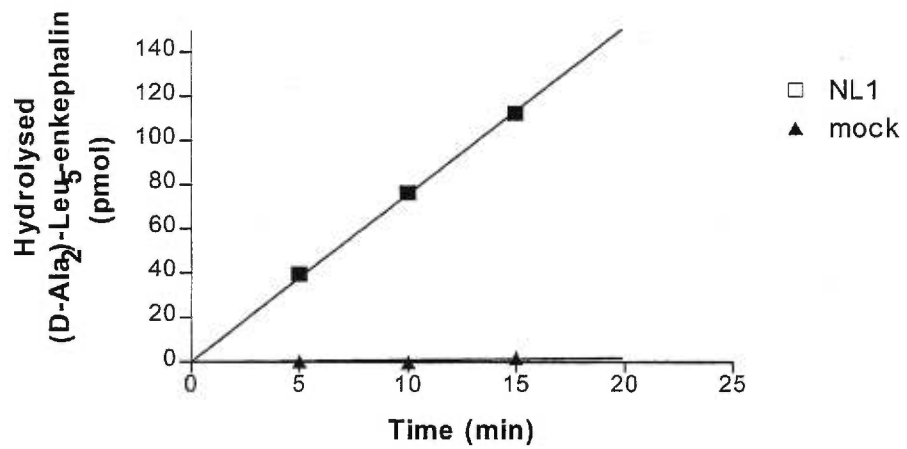
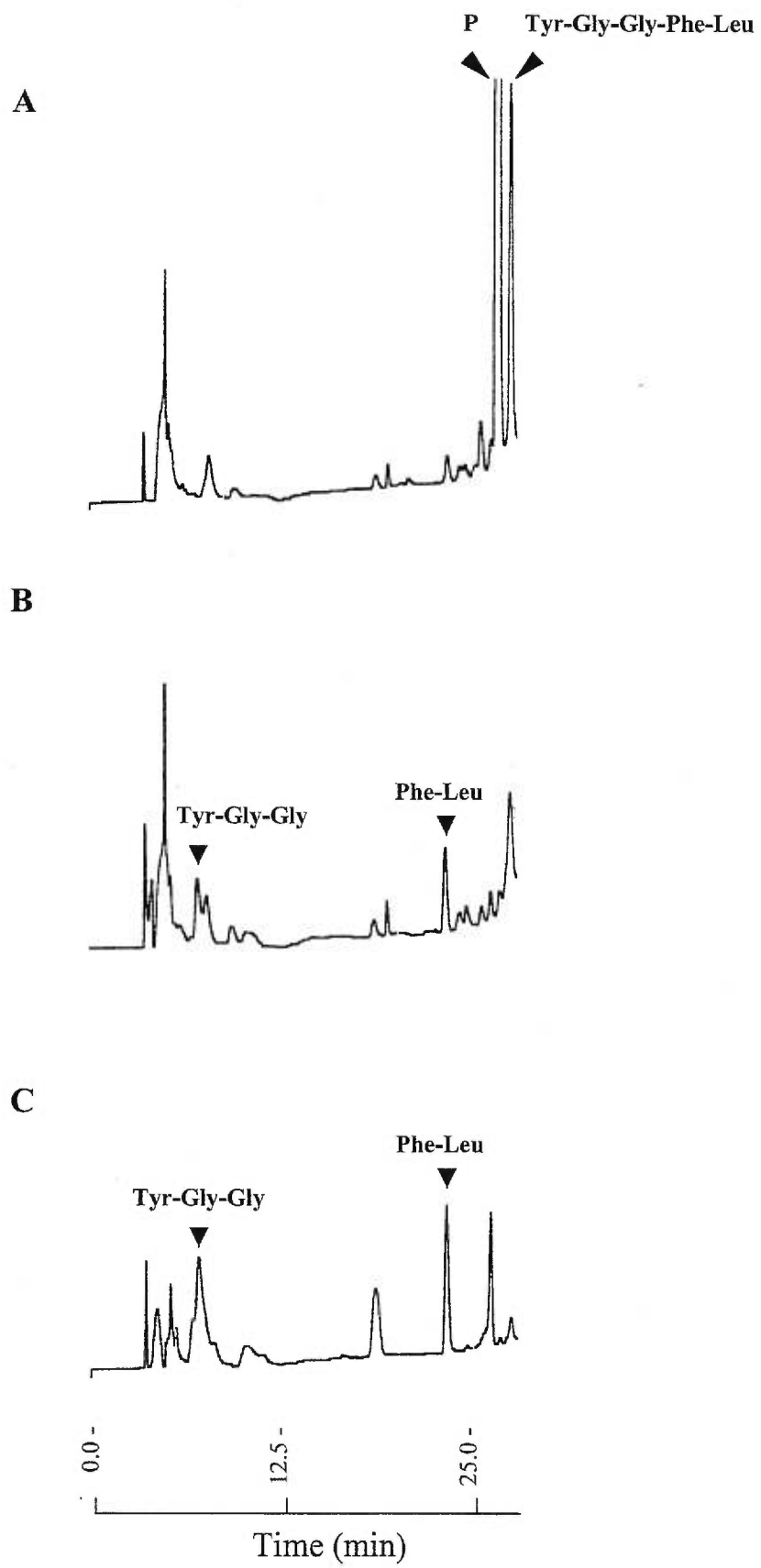
A**B**

Figure 7. HPLC analysis of degradation products of Leu₅-enkephalin.

Leu₅-enkephalin was incubated with concentrated culture media from HEK/NL1 cells in presence (*A*) or absence (*B*) of phosphoramidon (**P**), or with concentrated media from sNEP-transfected LLC-PK₁ cells (*C*) and hydrolysis products were resolved by HPLC. Tyr-Gly-Gly and Phe-Leu were both identified with HPLC profiles of synthetic marker peptides.



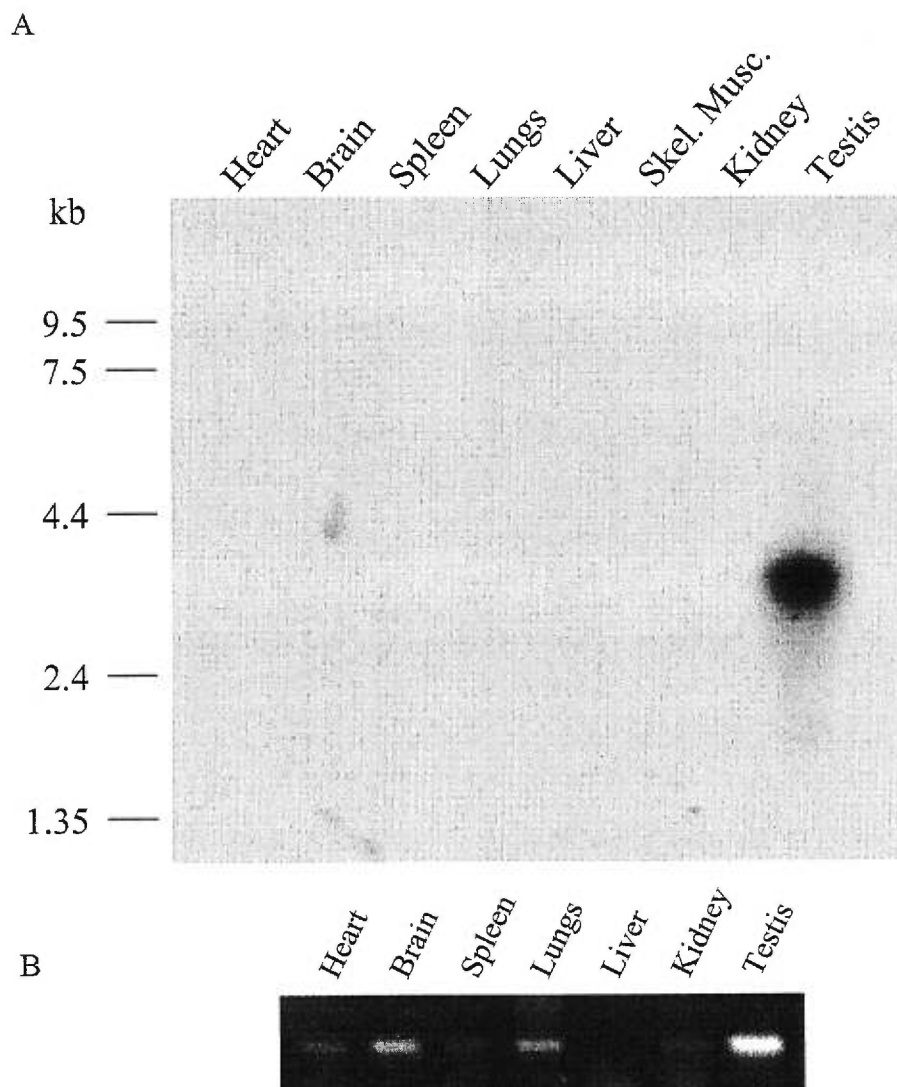


Figure 8. Tissue distribution of mouse NL1 mRNA by Northern blot and RT-PCR analysis. (A) The membrane purchased from Clontech containing 2 μ g of polyA⁺ mRNA of various tissues was hybridized with a 1 kb specific cDNA probe corresponding to the 5' coding region of NL1. The blot was exposed for autoradiography for 7 days. (B) Total RNA (1 μ g) was used for the RT-PCR reactions. Amplified DNA fragments were resolved on a 4% agarose gel.

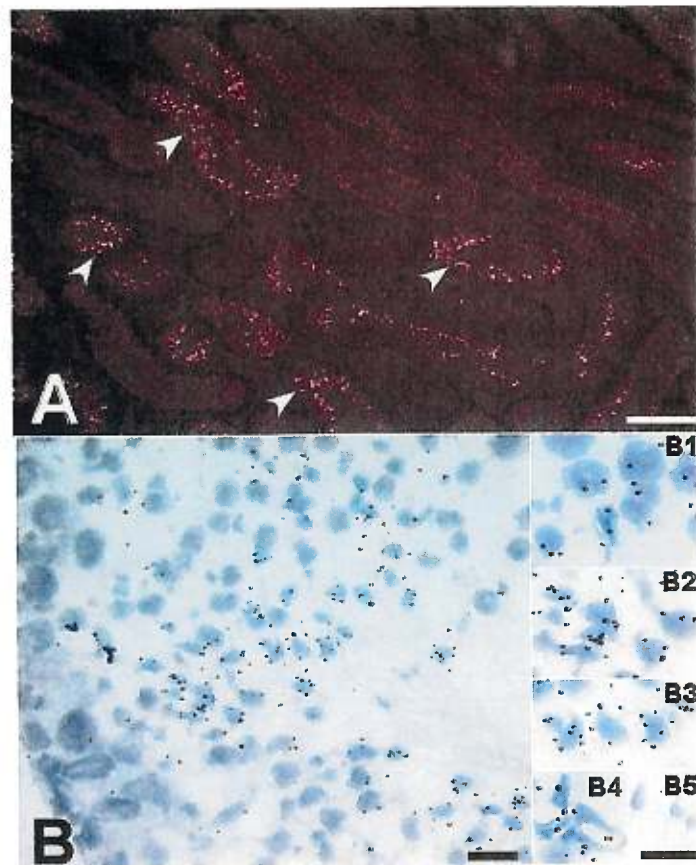


Figure 9. NL1 mRNA distribution in adult mouse testis observed by *in situ* hybridization. Silver labeling is seen as white spots on dark field (*A*) or as dark labeling on bright field (*B*). *A*, Low power emulsion autoradiography showing tubular distribution of NL1 mRNA. Some tubules present more evident labeling (arrows) indicating a stage specific tubular distribution. No labeling is seen in the interstitium. *B*, Sites of NL1 mRNA expression at cellular level showing labeling in inner germinal cells identified as round and elongated spermatids (Higher magnification in *B1*, *B2*, *B3* and *B4*). Note that large cells corresponding to spermatogonies, spermatocytes and Sertoli cells are unlabeled (*B*), as well as spermatozoa (*B* and *B5*).

Scale bar = 150 μ m (*A*), 15 μ m (*B*) and 10 μ m (*B1*, *B2*, *B3*, *B4* and *B5*, in *B5*).

CHAPITRE 6 - DISCUSSION

Ce dernier chapitre fera la synthèse de l'ensemble des résultats de cette thèse, présentée sous forme d'une discussion générale, et complétera la discussion présentée dans les chapitres 2, 3, 4 et 5.

6.1) PHEX

6.1.1) Sites d'expression physiologique

Afin de connaître les sites d'expression physiologiques de Phex, nous avons examiné son expression dans un nombre maximal d'organes en utilisant des coupes histologiques d'embryons de souris à partir du 10^{ième} jour (e10) jusqu'à la naissance (e19) et de souris postnatales (p3 et p7). Les résultats ont montré, au niveau anatomique, la présence des ARNm de Phex dans les os (calvaria, mandibule, vertèbres, côtes et fémur) des embryons, à partir de e15, ainsi que dans les dents (incisives et molaires). Les autres organes examinés, comme les reins, les poumons, le foie et le cerveau, ont tous été négatifs. Au niveau cellulaire, les ostéoblastes et les odontoblastes ont été identifiés comme les cellules responsables de cette expression.

La présence des ARNm de Phex chez la souris adulte a été démontrée par Northern blot au niveau de la calvaria et des dents incisives et molaires. Cette technique nous a permis de détecter un transcrite d'environ 7 kb dans ces tissus et de noter également un déclin de la quantité de ces transcrits au niveau des os et des molaires avec l'âge. Nous avons remarqué que l'expression des ARNm de Phex se maintenait élevée chez la souris adulte au niveau des dents incisives, qui chez les rongeurs sont toujours en croissance, suggérant fortement un lien entre l'expression de Phex et la croissance des os et des dents.

Nos études d'ontogenèse ont démontré que l'expression de Phex coïncidait avec et/ou suivait de peu la déposition de la matrice extracellulaire osseuse et dentaire. Ceci aussi bien dans l'ossification intramembranaire de la calvaria ou de la mandibule, que dans l'ossification endochondrale des vertèbres ou des os longs. Il est intéressant de souligner la corrélation très étroite entre le début du processus

d'ossification chez la souris, daté du jour 14,5 du développement embryonnaire, et l'expression de Phex, absente au jour e14 et détectée au moins à partir de e15.

Après avoir localisé les ARNm, nous avons regardé la présence de la protéine Phex dans divers tissus, par Western blot et par immunohistochimie, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un fragment de protéine, qui correspondait aux acides aminés 121 à 294 de la Phex humaine. L'immunobuvardage a démontré Phex comme une glycoprotéine d'environ 100 kDa dans les extraits de calvaria, de fémur et des dents incisives. Aucune immunoréactivité n'a été détectée dans les extraits de poumon, foie, rein, ovaire ou testicule. L'absence de détection de la protéine dans les extraits de poumon et d'ovaire s'oppose à des études qui ont documenté la présence des ARNm de Phex dans ces tissus (Beck *et al.*, 1997; Grieff *et al.*, 1997). Cependant, cette discordance peut être expliquée par les différences de sensibilité des techniques employées et/ou par des différences dans les niveaux de traduction des ARNm, spécifiques à chaque tissu. L'immunobuvardage a aussi confirmé la diminution de la quantité de Phex dans les os avec l'âge, en accord avec nos travaux d'hybridation *in situ*, qui ont démontré une corrélation temporelle entre l'expression de Phex et la croissance et/ou minéralisation osseuse.

L'immunohistochimie a révélé la présence de Phex dans les ostéoblastes, ostéocytes et odontoblastes, bien visible au niveau des prolongements cytoplasmiques de ces cellules qui parcourent la matrice extracellulaire, suggérant une corrélation intime entre la protéine Phex et la matrice. Également intéressant est l'absence de Phex au niveau des cellules moins différenciées de la lignée ostéoblastique, ce qui indique que Phex est un marqueur spécifique des cellules ostéoblastiques matures, capables de déposer la matrice extracellulaire et/ou la minéraliser. Cela explique la corrélation existante entre le début du processus d'ossification et l'expression de Phex, détectée à partir de e15 par nos études d'ontogenèse. La définition de Phex comme un marqueur spécifique des ostéoblastes et des ostéocytes s'avère de grande importance pour les études de différenciation de cette lignée cellulaire.

6.1.2) Phex et les souris Hyp

Les souris Hyp, qui présentent à peu près la même symptomatologie que les patients avec XLH, portent une délétion de 18 à 33 kb dans la région 3' du gène *Phex*, à partir de l'exon 16 (Beck *et al.*, 1997; Strom *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999), et sont très étudiées comme modèles animaux de la maladie humaine. La région délétée du gène *Phex* comporte tout le site actif de l'enzyme et suggère donc une perte d'activité de Phex comme mécanisme physiopathologique de la mutation spontanée Hyp. Cependant, pour la confirmation de ce mécanisme, il était important d'éliminer l'hypothèse de la production, par les souris Hyp, d'une protéine Phex tronquée, qui pourrait agir comme dominant négatif et avoir des répercussions au niveau du métabolisme des ostéoblastes et ostéocytes. Pour éclaircir ce point, nous avons vérifié l'expression de Phex, au niveau de l'ARNm et de la protéine, chez la souris Hyp. Nos résultats, en utilisant les techniques d'hybridation *in situ* et de RPA ("RNase protection assay"), ont démontré l'absence des ARNm de Phex chez ces mutants. Au niveau de la protéine, son absence a été démontrée par Western blot et par immunohistochimie. Une seule étude antérieure (Ecarot et Desbarat, 1999) avait rapporté l'absence de Phex dans les extraits d'os des souris Hyp et d'ostéoblastes Hyp en culture. Cependant, l'anticorps utilisé dans cette étude était dirigé contre la région 3' de la protéine, qui est délétée chez le Hyp. Par conséquent, cet anticorps serait incapable de détecter la forme tronquée hypothétique de Phex. Notre anticorps a été dirigé contre une région non délétée de la protéine chez le Hyp et l'absence de détection d'un morceau tronqué démontre de façon bien précise que ce modèle animal porte une mutation négative pour un CRM ("cross reacting material"). La forme tronquée de la protéine, si produite, devrait être soumise à une dégradation rapide par des mécanismes de contrôle de qualité des protéines présentes au niveau du réticulum endoplasmique (Hammond et Helenius, 1995).

6.1.3) Phex et la minéralisation osseuse

Nous avons également remarqué que la couche d'ostéoïde était augmentée dans les calvaria Hyp par rapport aux normales. Ceci était en accord avec des études histomorphométriques réalisées avec des souris Hyp dans les années 80 (Marie *et al.*,

1981, 1982a,b). Une augmentation de l'ostéoïde peut refléter une déposition anormale de la matrice extracellulaire et/ou un défaut de sa minéralisation. Cependant, les études précédentes n'ont pas réussi à obtenir des évidences suggérant une déposition excessive de matrice extracellulaire dans les os des souris Hyp (Van der Rest *et al.*, 1981; Delvin *et al.*, 1990). D'autre part, les évidences sont multiples à suggérer un défaut de minéralisation chez les souris Hyp (Marie *et al.*, 1981, 1982a,b). Ces résultats nous poussent à appuyer l'hypothèse que l'augmentation de la couche d'ostéoïde chez le Hyp est due à un défaut/retard de minéralisation de la matrice osseuse. Cette hypothèse est de plus appuyée par plusieurs études montrant l'existence d'un défaut primaire au niveau des ostéoblastes Hyp qui serait responsable et/ou contribuerait à empirer le manque de minéralisation chez ces animaux (Ecarot-Charrier *et al.*, 1988; Ecarot *et al.*, 1992a,b et 1995). Toujours en accord avec cette idée, il a été récemment rapporté que des ostéoblastes Hyp immortalisés accumulent moins de Ca et présentent, en culture, un défaut de minéralisation des nodules d'os quand comparés à des ostéoblastes normaux immortalisés (Xiao *et al.*, 1999). La même étude a démontré la production d'un facteur par les ostéoblastes Hyp qui inhiberait la minéralisation de la matrice osseuse par des ostéoblastes normaux. La confirmation de l'existence *in vivo* de ce facteur ainsi que son identification moléculaire restent à être établies.

6.1.4) Phex et les marqueurs tardifs de différenciation ostéoblastique

Dans le but de déterminer si la perte de fonction de Phex avait des conséquences sur le processus de développement des ostéoblastes, nous avons comparé, chez la souris normale et son mutant Hyp, l'expression d'ostéocalcine et du récepteur de PTH/PTHrP, qui sont acceptés comme des marqueurs de différenciation ostéoblastique tardive.

L'ostéocalcine est la plus abondante protéine non-collagénique de l'os et est considérée, parmi tous les marqueurs, comme celui d'expression la plus tardive, non détectable dans les preostéoblastes et exprimée abondamment par des ostéoblastes post-mitotiques (Aubin *et al.*, 1995). La synthèse d'ostéocalcine par les ostéoblastes dans la période pré-natale est très basse et variable en quantité selon les différentes

régions d'os examinées (Heersche *et al.*, 1992). En ce qui concerne la synthèse du récepteur de PTH/PTHrP, malgré le fait établi qu'il soit exprimé par des ostéoblastes matures, certaines études suggèrent son expression par des preostéoblastes (révisé par Aubin *et al.*, 1995).

Nos résultats de l'hybridation *in situ* réalisée avec de riboprobes pour l'ostéocalcine et pour le récepteur de PTH/PTHrP, utilisant des coupes de souris normales et Hyp en e17 et P4, ont démontré, chez la souris Hyp, une augmentation significative de l'expression d'ostéocalcine à e17. Cependant, cette différence disparaît après la naissance (jour P4).

Ces résultats indiquent d'abord que l'absence de Phex peut influencer de manière très spécifique l'expression de certains gènes. De plus, l'augmentation de l'expression d'ostéocalcine dans la période embryonnaire chez les souris Hyp, nous laisse suggérer une corrélation entre Phex et cette protéine et que l'absence de Phex chez les Hyp induit une expression précoce et/ou une augmentation, d'une façon encore non comprise, des niveaux d'ostéocalcine dans la période prénatale.

PHEX et ostéocalcine sont exprimées, de manière importante, uniquement par des ostéoblastes, des ostéocytes et des odontoblastes, étant considérées comme des marqueurs spécifiques de ces cellules. L'absence d'ostéocalcine engendre une déposition excessive de matrice par chaque ostéoblaste individuellement, qui ensuite est minéralisée et, par conséquent, rend les os plus résistants. Cela a été mis en évidence par des études d'ablation génique (Ducy *et al.*, 1996). Par contre, l'absence de Phex détermine un retard et/ou un défaut primaire de minéralisation (Ecarot *et al.*, 1992a,b et 1995), aggravé par l'hypophosphatémie, et étant à l'origine du rachitisme et de l'ostéomalacie chez les patients XLH et les souris Hyp. Ces données suggèrent que, dans l'os, les fonctions de PHEX et d'ostéocalcine sont dans un certain sens opposées. Aurait-t-il une corrélation, directe ou indirecte, entre PHEX et ostéocalcine, d'autant plus que des niveaux augmentés d'ostéocalcine circulante ont été détecté chez la souris Hyp? Est-ce que PHEX, en étant une endopeptidase, pourrait participer à la régulation des niveaux d'ostéocalcine? Des études futures sont nécessaires pour répondre à ces questions et établir la nature de la corrélation, si elle existe.

En plus, l'ostéocalcine est une protéine sécrétée. De son côté, Phex est membranaire, mais présente en grande quantité au niveau des prolongements cytoplasmiques des ostéoblastes et des ostéocytes qui parcourent la matrice extracellulaire, en corrélation intime avec celle-ci. Par conséquent, la question suivante s'avère bien légitime: existerait-il une forme de PHEX sécrétée dans l'os, qui s'accumulerait dans la matrice? L'évidence génétique de cette possibilité existe, puisqu'une séquence promotrice a été détectée, par le programme GRAIL, dans l'intron qui sépare les exons 1 et 2 du gène PHEX (Francis *et al.*, 1997), et qui, si utilisée, produirait une protéine sans les domaines intracellulaire et trans-membranaire, donc potentiellement sécrétée si contenant un peptide signal. Des études futures sont aussi nécessaires pour éclairer ce point.

6.1.5) Corrélation entre PHEX et NEP

Dans le but de déterminer si la perte de fonction de Phex avait des conséquences sur l'expression d'autres peptidases présentes dans l'os, nous avons comparé, chez la souris normale et son mutant Hyp, les niveaux de NEP. Les techniques d'hybridation *in situ*, RPA et Western blot ont indiqué que l'abondance relative des ARNm de NEP ainsi que de la protéine immunoréactive n'ont pas différé de façon significative chez les souris normales et Hyp. Ces résultats suggèrent que PHEX et NEP sont probablement impliquées dans la modulation des fonctions cellulaires différentes. Cette hypothèse est consistante avec nos observations que NEP est exprimée dans toutes les cellules de la lignée ostéoblastique (Ruchon *et al.*, 2000, *in press*; quatrième chapitre de cette thèse), tandis que la présence de PHEX est limitée aux ostéoblastes matures et ostéocytes (Ruchon *et al.*, 2000, *in press*; troisième chapitre de cette thèse). Une activité "NEP-like" plus élevée a été récemment rapportée dans les cultures primaires d'ostéoblastes provenant de souris Hyp en comparaison avec celles dérivées de souris normales (Lajeunesse et Delalandre, 1998). Cependant, cette activité n'a pas été totalement inhibée par le thiorphan, un inhibiteur très spécifique de NEP (Dubois et Lajeunesse, 1999). Cela laisse supposer la possibilité de l'existence d'une enzyme encore non identifiée, portant des propriétés catalytiques semblables à NEP et qui serait augmentée chez les

ostéoblastes Hyp. Des études sont déjà en route dans le but de vérifier cette hypothèse.

6.1.6) Le contrôle de l'expression de PHEX

La cartographie du gène PHEX a révélé l'absence d'une séquence de type Kozak qui fréquemment précède la méthionine initiale dans la majorité des gènes. Cette absence suggère que l'expression de la protéine PHEX est soumise à des contrôles très stricts surtout au niveau post-traductionnel. Quels facteurs contrôleraient cette expression? A date, un seul de ces facteurs a été identifié: la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, qui stimulerait l'expression de PHEX, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel (Ecarot et Desbarats, 1999). Il faut noter que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ stimule aussi la transcription de l'ostéocalcine, et que son niveau plasmatique, chez les patients XLH et les souris *Hyp*, est improprement bas par rapport aux niveaux d'hypophosphatémie. Est-ce que la PTH influencerait aussi l'expression de PHEX, comme elle le fait pour l'ostéocalcine et plusieurs autres protéines, d'autant plus qu'il a été démontré que PHEX est capable de l'hydrolyser? Et la phosphatémie, aurait-elle une influence au niveau de l'expression de PHEX? D'autres études restent nécessaires pour établir les connections manquantes parmi ces données et pour déterminer les autres facteurs impliqués dans le contrôle de l'expression et/ou de l'activité de PHEX.

6.1.7) PHEX et la réabsorption de Pi

Il a été suggéré qu'il serait très utile à l'organisme d'avoir un ou des facteur(s) spécifique(s) pour le contrôle de la phosphatémie (Econs et Drezner, 1994; Kumar, 1997). Ce facteur hypothétique, appelé phosphatonine, agirait au niveau de la réabsorption rénale de phosphate et serait le responsable de la perte rénale de Pi chez les individus porteurs de XLH et OHO. Cependant, jusqu'à maintenant, l'identité de ce(s) facteur(s) reste inconnue. Il a été suggéré que PTH ou PTHrP soit ce facteur mais de multiples études contredisent ces possibilités (section A.1.2.2.4 de l'introduction de cette thèse).

Un autre candidat potentiel est la stanniocalcine, une hormone récemment identifiée chez les mammifères et qui a ouvert d'autres horizons dans le champ de la recherche au niveau du métabolisme osseux et minéral (révisé par Barlet *et al.*, 1998). La stanniocalcine (STC) est une hormone glycoprotéique présente chez les poissons téléostéens responsable, de même que la calcitonine, de la prévention d'une hypercalcémie, en eau de mer où la concentration de Ca est environ huit fois plus élevée que celle du liquide extracellulaire (Cameron, 1990). La cible principale de la STC chez les poissons ne sont pas les écailles, capables de stocker le Ca comme les os, mais les routes d'entrée du Ca dans l'organisme: les intestins et les branchies, où elle inhibe l'absorption de Ca. Chez les animaux terrestres, par contre, l'hypercalcémie n'est pas une menace constante, et ils dépendent de leurs réserves internes de Ca, situées dans les os, pour prévenir une hypocalcémie. L'hormone primordiale pour le contrôle homéostatique du Ca extracellulaire chez ces animaux est la PTH, une hormone hypercalcémiant. Jusqu'en 1995, la STC était considérée comme une hormone calciotrope caractéristique des téléostéens, et par conséquent, la découverte des homologues de la STC chez les mammifères a été surprenante. Cependant, certains polypeptides hormonaux présents chez les vertébrés inférieurs se retrouvent chez les mammifères les plus évolués, bien que la localisation des cellules responsables de la sécrétion peut être différente de celle observée chez le poisson, tout comme peuvent l'être le(s) rôle(s) de l'hormone (révisé par Barlet *et al.*, 1998). À date, deux homologues de la STC ont été clonés chez les mammifères: (i) la STC1, humaine et murine, est une protéine de 247 résidus d'acide aminés, qui présente 56-66% d'identité avec la STC de poisson et est capable de stimuler la réabsorption de Pi par les reins de rat (Chang *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996; Olsen *et al.*, 1996); (ii) la STC2, clonée à partir d'une librairie de ADNc d'ostéosarcome humain, possède 302 résidus d'acide aminés et 34% d'identité avec STC et STC1 (Ishibashi *et al.*, 1998). Le milieu de culture des cellules CHO transfectées avec STC2 est capable d'inhiber l'activité du promoteur du co-transporteur NaPi-3, ce qui suggère l'inhibition de l'expression de ce transporteur au niveau de la transcription; la STC2 inhibe aussi la réabsorption de Pi par les cellules OK, après deux jours d'incubation, ce qui suggère une réduction de la transcription du co-transporteur NaPi-4 (Ishibashi *et al.*, 1998).

Bien que les fonctions de la STC1 et de la STC2 soient loin d'être totalement connues, ces données préliminaires indiquent que la STC1 aurait à peu près les mêmes fonctions de la STC des poissons, dans le sens d'inhiber l'absorption de Ca et de stimuler la réabsorption de Pi; par contre, ces résultats impliquent la STC2 dans une fonction opposée, c'est-à-dire, capable de diminuer la réabsorption de Pi, au moins au niveau des reins. Le patron d'expression de la STC1 et de la STC2 chez les mammifères est très large: la STC1 est exprimée dans divers tissus humains, en particulier les reins, la prostate, les ovaires et la thyroïde (Chang *et al.*, 1995); la STC2 est aussi largement exprimée, surtout au niveau des muscles, du cœur, du foie, de l'intestin grêle, des testicules, des ovaire et de l'os (Ishibashi *et al.*, 1998).

En tenant compte des résultats ci-dessus, l'hypothèse que la STC2 soit la phosphatonine mérite d'être examinée. Dans ce sens, Ishibashi et collaborateurs (1998) ont vérifié l'expression des ARNm de STC2 chez les souris Hyp. Ils ont rapporté un déclin de l'expression de STC2 dans la majorité des organes Hyp, un résultat surprenant à première vue, si nous considérons l'hypothèse que, chez les Hyp, l'hypophosphatémie est causée par un excès de STC2. Cependant, il est possible que les niveaux de STC2 circulant soient élevés chez ces souris, due à l'absence de Phex, malgré la baisse généralisée de la transcription de son gène.

6.2) NEP

6.2.1) Sites d'expression physiologique

Malgré la démonstration antérieure de la présence de NEP dans plusieurs tissus et types cellulaires (voir section A.1.2.1.3 et le tableau I), il manquait dans la littérature un aperçu général de la distribution des ARNm de NEP parmi les multiples organes du corps. Nous avons fourni le portrait de cette distribution dans une coupe sagittale de souris P4 (chapitre 4 de cette thèse, figure 1A). Nous pouvons y remarquer l'expression majoritaire de NEP au niveau de la rétine, du cervelet, des glandes sous-maxillaires, du thymus, de la moelle osseuse, de la rate et des reins. Cette expression est aussi relativement abondante au niveau du cerveau, des poumons et des os.

6.2.2) La NEP dans les os

Nous avons démontré la présence des ARNm et de la protéine NEP dans les os par hybridation *in situ*, immunohistochimie et Western blot, en utilisant respectivement une sonde d'ARNc et un anticorps monoclonal très spécifique. Nos résultats démontrent NEP dans toutes les cellules de la lignée ostéoblastique, depuis le stade des précurseurs jusqu'aux osteocytes. De plus, nous montrons que les niveaux de NEP dans l'os déclinent avec l'âge, ce qui suggère une corrélation entre sa présence et la croissance osseuse.

6.2.3) Substrats peptidiques présents dans l'os

Le métabolisme des ostéoblastes et des ostéoclastes dépend des hormones et des facteurs peptidiques locaux de l'environnement osseux. La présence de NEP au niveau de cellules ostéoblastiques suggère l'hypothèse de la participation de cette enzyme dans le contrôle de la demi-vie d'un ou de plusieurs de ces facteurs. La liste de peptides présent dans l'os est bien longue et comprend, parmi d'autres, la substance P, les enképhalines, la calcitonine, la PTH, le PTHrP, le α -CGRP, l'OGP, etc. La substance P et les enképhalines étant des substrats bien établis de NEP, nous avons testé la capacité de cette enzyme d'hydrolyser, *in vitro*, d'autres peptides de cette liste. Quelques hormones et peptides ostéogéniques synthétiques, dont le PTHrP₁₋₃₄, l'ostéostatine (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉), l'OGP, la calcitonine, le α -CGRP et le PTH₁₋₃₄ ont été testés comme substrats. Nos résultats ont démontré qu'à l'exception de PTH₁₋₃₄, tous les autres peptides sont des substrats de NEP *in vitro*. De plus, suite à l'analyse des sites de coupure, nous avons suggéré que, sauf en ce qui concerne l'ostéostatine, l'hydrolyse de ces peptides par NEP détruit totalement leur activité biologique au niveau des os (voir discussion du quatrième chapitre de cette thèse).

Le rôle de NEP dans l'os n'est pas encore clair, mais nos résultats suggèrent qu'elle est impliquée dans le processus d'ostéogenèse à plusieurs niveaux. Premièrement, nous proposons qu'elle fonctionne comme un modulateur de la prolifération et/ou de la différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique. Cette hypothèse est soutenue par le fait que NEP soit exprimée dans toutes les cellules de cette lignée, y compris les précurseurs potentiels, et par la démonstration de sa

capacité d'inactiver l'OGP, le PTHrP₁₋₃₄ et le α -CGRP. L'OGP est un petit peptide de 14 résidus d'acides aminés, produit via la traduction alternative de l'ARNm de l'histone H4 (Bab *et al.*, 1992; Bab *et al.*, 1999), capable de promouvoir la prolifération et différenciation de plusieurs types cellulaires, y compris les stromales de la moelle osseuse et les ostéoblastiques, stimulant ainsi l'ostéogenèse et l'hématopoïèse (Bab, 1995). Le PTHrP₁₋₃₄ présente toutes les propriétés du PTHrP₁₋₃₆, la forme amino-terminal active de la molécule de PTHrP, sécrétée physiologiquement. Il est capable de se lier au récepteur de PTH/PTHrP et de stimuler la prolifération des cellules ostéoblastiques (Rouffet et Barlett, 1995). Finalement, le α -CGRP, exprimé par les ostéoblastes et aussi relâché par les terminaisons nerveuses associées aux vaisseaux du périoste, a aussi été impliqué dans la prolifération et différenciation des ostéoblastes (Bernard et Chung, 1990). Par conséquent, en abolissant l'activité biologique de l'OGP, le PTHrP₁₋₃₄ et le α -CGRP, NEP modulerait la prolifération et la différenciation des cellules de la lignée ostéoblastique.

Le deuxième niveau d'action de NEP dans le tissu osseux serait la modulation de la résorption osseuse, via le contrôle de la biodisponibilité de calcitonine et d'ostéostatine, deux peptides capables d'inhiber l'activité des ostéoclastes (Fenton *et al.*, 1994; Cornish *et al.*, 1997; Chambers et Moore, 1983). La présence ou absence de NEP dans les ostéoclastes reste à être investiguée. Cependant, les altérations subies par les ostéoblastes finissent, indirectement, pour modifier l'action des ostéoclastes. Finalement, l'expression de NEP par les ostéocytes implique un troisième niveau d'action, via la régulation de peptides produits par ou agissant sur les ostéocytes, comme le PTHrP₁₋₃₄, et associés au maintien de l'intégrité de la matrice extracellulaire osseuse (Aarden *et al.*, 1994).

6.3) NL1

NL1 est une nouvelle protéine de la famille de la NEP, possédant, selon ce qu'indiquent nos résultats préliminaires, l'ensemble de ses caractéristiques structurales (conservation des résidus importantes pour le repliement, la conformation du site actif, la catalyse et la glycosylation) et fonctionnelles (activité

enzymatique). Elle est maintenant la protéine connue la plus similaire à NEP, partageant 55% d'identité et 70% de similitude. Cependant, NL1 est sécrétée plutôt que membranaire, ce qui la rend unique et élargit la perception actuelle de cette famille. Malgré l'indication d'une distribution très répandue obtenue par RT-PCR, les expériences de Northern blot et d'hybridation *in situ* ont identifié les cellules germinales du testicule de la souris adulte comme le site prédominant de son expression. Cela suggère que NL1 pourrait intervenir dans un phénomène lié à la fertilité comme, par exemple, la spermatogenèse ou la réaction acrosomique.

Ma participation dans cette étude va depuis l'élaboration, la mise au point, et la réalisation de la stratégie de RT-PCR en utilisant les oligonucléotides dégénérés, jusqu'au diagnostique de la découverte d'une nouvelle protéine de cette famille. Ce diagnostique a été porté après l'obtention et le clonage de multiples fragments d'ADNc d'environ 300 pb, contenant le site actif de l'enzyme, suivi de séquençage qui a permis d'identifier la nouvelle protéine. Les oligonucléotides dégénérés utilisés ont été dessinés à partir des régions de séquence hautement conservées parmi les membres de la famille de NEP. En obtenant ce nouveau fragment d'ADNc, nous avons prouvé que la stratégie conçue pour découvrir d'autres participants de cette famille fonctionnait et pouvait être utilisée avec des ARNm provenant d'autres tissus, y compris d'os. Nous avons réalisé encore des études extensives d'hybridation *in situ* en utilisant des coupes de souris post-natales et adultes, pour démontrer sa distribution cellulaire ultra-spécifique au niveau des spermatides ronds et allongés du testicule de souris adulte.

6.4) Perspectives d'études futures

Les sections qui suivent ne rapportent que les directives générales de quelques études qui pourront être entreprises.

6.4.1) PHEX

a) Recherche d'un substrat, d'abord *in vitro*, en utilisant l'enzyme purifiée, les peptides présents dans l'os et l'analyse par HPLC. La spécificité d'une éventuelle hydrolyse serait mise à l'épreuve par l'utilisation des multiples inhibiteurs de

protéases connus. Une étape postérieure serait la détermination d'un inhibiteur spécifique de PHEX.

b) Vérification de l'expression de PHEX par les autres cellules du micro-environnement osseux (ostéoclastes, cellules stromales), en utilisant des cultures de ces lignées cellulaires et les techniques de PCR ou d'ISH pour la détermination des ARNm, ainsi que les immunoblots ou l'immunohistochimie pour la protéine.

6.4.2) NEP

Vérification des répercussions d'une inhibition de NEP au niveau de la biologie du tissu osseux, en utilisant des cellules ostéoblastiques en culture et un inhibiteur très spécifique pour cette enzyme, comme le thiorphan. Le taux de différenciation cellulaire, de déposition de matrice extracellulaire et de formation des nodules de minéralisation seraient des paramètres à évaluer.

6.4.3) Recherche d'autres membres de la famille de la NEP dans l'os

En utilisant les oligonucléotides dégénérés obtenus à partir des régions d'intense homologie de séquence parmi les membres connus de la famille de la NEP, ainsi que la stratégie de RT-PCR conçue et déjà testée lors de la découverte de NL1, nous pouvons vérifier l'existence d'autres peptidases dans le tissu osseux. L'existence d'une enzyme encore non identifiée, portant des propriétés catalytiques semblables à NEP dans ce tissu a été suggéré par les études avec les ostéoblastes Hyp (Lajeunesse et Delalandre, 1998; Dubois et Lajeunesse, 1999). La source d'ARN pourrait être le tissu osseux directement ou des lignées des cellules osseuses en culture.

6.5) Conclusion

Nos travaux ont démontré la présence de deux endopeptidases, PHEX et NEP, dans le tissu osseux. En tenant compte de la fonction des peptidases dans d'autres tissus (c'est-à-dire, l'inactivation des peptides bioactifs proche de leur récepteur ou l'activation d'un précurseur peptidique), la vérification des peptides présents dans l'os comme leurs substrats potentiels s'avérerait fondamental. Nous avons testé

quelques uns de ces peptides comme substrats éventuels de NEP. Plusieurs sont hydrolysés *in vitro* (l'OGP, le PTHrP₁₋₃₄, le PTHrP₁₀₇₋₁₃₉, le α -CGRP et la calcitonine) et attendent la confirmation *in vivo*.

La comparaison de l'expression de NEP et de PHEX au niveau de la lignée ostéoblastique est très intéressante. Pendant que NEP est présente dans toutes les cellules de cette lignée, depuis les précurseurs jusqu'aux cellules matures, PHEX est exprimée seulement par des ostéoblastes et ostéocytes, les cellules le plus différenciées. Cela suggère que ces peptidases participent à des phénomènes physiologiques différents, via l'hydrolyse de substrats différents.

L'omniprésence de NEP dans la lignée ostéoblastique suggère une participation de cette peptidase dans la prolifération et/ou différenciation de ces cellules. Un rôle semblable de NEP a déjà été décrit pour l'épithélium des voies respiratoires et aussi au niveau de la prostate (Shipp *et al.*, 1991; Sunday *et al.*, 1992; Papandreou *et al.*, 1998), lors de sa participation dans la dégradation des peptides apparentés à la Bombésine (BLPs). La capacité de NEP d'hydrolyser l'OGP, le PTHrP₁₋₃₄ et le α -CGRP soutient cette hypothèse.

Les ostéoblastes, ostéocytes et odontoblastes sont les cellules capables de déposer la matrice extracellulaire et/ou de la minéraliser, étant ainsi responsables du maintien de son intégrité. Phex est exprimée seulement par ces cellules et est aussi bien visible au niveau des leur prolongements cytoplasmiques qui parcourent cette matrice. Cela suggère une corrélation intime entre Phex et la matrice osseuse. La nature de cette corrélation devra attendre l'identification du ou des substrats physiologiques de Phex.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ (1994) Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* 55:287-299.
- Amiel C, Escoubet B, Silve C, Friedlander G (1996) Hypo and Hyperphosphatemia. In *Oxford Textbook of Clinical Physiology*. Cameron S, Davison AM, Eds. Oxford, Oxford University Press.
- Aubin JE, Turksen K, Heersche JNM (1993) Osteoblastic cell lineage. *Cellular and Molecular Biology of Bone*. Noda M, Ed. New York Academic: 1-45.
- Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995) Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* 17 (supp):77S-83S.
- Aschinberg LC, Solomon LM, Zeis PM, Justice P, Rosenthal LM (1997) Vitamin D-resistant rickets associated with epidermal nevus syndrome: demonstration of a phosphaturic substance in the dermal lesions. *Journal of Pediatrics* 91:56-60.
- Ashton BA, Allen TD, Howlett CR et al. (1980) Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. *Clin Orthop Relat Res* 151:294-307.
- Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhlrad A, Shteyer A, Greenberg Z, Namdar M, Kahn A (1992) Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *EMBO J* 11:1867-1873.
- Bab IA (1995) Regulatory role of osteogenic growth peptide in proliferation, osteogenesis, and hemopoiesis. *Clinical Orthopaedics and related research* 313:64-68.
- Bab I, Smith E, Gavish H, Attar-Namdar M, Chorev M, Chen YC, Muhlrad A, Birnbaum MJ, Stein G, Frenkel B (1999) Biosynthesis of osteogenic growth peptide via alternative translational initiation at AUG85 of histone H4 mRNA. *J Biol Chem* 274:14474-14481.

- Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL (1989) The common acute lymphoblastic leukemia antigen maps to chromosomal region 3(q21-q27). *J Immunol* 142:283-287.
- Barlet JP, Gaumet N, Coxam V, Davicco MJ (1998) Calcitonine et staniocalcine. Particularités de la régulation endocrinienne du métabolisme phosphocalcique chez les mammifères et les poissons. *Annales d'Endocrinologie* 59:281-290.
- Barnes K, Kenny AJ (1988) Endopeptidase 24.11 in the adenohypophysis of the pig is localized in the gonadotrophic cells. *Peptides* 9:55-63.
- Barnes K, Turner AJ, Kenny AJ (1993) An immunoelectron microscopic study of pig substantia nigra shows co-localisation of endopeptidase 24.11 with substance P. *Neuroscience* 53:1073-1082.
- Barrett AJ, Rawlings ND (1991) Proteinases: Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans* 19:707-717.
- Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, Hewson AS, Ozawa H, Tenenhouse HS (1998) Targeted inactivation of *Npt2* in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:5372-5377.
- Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurti G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS (1997) Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 99:1200-1209.
- Beck L, Meyer RA Jr, Meyer MH, Biber J, Murer H, Tenenhouse HS (1996) Renal expression of Na⁺-phosphate cotransporteur mRNA and protein. Effect of the Gy mutation and low phosphate diet. *Pflugers Arch* 431:936-941.
- Bernard G, Chung SE (1990) The osteogenic stimulating effect of neuroactive calcitonin gene related peptide. *Peptide* 11:625-632.
- Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S (1989) Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245:855-857.
- Blydt-Hansen TD, Tenenhouse HS, Goodyer P (1999) PHEX expression in parathyroid gland and parathyroid hormone dysregulation in X-linked

hypophosphatemia. *Pediatr Nephrol* 13:607-611.

Blundell TL (1994) Metalloproteinase super-families and drug design. *Nature Struct Biol* 1:73-75.

Bode W, Gomis-Ruth FX, Stockler W (1993) Astacins, serralyisins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". *FEBS Lett* 331:134-140.

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Ranning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation and substrate identification. *J Biol Chem* 271:12517-12524.

Bourne A, Kenny AJ (1990) The hydrolysis of brain and atrial natriuretic peptides by porcine choroid plexus is attributable to endopeptidase-24.11 *Biochem J* 271:381-385.

Bowes MA, Kenny AJ (1987) Endopeptidase 24.11 in pig lymph nodes: purification and immunocytochemical localization in reticular cells. *Biochem J* 286:801-810.

Brickell PM (1995) Mhox and vertebrate skeletogenesis: the long and short of it. *BioEssays* 17:750-753.

Brownstein MJ (1993) A brief history of opiate, opioid peptides and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 :5391-5393.

Bunnett NW, Kobayashi R, Orloff MS, Reeve JR, Turner AJ, Walsh JH (1985) Catabolism of gastrin releasing peptide and substance P by gastric membrane-bound peptidases. *Peptides* 6:277-283.

Bunnett NW, Debas HT, Turner AJ, Kobayashi R, Walsh JH (1988) Metabolism of gastrin and cholecystokinin by endopeptidase 24.11 from the pig stomach. *Am J Physiol* 255:G676-G684.

Burns DM, Walker B, Gray J, Nelson J (1999) Breast cancer cell-associated endopeptidase EC 24.11 modulates proliferative response to bombesine. *Br J Cancer* 79 :214-220.

Busch AE, Waldegger S, Herzer T, Biber J, Markovich D, Hayes G, Murer H, Lang F

- (1994) Electrophysiological analysis of Na/Pi cotransport mediated by a transporter cloned from rat kidney and expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natn Acad Sci USA* 91:8205-8208.
- Busch AE, Schuster A, Waldegger S, Wagner CA, Zempel G, Broer S, Biber J, Murer H, Lang F (1996) Expression of a renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi 1) induces a conductance in *Xenopus* oocytes permeable for inorganic and organic anions. *Proc Natn Acad Sci USA* 93:5347-5351.
- Cai Q, Hodson SF, Kao PC, Lennon VA, Klee GG, Zinsmeister AR, Kumar R (1994) Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia. *New England Journal of Medecine* 330:1645-1649.
- Camacho NP, Rimnac CM, Meyer RA Jr, Doty S, Boskey AL (1995) Effect of abnormal mineralization on the mechanical behavior of X-linked hypophosphatemic mice femora. *Bone* 17:271-278.
- Cameron JN (1990) Unusual aspects of calcium metabolism in aquatic animals. *Ann Rev Physiol* 52:77-95.
- Canalis E (1996) Regulation of bone remodeling: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 3rd Ed., pp 29-34.
- Chambers TJ, Moore A (1983) The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J Clin Endocrinol Metab* 57:819.
- Chang AC, Janosi J, Hulsbeek M, De Jong D, Jeffrey KJ, Noble JR, Reddel RR (1995) A novel human cDNA highly homologous to the fish stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 112:241-247.
- Chang AC, Dunham MA, Jeffrey KJ, Reddel RR (1996) Molecular cloning and characterization of mouse stanniocalcin cDNA. *Mol Cell Endocrinol* 124:185-187.
- Charles P, Hasling C, Risteli L, Risteli J, Mosekilde L, Eriksen EF (1992) Assessment of bone formation by biochemical markers in metabolic bone disease: separation between osteoblastic activity at the cell and tissue level. *Calcif Tissue Int* 51:406-411.
- Chen CY, Salles G, Seldin MF, Kister AE, Reinherz EL, Shipp MA (1992) Murine

- communcute lymphoblastic leukemia antigen (CD10 neutral endopeptidase 24.11). *J Immunol* 148:2817-2825.
- Cheng CL, Ma J, Wu PC, Mason RS, Posen S (1989) Osteomalacia secondary to osteosarcoma. A case report. *Journal of Bone and Joint Surgery (American Volume)* 71:288-292.
- Chong SS, Kristjansson K, Zoghbi HY, Hughes MR (1993) Molecular cloning of the cDNA encoding a human renal sodium phosphate transport protein and its assignment to chromosome 6p21-p23. *Genomics* 18:355-359.
- Chong SS, Kozac CA, Liu L, Kristjansson K, Dunn ST, Bourdeau JE, Hughes MR (1995) Cloning, genetic mapping and expression analysis of a mouse renal sodium-dependent phosphate cotransporter. *Am J Physiol* 268:F1038-F1045.
- Cohen AJ, Bunn PA, Franklin W et al (1996) Neutral endopeptidase variable expression in human lung, inactivation in lung cancer and modulation of peptide induced calcium flux. *Cancer Res* 56:831-839.
- Collins JF, Ghishan FK (1994) Molecular cloning, functional expression, tissue distribution and *in situ* hybridization of the renal sodium phosphate (Na/Pi) transporter in the control and hypophosphatemic mouse. *FASEB J* 8:862-868.
- Cornish J, Callon KE, Nicholson GC, Reid IR (1997) Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo. *Endocrinology* 138:1299-1304.
- Cowgill LD, Goldfarb S, Lau K, Slatopolsky E, Agus ZS (1979) Evidence for a intrinsic renal tubular defect in mice with genetic hypophosphatemic rickets. *J Clin Invest* 63:1203-1210.
- Crippes BA, Engleman VW, Settle SL, Delarco J, Ornberg RL, Helfrich MH, Horton MA, Nickols GA (1996) Antibody to beta3 integrin inhibits osteoclast-mediated bone resorption in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology* 137:918-924.
- Custer M, Lotscher M, Biber J, Murer H, Kaissling B (1994) Expression of a Na-Pi cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry. *Am J Physiol* 266:F767-F774.
- D'Adamio L, Shipp MA, Masteller EL, Reinherz EL (1989) Organization of the gene

encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5' untranslated regions. *Immunology* 86:7103-7107.

- De La Baume S, Yi CC, Schwartz JC, Challet P, Marcais-Collado H, Costentin L (1983) Participation of both enkephalinase and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Neuroscience* 8:143-151.
- Delmas PD, Wilson DM, Mann KG, Riggs BL (1983) Effect of renal function on plasma levels of bone Gla-protein. *J Clin Endocrinol Metab* 57:1028-1030.
- Delvin EE, Richard P, Desbarats M, Ecarot-Charrier B, Glorieux FH (1990) Cultured osteoblasts from normal and hypophosphatemic mice: calcitriol receptors and biological response to the hormone. *Bone* 11:87-94.
- Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R (1993) Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev* 14:690-709.
- Dennis VW, Bello-Reuss E, Robinson RR (1977) Responses of phosphate transport to parathyroid hormone in segments of rabbit nephron. *Am J Physiol* 233:F29-F38.
- Desbois C, Hagihara K, Pinerio G, Boyce B, Bonadio J, Tseng KF, Goulet R, Goldstein S, Loyer E, Bradley A, Karsenty G (1995) Increased bone formation in osteocalcin deficient mice. *J Bone Miner Res* 10 (suppl) :139S.
- Devault A, Lazure C, Nault C, Le Moual H, Seidah NG, Chretien M, Kahn P, Powell J, Mallet J, Beaumont A, Roques BP, Crine P, Boileau G (1987) Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J* 6 :1317-1322.
- Dion N, Le Moual H, Crine P, Boileau G (1993) Kinetic evidence that His-711 of neutral endopeptidase 24.11 is involved in stabilization of the transition state. *FEBS Lett* 318:301-304.
- Dion N, Le Moual H, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Crine P, Boileau G (1995) Evidence that Asn542 of neprilysin (EC 3.4.24.11) is involved in binding of the P2' residue of substrates and inhibitors. *Biochem J* 311:623-627.
- Dixon PH, Christie PT, Wooding C, Trump D, Grieff M., Holm I, Gertner JM, Schmidtke J, Shah B, Shaw N, Smith C, Tau C, Schlessinger D, Whyte MP,

- Thakker RV (1998) Mutational analysis of the PHEX gene in X-linked dominant hypophosphataemia. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3615-3623.
- Dobnig H, Turner RT (1995) Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136:3632-3638.
- Doty SB (1981) Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* 33:509-512.
- Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G, Gowen M (1996) Cathepsin K, but not cathepsins B, L or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 271:12511-12516.
- Drezner MK, Lobaugh B, Lyles KM, Carey DE, Paukson DF, Harrelson JM (1982) The pathogenesis and treatment of tumor-induced osteomalacia. In *Vitamin D, Chemical, Biochemical and Clinical Endocrinology of Calcium Metabolism* (eds. AW Normand, K Schaefer, DV Herrath & HG Grigoleit), pp 949-954. Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York.
- Drezner MK (1996) Tumor-induced rickets and osteomalacia. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* (ed. MJ Favus), pp 319-325. Raven Press, New York.
- Du L, Desbarats M, Viel J, Glorieux FH, Cawthorn C, Ecarot B (1996) cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Gemonics* 36:22-28.
- Dubois SG, Lajeunesse D (1999) Evidence that a neutral endopeptidase-like activity of Hyp mouse osteoblasts is responsible for the elaboration of the inhibitor of phosphate uptake by renal cells. *J Bone Miner Res* 14:S224.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382:448-452.
- Dutriez I, Sales N, Fournié-Zaluski MC, Roques BP (1992) Pre- and post-natal ontogeny of neutral endopeptidase 24.11(enkephalinase) studied by in vitro autoradiography in the rat. *Experientia* 48:290-300.

- Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, Travers R, Desbarats M, Bouchard F, Hinek A (1988) Defective bone formation by transplanted Hyp mouse bone cells into normal mice. *Endocrinology* 123:768-773
- Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L (1992a) Defective bone formation by Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in favor of an intrinsic osteoblast defect. *J Bone Miner Res* 7:215-220.
- Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L (1992b) Effect of dietary phosphate deprivation and supplementation of recipient mice on bone formation by transplanted cells from normal and X-linked hypophosphatemic mice. *J Bone Miner Res* 7:523-530.
- Ecarot B, Glorieux FH, Desbarats M, Travers R, Labelle L (1995) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ treatment on bone formation by transplanted cells from normal and X-linked hypophosphatemic mice. *J Bone Miner Res* 10:424-431.
- Ecarot B, Desbarat M (1999) 1,25-(OH)₂D₃ down-regulates expression of PheX, a marker of the mature osteoblast. *Endocrinology* 140:1192-1199.
- Econs MJ, Drezner MK (1994) Tumor-induced osteomalacia - unveiling a new hormone. *N Engl J Med* 330:1679-1681.
- Econs MJ (1996) Positional cloning of the HYP gene: A review. *Kidney Int* 49:1033-1037.
- Econs MJ, Francis F (1997) Positional cloning of the PEX gene: new insights into the pathophysiology of X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Physiol* 273:F489-498.
- Eicher EM, Southard JL, Scriver CR, Glorieux FH (1976) Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4667-4671
- Ek-Rylander B, Bill P, Norgard M, Nilsson S, Andersson G (1991) Cloning, sequence, and developmental expression of a type 5, tartrate-resistant, acid phosphatase of rat bone. *J Biol Chem* 266:24684-24689.
- Emoto N, Yanagisawa M (1995) Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem* 270:15262-15268.

- Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R (1995) Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 80:371-378.
- Eyre DR (1980) Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science* 207:1315-1322.
- Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC (1994) Carboxyl-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts. *J Bone Miner Res* 9:515-519.
- Fishman WL (1990) Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress. *Clin Biochem* 23:99-104.
- Francis F, Strom TM, Hennig S, Böddrich A., Lorenz B, Brandau O, Mohnike KL, Cagnoli M, Steffens C, Klages S, Borzym K, Pohl T, Oudet C, Econs MJ, Rowe PS, Reinhardt R, Meitinger T, Lehrach H (1997) Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked hypophosphatemic rickets. *Genome Res* 7:573-585.
- Fujikawa Y, Quinn JM, Sabokbar A, McGee JO, Athanasou NA (1996) The human osteoclast precursor circulates in the monocytic fraction. *Endocrinology* 137:4058-4060.
- Ganju RK, Sunday M, Tsarwhas DG, Card A, Shipp MA (1994) CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. Relationship to cellular proliferation. *J Clin Invest* 94:1784-1791.
- Gazit D, Tieder M, Liberman UA, Passi-Even L, Bab IA (1991) Osteomalacia in hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: A correlative clinical-histomorphometric study. *J Clin Endocrinol Metab* 72:229.
- Gee NS, Matsas R, Kenny AJ (1983) A monoclonal antibody to kidney endopeptidase 24.11. Its application in immunoabsorbent purification of the enzyme and immunofluorescent microscopy of kidney and intestine. *Biochem J* 214:377-386.
- Gee NS, Bowes MA, Buck P, Kenny AJ (1985) An immunoradiometric assay for endopeptidase 24.11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues. *Biochem J* 228:119-126.
- Gehron Robey P, Bianco P et Termine JD (1992) The cellular biology and molecular

- biochemistry of bone formation. In: Favus M, Coe FL, eds. *Disorders of mineral metabolism*. New York: Raven Press, pp 241-263.
- Giasson SD, Brunette MG, Danan G, Vignault N, Carriere S (1977) Micropuncture study of renal phosphorus transport in hypophosphatemic vitamin D resistant rickets mice. *Pflugers Arch* 371:33-38.
- Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA and Lian J (1991) A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J. Cell. Biochem.* 45:292-302.
- Gmaj F, Murer H (1986) Cellular mechanisms of inorganic phosphate transport in kidney. *Physiol Rev* 66:36-70.
- Gowen M (1992) *Cytokines and bone metabolism*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Goetzl EJ, Sreedharam SP, Turck CW, Bridenbaugh R, Malfroy B (1989) Preferential cleavage of amino and carboxyl-terminal oligopeptides from vasoactive intestinal polypeptide by human recombinant enkephalinase (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11). *Biochem Biophys Res Commun* 158:850-854.
- Greaves MF, Brown G (1975) Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol* 4:67-84.
- Grieff M, Mumm S, Waeltz P *et al.* (1997) Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 231:635-639.
- Grigoriadis AE, Heershe JNM, Aubin JE (1988) Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 106:2139-2151.
- Guo R, Quarles LD (1997) Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 12:1009-1017.
- Hammond C, Helenius A (1995) Quality control in the secretory pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7:523-529.
- Hartmann C, Wagner CA, Busch AE, Markovich D, Biber J, Murer H (1995) Transport characteristics of a murine renal Na/Pi-cotransporter. *Pflugers Arch* 430:830-836.
- Harvey N, Tenenhouse HS (1992) Renal Na⁺-phosphate cotransport in X-linked *Hyp*

mice responds appropriately to Na⁺ gradient, membrane potential and pH. *J Bone Miner Res* 7:563-571.

- Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM (1975) Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:3925-3417.
- Hayes G, Bush AE, Lostscher M, Waldegger S, Lang F, Verrey F, Biber J, Murer H (1994) Role of N-linked glycosylation in rat renal Na/Pi-cotransport. *J Biol Chem* 269:24143-24149.
- Helps C, Murer H, McGivan J (1995) Cloning, sequence analysis and expression of cDNA encoding a sodium-dependent phosphate transporter from the bovine renal epithelial cell line NBL-1. *Eur J Biochem* 228:927-930.
- Hersh LB (1984) Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase (enkephalinase). *J Neurochem* 43:487-493.
- Heersche JNM (1992) Systemic factors regulating osteoclast function. In *Biology and physiology of the osteoclast*, Rifkin BR et Gay CV, eds., CRC Press, pp 151-170.
- Hewison M, (1994) Tumor-induced osteomalacia [review]. *Current Opinion in Rheumatology* 6:340-344.
- Holm IA, Huang X, Kundel LM (1997) Mutational analysis of the PEX gene in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Am J Hum Genet* 60:790-797.
- Hooper NM (1994) Families of zinc metallopeptidases. *FEBS Lett.* 354:1-6.
- Hooper NM, Kenny AJ, Turner AJ (1985) The metabolism of neuropeptides. Neurokinin A (substance K) is a substrate for endopeptidase 24.11 but not for peptidyl dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme). *Biochem J* 231:357-361.
- Ishibashi K, Miyamoto K, Taketani Y, Morita K, Takeda E, Sasaki S, Imai M (1998) Molecular cloning of a second human stanniocalcin homologue (STC2). *Biochem Biophys Res Commun* 250:252-258.
- Jacenko O, Olsen BR, Warman ML (1994) Of mice and men: heritable skeletal disorders. *Am J Hum Genet* 54:163-168.

- Jeansonne BG, Feagin FF, McMinn RW et al. (1979) Cell-to-cell communication of osteoblasts. *J Dent Res* 58:1415-1423.
- Jongeneel CV, Bouvier J, Bairoch A (1989) A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* 242:211-214.
- Kanehisa J, Heersche JN (1988) Osteoclastic bone resorption: In vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. *Bone* 9:73-79.
- Karaplis AC, Vautour L (1997) Parathyroid hormone-related peptide and the parathyroid hormone/ parathyroid hormone-related peptide receptor in skeletal development. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:308-313.
- Katayama M, Nadel JA, Bunnett NW, Di Maria GU, Haxhiu M, Borson DB (1991) Catabolism of calcitonin gene-related peptide and substance P by neutral endopeptidase. *Peptides* 12:563-567.
- Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, Law W, Kozak SL, Kabat D, Miller AD (1994) Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc natn Acad Sci USA* 91:7071-7075.
- Kavanaugh MP, Kabat D (1996) Identification and Characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family. *Kidney Int* 49:959-963.
- Kempson SA, Lotscher M, Kaissling B, Biber J, Murer H, Levi M (1995) Parathyroid hormone action on phosphate transporter mRNA and protein in rat renal proximal tubules. *J Physiol* 268:F937-F791
- Kenny AJ, Fulcher IS, McGill KA, Kershaw D (1983) Proteins of the kidney microvillar membrane. *Biochem J* 211:755-762.
- Kenny AJ, Stephenson SL, Turner AJ (1987) Cell surface peptidases. In *Mammalian Ectoenzymes*, ed by AJ Kenny and AJ Turner, pp169-210, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands.
- Kenny AJ, O'Hare MJ, Gusterson BA (1989) Cell-surface peptidases as modulators of growth and differentiation. *Lancet* 2:785-787.
- Kenny AJ, Boustead CM (1997) Cell-surface peptidases in Health and disease. Kenny AJ, Boustead CM, eds. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK.

- Kerr MA, Kenny AJ (1974a) The molecular weight and properties of a neutral metallo-endoropeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 137:489-495.
- Kerr MA, Kenny AJ (1974b) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* 137:477-488.
- Kimoto Y (1996) A possibility of all mRNA expression in a single lymphocyte. *Hum. Cell* 9:367-370.
- King KA, Hua J, Torday JS, Drazen JM, Graham SA, Shipp MA, Sunday ME (1993) CD10/neutral endopeptidase 24.11 regulates fetal lung growth and maturation in utero by potentialing endogenous bombesin-like peptides. *J Clin Invest* 91:1969-1973.
- Koehne P, Schaper C, Graf K, Kunkel G (1998) Neutral endopeptidase 24.11: its physiologic and possible pathophysiologic role in inflammation with special effect on respiratory inflammation. *Allergy* 53:1023-1042.
- Kohl B, Herter P, Hulseweb B, Elger M, Hentschel H, Kinne RK, Werner A (1996) Na-Pi cotransport in flounder: same transport system in kidney and intestine. *Am J Physiol* 270:F937-F944.
- Kohl B, Wagner CA, Hulseweh B, Bush AE, Werner A (1998) The Na⁺-phosphate cotransport system (NaPiII) with a cleaved protein backbone: implications on function and membrane insertion. *J Physiol Lond* 508:341-350.
- Kontinen Y, Imai S, Suda A (1996) Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. State of the art. *Acta Osthop Scand* 67:632-639.
- Kos CH, Tihy F, Econs MJ, Murer H, Lemieux N, Tenenhouse HS (1994) Localization of a renal sodium-phosphate cotransporter gene to human chromosome 5q35. *Genomics* 19:176-177.
- Kozak M (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *J Cell Biol* 115:887-903.
- Kronenberg HM (1997) Parathyroid hormone and osteocalcin – when friends become strangers. *Endocrinology* 138:3083-3084.
- Kumar R (1997) Phosphatonin - a new phosphaturic hormone ? (Lessons from tumor induced osteomalacia and X-linked hypophosphatemia). *Nephrol Dial*

Transplant 12:11-13.

- LaFrance MH, Vézina C, Wang Q, Boileau G, Crine P, Lemay G (1994) Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase 24.11. *Biochem J* 302:451-454.
- Lajeunesse D, Meyer RA, Hamel L (1996) Direct demonstration of a humorally-mediated inhibition of renal phosphate transport in the Hyp mouse: involvement of an osteoblast-derived factor. *Kidney Int* 50:1531-1538.
- Lajeunesse D, Delalandre A (1998) Evidence that the putative phosphaturic product present in Hyp mouse may be modified, not produced, by osteoblasts and bone marrow stromal cells. *Bone* 5:SA076.
- Lau K, Stom MC, Goldberg M, Goldfarb S, Gray RW, Lemann J, Agus ZS (1979) Evidence for a humoral phosphaturic factor in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia. *Clinical Research* 27:421A (Abstract).
- Le Bien TW, McCormack RT (1989) The common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10) – emancipation from a functional enigma. *Blood* 73:625-634.
- Lee S, Zambas ED, Marsh WL, Redman CM (1991) Molecular cloning and primary structure of Kell blood group protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6353-6357.
- Le Moual H, Devault A, Roques BP, Crine P, Boileau G (1991) Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in endopeptidase-24.11. *J Biol Chem* 266:15670-15674.
- Le Moual H, Dion N, Roques BP, Crine P, Boileau G (1994) Asp650 is crucial for catalytic activity of neutral endopeptidase 24.11. *Eur J Biochem* 221:475-480.
- Lennarz WJ, Strittmater WJ (1991) Cellular functions of metalloproteinases. *Biochim Biophys Acta* 1071:149-158.
- Letarte M, Vera S, Tran R, Addis JBL, Onizuka RJ, Quackenbush EJ, Jongenell CV, McInnes RR (1988) Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. *J Exp Med* 168:1247-1253.
- Levi M, Lotscher M, Sorribas V, Custer M, Arar M, Kaissling B, Murer H, Biber J (1994) Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal P(i) transporter to alterations in dietary P(i). *Am J Physiol* 267:F900-F908.

- Li H, Ren P, Onwochei M, Ruch RJ, Xie Z (1996) Regulation of rat Na/Pi cotransporter-1 gene expression: the roles of glucose and insulin. *Am J Physiol* 271:E1021-E1028.
- Li YP, Alexander M, Wucherpfennig AL, Yelick P, Chen W, Stashenko P (1995) Cloning and complete coding sequence of a novel human cathepsin expressed in giant cells of osteoclastomas. *J Bone Miner Res* 10:1197-1202.
- Lin HY, Kaji HJ, Lodish H (1991) Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* 25:1022-1024.
- Lipman ML, Panda D, Bennett HPJ, Henderson JE, Shane E, Shen Y, Goltzman D, Karaplis AC (1998) Cloning of human Pex cDNA. Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity. *J Biol Chem* 273:13729-13737.
- Lorenz B, Francis F, Gempel K, Boddlich A, Josten M, Schmahl W, Schmidt J, Lehrach H, Meitinger T, Strom TM (1998) Spermine deficiency in Gy mice caused by deletion of the spermine synthase gene. *Hum Mol Genet* 7:541-547.
- Loutit JF et Nisbet NW (1982) The origin of the osteoclast. *Immunobiology* 161:193.
- Loutit JF, Townsend KM (1982) Longevity of osteoclasts in radiation chimaeras of osteopetrotic beige and mice. *Br J Exp Pathol* 63:221-223.
- Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF, Bozza M, Zurakowski D, Finco O, Carrol ML, Gerard G (1995) Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J Exp Med* 181:2271-2275.
- Lyon MF, Scriver CR, Baker LRI, Tenenhouse HS, Kronick J, Mandla S (1986) The Gy mutation: another cause of X-linked hypophosphatemia in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4899-4903.
- Malfroy B, Swerts JP, Guyon A, Roques BP, Schwartz JC (1987) High-affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276:523-526.
- Malfroy B, Schofield PR, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Henzel WJ (1987) Molecular cloning and aminoacid sequence of rat enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 144:59-66.
- Malfroy B, Kuang WJ, Seeburg PH, Mason AJ, Schofield PR (1987) Molecular cloning and aminoacid sequence of human enkephalinase (neutral

endopeptidase). *FEBS Lett* 229:206-210.

- Margulies KB, Carvero PG, Seymour AA, Delaney NG, Burnett JC (1990) Neutral endopeptidase inhibition potentiates the renal actions of atrial natriuretic factor. *Kidney Int* 38:67-72.
- Marie PJ, Travers R, Glorieux FH (1981) Healing of rickets with phosphate supplementation in the hypophosphatemic male mouse. *J Clin Invest* 67:911-914.
- Marie PJ, Travers R, Glorieux FH (1982b) Bone response to phosphate and vitamin D metabolites in the hypophosphatemic male mouse. *Calcif Tissue Int* 34:158-164.
- Marie PJ, Travers R, Glorieux FH (1982a) Healing of bone lesions with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the young X-linked hypophosphatemic male mouse. *Endocrinology* 111:904-911.
- Matthews BW, Jansonius JN, Colman PM, Schoenborn BP, Dupourque D (1972) Three-dimensional structure of thermolysin. *Nature (London)* 238:37-43.
- Matsas R, Fulcher IS, Kenny AJ, Turner AJ (1983) Substance P and [Leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3111-3115.
- Matsas R, Kenny AJ, Turner AJ (1984) The metabolism of neuropeptides. The hydrolysis of peptides, including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase 24.11. *Biochem J* 223:433-440.
- Mauborgne A, Bourgoin S, Benoliel JJ, Hamon M, Cesselin F (1991) Is substance P released from slices of the rat spinal cord inactivated by peptidase(s) distinct from both enkephalinase and angiotensin-converting enzyme? *Neuroscience Lett* 123:221-225.
- McKusick VA (1994) *Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of human genes and genetic disorders*. 11th ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Magagnin S, Werner A, Markovich D, Sorribas V, Stange G, Biber J, Murer H (1993) Expression cloning of human and rat renal cortex Na/Pi cotransporter. *Proc Natn Acad Sci USA* 90:5979-5983.

- McPherson JD, Krane MC, Wagner-McPherson CB, Kos CH, Tenenhouse HS (1997) High resolution mapping of the renal sodium-phosphate cotransporter gene (NPT2) confirms its localization to human chromosome 5q35. *Pediatr Res* 41:632-634.
- Melkko J, Niemi S, Risteli L et Risteli J (1990) Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem* 36:1328-1332.
- Meyer RA Jr, Meyer MH, Gray RW (1989a) Parabiosis suggests a humoral factor is involved in X-linked hypophosphatemia in mice. *J Bone Miner Res* 4:493-500.
- Meyer RA Jr, Tenenhouse HS, Meyer MH, Klugerman AH (1989b) The renal phosphate transport defect in normal mice parabiosed to X-linked hypophosphatemic mice persists after parathyroidectomy. *J Bone Miner Res* 4:523-532.
- Meyer RA Jr, Gray RW, Meyer MH (1980) Abnormal vitamin D metabolism in the X-linked hypophosphatemic mouse. *Endocrinology* 107:1577-1581.
- Meyer RA, Henley CM, Meyer MH, Morgan PL, McDonald AG, Mills C, Price DK (1998) Partial deletion of both the spermine synthase gene and the Pex gene in the X-linked hypophosphatemic, Gyro (Gy) mouse. *Gemonics* 48:289-295.
- Miller DG, Edwards RH, Miller AD (1994) Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:78-82.
- Miyauchi A, Fukase M, Tsutsumi M, Fujita T (1988) Hemangiopericytoma-induced osteomalacia: tumor transplantation in nude mice causes hypophosphatemia and tumor extracts inhibit renal 25-Hydroxylase activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67:46-53.
- Mizgala CL, Quamme GA (1985) Renal handling of phosphate. *Physiol Rev* 65:431-466.
- Morgan JM, Hawley WL, Chenoweth AI, Retan WJ, Diethelm AG (1974) Renal transplantation in hypophosphatemia with vitamin D-resistant rickets. *Arch Intern Med* 134:549-552.

- Morrison N, Shine J, Eisman J (1990) 1,25-Dihydroxyvitamin D responsive element and glucocorticoid repression of the osteocalcin gene. *Science* 246:1158-1161.
- Mundy GR (1992) Local factors regulating osteoclast function. In *Biology and physiology of the osteoclast*, Rifkin BR et Gay CV, eds., CRC Press, pp 171-186.
- Murer H, Werner A, Reshkin S, Wuarin F, Biber J (1991) Cellular mechanisms in proximal tubular reabsorption of inorganic phosphate. *Am J Physiol* 260:C885-C889.
- Murer H, Biber J (1994) Renal sodium-phosphate cotransport. *Curr Opin Nephrol* 3 :504-510.
- Murer H, Biber J (1996) Molecular mechanisms of renal apical Na phosphate cotransport. *Annu Rev Physiol* 58:607-618.
- Murer H, Forster J, Hilfiker H, Pfister M, Kaissling B, Lotscher M, Biber J (1998) Cellular/molecular control of renal Na/Pi-cotransport. *Kidney Int* (Suppl) 65:S2-S10.
- Nelson AE, Namkung HJ, Patava J, Wilkinson MR, Chang AC-M, Reddel RR, Robinson BG, Mason RS (1996) Characteristics of tumor cell bioactivity in oncogenic osteomalacia. *Molecular and Cellular Endocrinology* 124:17-23.
- Nelson AE, Robinson BG, Mason RS (1997) Oncogenic osteomalacia: is there a new phosphate regulating hormone? *Clin Endocrinol* 47:635-642.
- Nesbitt T, Drezner MK (1996) Hepatocyte production of phosphatonin in Hyp mice. *Journal of Bone and Mineral Research* 11:S136 (Abstract).
- Nesbitt SA, Horton MA (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science* 276:266-269.
- Nesbitt T, Coffman TM, Griffiths R, Drezner MK (1992) Crosstransplantation of kidneys in normal and Hyp mice. Evidence that the Hyp phenotype is unrelated to an intrinsic renal defect. *J Clin Invest* 89:1453-1459.
- Nesbitt T, Drezner MK (1990) Abnormal parathyroid-hormone related peptide stimulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase in Hyp mice. Evidence for a generalized defect of enzyme activity in the proximal convoluted tubule. *Endocrinology* 127:843-848.

- Nesbitt T, Davidai GA, Drezner MK (1989) Abnormal adenosine 3',5'-monophosphate stimulation of renal 1,25-dihydroxyvitamin D production in Hyp mice. Evidence that 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase dysfunction results from aberrant intracellular function. *Endocrinology* 124:1184-1189.
- Nesbitt T, Drezner MK, Lobaugh B (1986) Abnormal parathyroid hormone stimulation of 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase activity in the hypophosphatemic mouse. Evidence for a generalized defect of vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 77: 181-187.
- Ni B, Du Y, Wu X, DeHoff BS, Rosteck PR, Paul SM (1996) Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a human brain-specific Na-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 66:2227-2238.
- Ni B, Rosteck PR, Nadi NS, Paul SM (1995) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5607-5611.
- Nitzan DW, Horowitz AT, Darmon D, Friedlaender MM, Rubinger D, Stein P, Bab I, Popovtzer MM, Silver J (1989) Oncogenous osteomalacia: a case study. *Bone and Mineral* 6:191-197.
- Noda M, Yoon K, Rodan GA, Koppel DE (1987) High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol-anchored membrane protein. *J Cell Biol* 105:1671-1677.
- Nishimoto SK et Price PA (1985) The vitamin K-dependent bone protein is accumulated within culture osteosarcoma cells in the presence of the vitamin K antagonist warfarin. *J Biol Chem* 260:2832-2836.
- Oblin A, Danse MJ, Zivkovic B (1989) Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) but not angiotensin-converting enzyme is involved in the inactivation of substance P by synaptic membrane of the rat substantia nigra. *Life Sc* 44:1467-1474.
- O'Hara B, Jahann SV, Klinger HP, Blair DG, Rubinson H, Dunn KJ, Sass P, Viter SM, Robins T (1990) Characterization of a human gene conferring sensitivity to infection by gibbon ape leukemia virus. *Cell Growth Differ* 1:119-127.
- Olah Z, Lehel C, Anderson WB, Eiden MV, Wilson CA (1994) The cellular receptor for gibbon ape leukemia virus is a novel high affinity sodium-dependent

phosphate transporter. *J Biol Chem* 269:25426-25431.

Olsen HS, Cepeda MA, Zhang QQ, Rosen CA, Vozzolo BL, Wagner GF (1996) Human stanniocalcin: a possible hormonal regulator of mineral metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1792-1796.

Papandreou CN, Usmani B, Geng Y, Bogenrieder T, Freeman R, Wilk S, Finstad CL, Reuter VE, Powell CT, Scheinberg D, Magill C, Scher HI, Albino AP, Nanus DM (1998) Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Medicine* 4 :50-57.

Pham I, Gonzalez W, Amrani A-IK, Fournie-Zaluski MC, Philippe M, Laboulandine I, Roques BP, Michel J-B (1993) Effects of converting enzyme inhibitor and neutral endopeptidase inhibitor on blood pressure and renal function in experimental hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1339-1347.

Pollard M, Bouthernet ML, Moreau J, Souil E, Verroust P, Ronco P, Schwartz JC (1989) Detailed immunautoradiographic mapping system comparison with enkephalins and SP. *Neuroscience* 30:339-376.

Popovtzer MM (1981) Tumor-induced hypophosphatemic osteomalacia (TUO): evidence for a phosphaturic cyclic AMP-independent action of tumor extract. *Clinical Research* 29-418A (Abstract).

Poser JW, Esch FS, Ling NC, Prince PA (1980) Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. *J Biol Chem* 225:5685-5691.

Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristaponis J, Raman N (1976) Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:1447-1451.

Quabius ES, Murer H, Biber J, (1995) Expression of a renal Na/Pi cotransporter (NaPi-1) in MDCK and LLC-PK1 cells. *Pflügers Arch* 430:132-136.

Rasmussen H, Tenenhouse HS (1995) Mendelian hypophosphatemias. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw Hill Book Co, New York, 3717-3745.

Rawlings ND, Barrett AJ (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205-218.

- Rawlings ND, Barrett AJ (1995) Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 248:183-228.
- Richards AM, Wittert G, Espiner EA, Yandle TG, Frampton C, Ikram H (1991) EC 24.11 inhibition in man alters clearance of atrial natriuretic peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1317-1322.
- Richards AM, Crozier IG, Kosoglou T, Rallings M, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG, Ikram H, Frampton C (1993) Endopeptidase 24.11 inhibition by SCH 42495 in essential hypertension. *Hypertension* 22:119-126.
- Rifas L, Cheng S, Halstead LR, Gupta A, Hruska KA, Avioli LV (1997) Skeletal casein kinase activity defect in the Hyp mouse. *Calcif Tissue Int* 61:256-259.
- Rifas L, Gupta A, Hruska KA, Avioli LV (1995) Altered osteoblast gluconeogenesis in X-linked hypophosphatemic mice is associated with a depressed intracellular pH. *Calcif Tissue Int* 57:60-63.
- Rodan GA, Martin TJ (1981) Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 33:349-351.
- Roques BP, Fournié-Zaluski MC, Soroica E, Lecomte JM, Malfroy B, Llorens C, Schwartz JC (1980) The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature* 288:286-288.
- Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A (1993) Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45:87-146.
- Rosen H, Krichevsky A, Bar-Shavit Z (1998) The enkephalinergic osteoblast. *J Bone Miner Res* 13:1515-1520.
- Rouffet J, Barlet JP (1995) Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and bone metabolism. *Arch Physiol Biochem* 103:3-13.
- Rowe PSN (1994) Molecular biology of hypophosphatemic rickets and oncogenic osteomalacia. *Human Genetics* 94:457-467.
- Rowe PSN, Ong ACM, Cockerill FJ, Goulding JN, Hewison M, (1996) Candidate 56 and 58 kDa protein (s) responsible for mediating the renal defects in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia. *Bone* 18:159-169.
- Rowe PS, Oudet CL, Francis F, Sinding C, Pannetier S, Econs MJ, Strom TM,

- Meitinger T, Garabedian M, David A, Macher MA, Questiaux E, Popowska E, Pronicka E, Read AP, Mokrzycki A, Glorieux FH, Drezner MK, Hanauer A, Levrach H, Goulding JN, O'Riordan JL (1997) Distribution of mutations in the PEX gene in families with X-linked hypophosphataemic rickets (HYP). *Hum Mol Genet* 6:539-549.
- Roy S, Martel J, Ma S, Tenenhouse HS (1994) Increased renal 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase messenger ribonucleic acid and immunoreactive protein in phosphate-deprived *Hyp* mice. A mechanism for accelerated 1,25-dihydroxyvitamin D₃ catabolism in X-linked hypophosphatemic rickets. *Endocrinology* 134:1761-1767.
- Roy S, Tenenhouse HS (1996) Transcriptional regulation and renal localization of 1-25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase gene expression. Effects of the *Hyp* mutation and 1,25-hydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 137:2938-2946.
- Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G (1998) Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* 46:459-468.
- Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Ellefsen K, Basak A, Aubin JE, Crine P, Boileau G (2000) Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides. *J Bone and Miner Res*. In Press.
- Ruchon AF, Tenenhouse HS, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Aubin JE, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G (2000) Developmental Expression and Tissue Distribution of Phex Protein: Effect of the *Hyp* Mutation and Relationship to Bone Markers. *J Bone Miner Res*. In Press.
- Ruskoaho R (1992) Atrial natriuretic peptide: synthesis, release and metabolism. *Pharmacol Rev* 44:479-602.
- Ryan EA, Reiss E (1984) Oncogenous osteomalacia. Review of the world literature of 42 cases and report of two new cases. *Am J Med* 77:501-512.
- Sagnella GA, Markandu ND, Buckley MG, Miller MA, Blackwood A, Singer DR, MacGregor GA (1995) Hormonal and renal responses to neutral endopeptidase inhibition in normal humans on a low and a high sodium intake. *Eur J Clin Invest* 25 :165-170.

- Sales N, Dutriez I, Maziere B, Ottaviani M, Roques BP (1991) Neutral endopeptidase 24.11 in rat peripheral tissues: comparative localization by *ex vivo* and *in vitro* autoradiography. *Regul Pept* 33:209-222.
- Salo J, Lehenkari P, Metsikko K, Väänänen HK (1997) Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 276:270-273.
- Schapira D, Benizhak O, Nachtigal A, Burstein A, Barshalom R, Shagrawi I, Best LA (1995) Tumor-induced osteomalacia. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 25: 35-46.
- Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, Benfenati F, Tauc L, Montecucco C (1992) Tetanus is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc. *EMBO J* 11:3577-3583.
- Schirmmayer K, Schmitz I, Winterhager E, et al. (1992) Characterization of gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif Tissue Int* 51:285-290.
- Seshadi MS, Cornich CJ, Mason RS, Posen S (1985) Parathyroid hormone-like bioactivity in tumors for patients with oncogenic osteomalacia. *Clinical Endocrinology* 23:689-697
- Seymour AA, Asaad MM, Lanoce VM, Langenbacker KM, Fennell SA, Rogers WL (1993) Systemic hemodynamics, renal function and hormonal levels during inhibition of neutral endopeptidase 3.4.24.11 and angiotensin-converting enzyme in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 266:263-270.
- Seymour AA, Asaad MM, Lanoce VM, Fennell SA, Cheung HS, Rogers WL (1996) Inhibition of neutral endopeptidase 3.4.24.11 in conscious dogs with pacing induced heart failure. *Cardiovasc Res* 27:1015-1023.
- Shields ED, Sriver CR, Reade T, Fujiwara TM, Morgan K, Chiampi A, Schwartz S (1990) X-linked hypophosphatemia: The mutant gene is expressed in teeth as well as in kidney. *Am J Hum Genet* 46:434.
- Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL (1991) CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyses bombesin-

- like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10662-10666.
- Shipp MA, Look AT (1993) Haematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood* 84: 1052-1070.
- Singer DRJ, Markandu ND, Burckley MG, Miller MA, Sagnella GA, MacGregor GA (1991) Dietary sodium and inhibition of neutral endopeptidase 24.11 in essential hypertension. *Hypertension* 18:798-804.
- Sorribas V, Markovich D, Hayes G, Stange G, Forgo J, Biber J, Murer H (1994) Cloning of a Na/Pi cotransporter from opossum kidney cells. *J boil Chem* 269:6615-6621.
- Stephenson SL, Kenny AJ (1987a) Metabolism of neuropeptides. Hydrolysis of the angiotensins, bradykinin, substance P and oxytocin by pig kidney microvillar membranes. *Biochem J* 241:237-247.
- Stephenson SL, Kenny AJ (1987b) The hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase 24.11. *Biochem J* 243:183-187.
- Strom TM, Francis F, Lorenz B, Böddrich A, Econs MJ, Lehrach H, Meitinger T (1997) Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* 6:165-171.
- Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N (1997) Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 12:869-879.
- Suda T, Takahashi N, Martin TJ (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 13:66-80.
- Sunday ME, Hua J, Torday JS, Reyes B, Shipp MA (1992) CD10/Neutral Endopeptidase 24.11 in developing human fetal lung. *J Clin Invest* 90:2517-2525.
- Tam L-T, Engelbrecht S, Talent JM, Gracy RW, Erdös (1985) The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* 133:1187-1192.
- Tenenhouse HS (1999) X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant* 14:333-341.

- Tenenhouse HS, Roy S, Martel J, Gauthier C (1998) Differential expression, abundance and regulation of Na⁺-phosphate cotransporter genes in murine kidney. *Am J Physiol* 44:F527-F534.
- Tenenhouse HS, Beck L (1996) Renal Na⁺-phosphate cotransporter gene expression in X-linked *Hyp* and *Gy* mice. *Kidney Int* 49:1027-1032.
- Tenenhouse HS, Werner A, Biber J et al. (1994) Renal Na⁺-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. *J Clin Invest* 93:671-676.
- Tenenhouse HS, Jones G (1990) Abnormal regulation of renal vitamin D catabolism by dietary phosphate in murine X-linked hypophosphatemic rickets. *J Clin Invest* 85:1450-1455.
- Tenenhouse HS, Klugerman AH, Neal JL (1989) Effect of phosphonoformic acid, dietary phosphate and the *Hyp* mutation on kinetically distinct phosphate transport processes in mouse kidney. *Biochim Biophys Acta* 984:207-213.
- Tenenhouse HS (1984) Investigation of the mechanism for abnormal renal 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase activity in the X-linked *Hyp* mouse. *Endocrinology* 115:634-639.
- Tenenhouse HS (1983) Abnormal renal mitochondrial 25-hydroxy-vitamin D₃-1-hydroxylase activity in the vitamin D and calcium deficient X-linked *Hyp* mouse. *Endocrinology* 113:816-818.
- Tenenhouse HS, Scriver CR, McInnes RR, Glorieux FH (1978) Renal handling of phosphate *in vivo* and *in vitro* by the X-linked hypophosphatemic male mice. Evidence for a defect in the brush border membrane. *Kidney Int* 14:236-244.
- The HYP Consortium (1995) A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 11:130-136.
- Tieder M, Modai D, Samuel R, Arie R, Halabe A, Bab I, Gabizon D, Lieberman UA (1985) Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *N Engl J Med* 312:611.
- Tieder M, Modai D, Shaked U, Samuel R, Arie R, Halabe A, Maor J, Weissgarten J, Averbukh Z, Cohen N, Edelstein S, Lieberman UA (1987) Idiopathic

hypercalciuria and hereditary hypophosphatemic rickets. *N Engl J Med* 316:125.

- Trippodo NC, Gabel RA, Harvey CM, Assad MM, Rogers WL (1991) Heart failure augments the cardiovascular and renal effects of neutral endopeptidase inhibition in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 18:308-316.
- Turner AJ (1987) Endopeptidase 24.11 and neuropeptide metabolism. *Neuropeptides and their peptidases* (Turner, AJ, ed) pp.183-201, Ellis-Horwood, Chichester.
- Turner AJ, Matsas R, Kenny AJ (1985) Are there neuropeptide-specific peptidases? *Biochem Pharmacol* 34:1347-1356.
- Turner AJ (1997) Neuropeptide inactivation in the central nervous system. In *Cell-surface peptidases in Health and disease*. Kenny AJ, Boustead CM, eds. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK, pp 275-301.
- Turner AJ, Tanzawa K (1997) Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J* 11:355-364.
- Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ et Suda T (1990) Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7260.
- Valdenaire O, Richards JG, Faull RLM, Schweizer A (1999) XCE, a new member of the endothelin-converting enzyme and neutral endopeptidase family, is preferentially expressed in the CNS. *Mol Brain Res* 64:211-221.
- Van der Rest M, de Miguel E, Glorieux FH (1981) The collagen crosslinking in the hypophosphatemic male mouse. *Calcif Tissue Int* 33:77-79.
- Van Zeijl M, Johann SV, Closs E, Cunningham J, Eddy R, Shows TB, O'Hara B (1994) A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc natn Acad Sci USA* 91:1168-1172.
- Verri T, Markovich D, Perego C, Norbis F, Stange G, Sorribas V, Biber J, Murer H (1995) Cloning of a rabbit renal Na-Pi cotransporter, which is regulated by dietary phosphate. *Am J Physiol* 268:F626-F633.

- Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersh LB (1990) The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *J Biol Chem* 265:14150-14155.
- Vuorio E, de Crombrughe B (1990) The family of collagen genes. *Annu Rev Biochem* 59:837-872.
- Waksman G, Hamel E, Bouboutou R, Besselievre R, Fournié-Zaluski MC, Roques BP (1984) Distribution regionale de l'enkephalinase dans le cerveau du rat par autoradiographie. *C.R. Acad. Sci. Paris, series III* 299:613-616.
- Waksman G, Bouboutou R, Delvin J, Besselievre R, Fournié-Zaluski MC, Roques BP (1985) Binding of the bidentate inhibitor [³H]HACBO-Gly to the rat brain neutral endopeptidase enkephalinase. *Biochem Biophys Res Commun* 131:262-268.
- Waksman G, Hamel E, Fournié-Zaluski MC, Roques BP (1986) Autoradiographic comparison of the distribution of the neutral endopeptidase enkephalinase and mu and delta opioid receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 33:1523-1527.
- Waksman G, Hamel E, Delay-Goyer P, Roques BP (1987) Neutral endopeptidase 24.11, μ and δ opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study. *Brain Res.* 486:205-216.
- Walker JJ, Yan TS, Quamme GA (1987) Presence of multiple sodium-dependent phosphate transport processes in proximal brush-border membrane. *Am J Physiol* 252:F226-F231.
- Wang L, Lisheng D, Ecarot B (1999) Evidence for *Phex* haploinsufficiency in murine X-linked hypophosphatemia. *Mamm Genome* 10:385-389.
- Weidner N, Santa Cruz D (1987) Phosphaturic mesenchymal tumors. A polymorphous group causing osteomalacia or rickets. *Cancer* 59:1442-1454.
- Weidner N (1991) Review and update: oncogenic osteomalacia-rickets. *Ultrastructural Pathology* 15:317-333.
- Weiss D, Bar RS, Weidner N, Wener M, Lee F (1985) Oncogenic osteomalacia: strange tumors in strange places. *Post-graduate Medical Journal* 61:349-355.
- Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H (1986)

- Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Biochemistry* 83:7182-7186.
- Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb R, Kadesch T, Harris H (1988) Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 253:12002-12010.
- Werner A, Moore ML, Mantel N, Biber J, Semenza G, Murer H (1991) Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex. *Proc natn Acad Sci USA* 88:9608-9612.
- Werner A, Murer H, Kinne RK (1994) Cloning and expression of a renal Na/Pi cotransport system from flounder. *Am J Physiol* 267:F311-F317.
- Werner A, Dehmelt L, Nalbant P (1998) Na⁺-dependent phosphate cotransporters: the NaPi protein families. *J Exp Biol* 201:3135-3142.
- White TD et Folkens PA (1991) Human Osteology. Academic Press Inc., San Diego, California, USA.
- Whyte MP (1994) Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine Rev* 15(4):439-461.
- Wilkins GE, Granleese S, Hegele RG, Holden J, Anderson DW, Bondy GP (1995) Oncogenic osteomalacia: evidence for a humoral phosphaturic factor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80:1628-1634.
- Wilkins MR, Kenny AJ (1997) Natriuretic peptide metabolism: inhibitors of endopeptidase 24.11 as possible therapeutic agents for cardiovascular disease. In *Cell-surface peptidases in Health and disease*. Kenny AJ, Boustead CM, eds. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK, pp 303-322.
- Wuthier RE et Register TC (1985) Role of alkaline phosphatase, a polyfunctional enzyme, in mineralizing tissues. In: Butler WT, ed. *The chemistry and biology of mineralized tissues*. Birmingham, AL: Ebsco Media, pp113-124.
- Xiao ZS, Crenshaw M, Guo R, Nesbitt T, Drezner MK, Quarles LD (1998) Intrinsic mineralization defect in *Hyp* mouse osteoblasts. *Am J Physiol* 275:E700-E708.
- Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, Yanagisawa M (1994) ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that characterizes the proteolytic

activation of big endothelin-1. *Cell* 78:473-485.

- Yamaguchi DT, Defang M, Lee A, et al. (1994) Isolation and characterization of gap junctions in the osteoblast MC3T3-E1 cell line. *J Bone Miner Res* 9:791-803.
- Yoshikawa H, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Tanaka H, Seino Y (1985) Abnormal bone formation induced by implantation of osteosarcoma-derived bone-inducing substance in the X-linked hypophosphatemic mouse. *Bone* 6:235-239.
- Young MR, Ibaraki K, Kerr JM, Heegaard A-M (1993) Molecular and cellular biology of the major non-collagenous proteins in bone. In: Noda M, ed. *Cellular and molecular biology of bone*. New York: Academic Press, pp191-234.
- Zajac JM, Charnay Y, Soleilhac JM, Sales N, Roques BP (1987) Enkephalin-degrading enzymes and angiotensin-converting enzyme in human and rat meninges. *FEBS Lett* 216:118-122.
- Zhang XX, Tenenhouse HS, Hewson AS, Murer H, Eydoux P (1997) Assignment of renal-specific Na-phosphate cotransporter gene *Slc17a2* to a mouse chromosome band 13B by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 77:304-305.