

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE LA CYTOTOXICITÉ ET DE L'ACCUMULATION DU
CADMIUM DANS DIFFÉRENTES LIGNÉES OSTÉOBLASTIQUES HUMAINES
ET MURINES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

CORINE MARTINEAU

JUIN 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Le squelette a longtemps été perçu comme un simple support mécanique de l'organisme. En réalité, c'est un tissu dynamique ayant nécessité des millions d'années d'évolution pour former une structure à la fois solide et mobile, et occupant des fonctions essentielles chez les Vertébrés. Cet organe est souvent considéré comme une cible secondaire dans les études d'ordre toxicologique et pharmacologique; or, cette assumption pourrait avoir des conséquences néfastes, notamment en ce qui concerne le métabolisme d'agents toxiques interagissant directement avec lui. Cette étude a donc été motivée par un désir de démystifier l'os en tant que cible directe de polluants environnementaux auxquels nous sommes constamment exposés, en l'occurrence le cadmium.

L'introduction de ce travail se veut avant tout descriptive, d'abord en démontrant le dynamisme du métabolisme osseux par la présentation de ses composantes et de leurs fonctions. Ensuite, les propriétés du cadmium sont discutées afin de familiariser le lecteur avec ses sources, sa biodisponibilité et son potentiel toxique. Le premier chapitre aborde les hypothèses de travail émises en lumière des informations connues concernant le potentiel toxique du cadmium sur le métabolisme osseux, ainsi que les objectifs d'études et méthodologiques découlant de ces idées. Toutes les informations nécessaires à la bonne compréhension du cœur de ce mémoire sont donc incluses dans l'introduction sous la forme d'une revue littéraire ciblée, ainsi que dans les annexes A et B, respectivement l'affiche présentée lors du congrès de l'IBMS en 2007 ainsi que des résultats supplémentaires.

En guise de développement, mes résultats expérimentaux sont présentés sous la forme de deux articles scientifiques rédigés en anglais, suivis d'une discussion générale en français de leurs faits saillants et perspectives. Le premier article compare différentes lignées ostéoblastiques entre elles en terme de potentiel d'accumulation et

de sensibilité au cadmium; le second concerne l'impact de la différenciation ostéoblastique sur la toxicité et l'accumulation du cadmium dans un modèle murin de cellules ostéoblastiques. Ces deux sections démontrent l'interaction directe entre les cellules formant le squelette et cet élément toxique qu'est le cadmium. Le dernier chapitre tisse des liens entre les deux articles et met en relief les conclusions et perspectives découlant des résultats analysés, le tout dans un contexte critique. Les articles y sont discutés en fonction de leurs limites et applications potentielles dans un contexte de physiologie osseuse; leurs traits communs et leurs particularités sont également explorés.

En dernier lieu, je tiens à remercier les gens sans qui cette étude aurait été impossible : les Dr. Robert Moreau, PhD, et Catherine Jumarie, PhD, mes directeur et co-directrice, qui m'ont fourni tout le matériel nécessaire et m'ont guidé dans mes recherches; mes collègues Élie Abed, Mathieu Brodeur et Dominique Labelle, étudiants Ph.D, Patrick Hamel, étudiant M.Sc, et Marc Mantha, étudiant B.Sc, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler et d'échanger des idées; finalement, Guillaume Médina et Lee-Ann Jomphe, deux stagiaires au B.Sc que j'ai vu évoluer et qui m'ont fourni une précieuse main-d'œuvre au cours de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
LISTE DES SYMBOLES	xii
RÉSUMÉ	xiii
INTRODUCTION.	
LE SQUELETTE ET LE CADMIUM	1
Le système squelettique	1
<i>Composantes du tissu osseux</i>	3
<i>Le remodelage osseux</i>	4
<i>La différenciation ostéoblastique</i>	7
Pathologies du système osseux	10
<i>L'ostéoporose</i>	10
<i>La maladie Itai-Itai</i>	11
Le cadmium	12
<i>Propriétés physico-chimiques et voies d'exposition</i>	13
<i>Cytotoxicité et accumulation cellulaire du Cd</i>	14
<i>Mécanismes cellulaires de défense</i>	15
CHAPITRE I.	
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	17
1.1 Les OB sont une cible du Cd	18
1.1.1 Accumulation cellulaire du Cd dans les OB	18
1.1.2 Cytotoxicité du Cd sur les OB	18
1.2 La différenciation affecte la sensibilité des cellules ostéoblastiques au Cd	19
1.2.1 Modèle <i>in vitro</i> de différenciation ostéoblastique	19

1.2.2	La sensibilité au Cd en fonction de la maturité ostéoblastique	20
1.3	Les VDCC et les TRP sont des voies d'entrée du Cd dans les OB	20
1.3.1	Les canaux calciques voltage-dépendants (VDCC)	21
1.3.2	Les canaux transient receptor potential (TRP)	22
1.3.3	Expression des canaux suspectés	24
1.4	Modèles cellulaires à l'étude	24
1.4.1	Les cellules MC3T3-E1 sous-clone 4	24
1.4.2	Les cellules MG 63	25
1.4.3	Les cellules U2 OS	25
CHAPITRE II.		
PRÉSENTATION DES RÉSULTATS SOUS FORME D'ARTICLES		26
2.1	Premier article: CADMIUM UPTAKE AND CYTOTOXICITY IN VARIOUS OSTEOBLAST-LIKE CELL LINES	26
2.2	Deuxième article: IMPACT OF OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION OF MC3T3-E1 CELLS ON CADMIUM UPTAKE AND CYTOTOXICITY	56
CHAPITRE III.		
DISCUSSION GÉNÉRALE		93
3.1	Impacts <i>in vitro</i> du Cd sur les cellules ostéoblastiques et ses effets possibles sur le métabolisme osseux	93
3.2	Adsorption du Cd sur l'ECM osseuse	95
3.3	Impacts du Ca et du Mg sur la cytotoxicité du Cd dans les cellules ostéoblastiques	96
3.4	Voies d'entrée du Cd dans les cellules ostéoblastiques	98
3.5	Prévention et traitement de l'ostéoporose induite par le Cd	100
Conclusion		102
APPENDICE A		
Affiche IBMS 2007		103

APPENDICE B	
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	104
BIBLIOGRAPHIE	108

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Introduction	
Fig.1 : Organisation du tissu osseux	2
Fig.2 : Les différentes étapes du remodelage	5
Fig.3 : La différenciation ostéoblastique	8
Fig.4 : Diminution de la densité osseuse lors de l'ostéoporose	11
Chapitre I	
Fig.5 : Structure des canaux VDCC	22
Fig.6 : Structure des canaux de type TRP	23
Chapitre II	
<i>Premier article</i>	
Fig.1: LC ₅₀ values determination in three osteoblast-like cell lines exposed to Cd	50
Fig.2: Impact of Ca and Mg transporters in Cd uptake and cytotoxicity in osteoblast-like cell lines	51
Fig.3: Impact of potassium-induced membrane depolarisation in uptake and Cd cytotoxicity in osteoblast-like cell lines	52
Fig.4: Impact of TG and SKF on Cd cytotoxicity and accumulation in osteoblast-like cell lines	53
Fig.5: Impact of 2-APB on Cd cytotoxicity and accumulation in osteoblast-like cell lines	54

Fig.6: Gene expression of TRPM and TRPV channels in the 3 cell lines studied	55
<i>Deuxième article</i>	
Fig.1: Characterization of Cd accumulation and cytotoxicity	84
Fig.2: Effect of calcium on Cd uptake and cytotoxicity	85
Fig.3: Effect of depolarisation conditions on Cd uptake and cytotoxicity	86
Fig.4: Effect of magnesium on Cd cytotoxicity and uptake	87
Fig.5: Establishment of an <i>in vitro</i> osteoblastic differentiation model	88
Fig.6: Impact of <i>in vitro</i> differentiation treatment on Cd cytotoxicity and uptake	89
Fig.7: Ca and Cd accumulation profiles in immature and differentiated cells	90
Fig.8: Effect of Ca or Mg on Cd cytotoxicity and uptake in differentiated cells	91
Fig.9: Impact of VDCC activation on Cd uptake by differentiated cells	92
Annexe A	
Affiche IBMS 2007	103
Annexe B	
Fig.1: Dose-response curves of three osteoblast-like cell lines exposed to Cd and impact of differentiation treatment LC ₅₀ values of MC3T3 cells	104
Fig.2: Impact of differentiation on TRPM channel gene expression	105

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Chapitre II	
<i>Premier article</i>	
Tab.I : Description of specific primers used for PCR amplification of selected TRP genes in mouse (m) and human (h) cells	34
Annexe B	
Tab.I: Gene expression of TRPC and TRPV channels in osteoblasts	106
Tab.II: Gene expression of TRPM channels in osteoblasts	107

LISTE DES ABRÉVIATIONS, ACRONYMES ET SIGLES

AA :	Acide Ascorbique
ALP:	Phosphatase Alcaline
ARN :	Acide ribonucléique
ATCC:	American Type Culture Collection
ATSDR :	Agence pour le Registre des Substances Toxiques et des Maladies
2-APB:	2-AminoEthoxydiphényl Borate
BMU:	Unité multicellulaire de base
BSP:	Sialoprotéine osseuse
Ca:	Calcium
CaCl ₂ :	Chlorure de calcium
Ca(NO ₃) ₂ :	Nitrate de calcium
Cd:	Cadmium
CdCl ₂ :	Chlorure de cadmium
Cd(NO ₃) ₂ :	Nitrate de cadmium
Col I:	Collagène de type I
G-2-P:	Glycérol-2-Phosphate
INERIS :	Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques
MAPK:	Kinase activé par des mitogènes
Mg:	Magnésium
MPC:	Précurseurs mésenchymaux
OB:	Ostéoblaste
OC:	Ostéoclaste
OCN :	Ostéocalcine
OPN :	Ostéopontine
OPG :	Ostéoprotégérine
RANK:	Receptor-Activated NFκB
RANKL:	Ligand du Receptor-Activated NFκB
RT-PCR:	Transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne
TG:	Thapsigargine
TRP:	Transient Receptor Potential
TRPC:	Canonical Transient Receptor Potential

TRPM:	Melastatin-related Transient Receptor Potential
TRPV:	Vanilloid-related Transient Receptor Potential
USEPA:	Agence de la Protection Environnementale des États-Unis
VDCC:	Canaux calciques dépendants du voltage

LISTE DES SYMBOLES

Å = Angstrom = 0.01 nanomètre = 10^{-11} mètre

Bq = Bequerel = 0,027 Ci

KBq = KiloBequerel = 10^3 Bequerels

Ci = Curie = 2 220 000 DPM

mCi = milliCurie = 10^{-3} Curie

µCi = microCurie = 10^{-6} Curie

DPM = Désintégrations Par Minute

g = gramme

mg = milligramme = 10^{-3} gramme

µg = microgramme = 10^{-6} gramme

L = litre = 1 dm³ H₂O à 20°C

mL = millilitre = 10^{-3} litre

µL = microlitre = 10^{-6} litre

mol = mole = $6,023 \times 10^{23}$ molécules

mmol = millimole = 10^{-3} mole

µmol = micromole = 10^{-6} mole

nmol = nanomole = 10^{-9} mole

pmol = picomole = 10^{-12} mole

M = molaire = 1 mol/Litre

mM = millimolaire = 10^{-3} molaire

µM = micromolaire = 10^{-6} molaire

nM = nanomolaire = 10^{-9} molaire

RÉSUMÉ

Introduction. Le métabolisme osseux se résume à l'action des ostéoclastes résorbant le tissu osseux et des ostéoblastes formant l'os. Des études épidémiologiques associent l'exposition au Cd à un risque accru de développer l'ostéoporose. En plus des effets néphrotoxiques perturbant le métabolisme de la vitamine D et altérant indirectement le métabolisme osseux, le Cd semble exercer une toxicité sur les cellules osseuses, altérant donc le squelette par des mécanismes directs.

Objectifs. Les buts de cette étude étaient de caractériser la cytotoxicité et l'accumulation cellulaire du Cd dans un modèle *in vitro* de différenciation ostéoblastique, ainsi que de comparer la sensibilité au Cd de plusieurs lignées cellulaires au phénotype ostéoblastique.

Méthodologie. Des essais de cytotoxicité et d'accumulation cellulaire ont été effectués sur la lignée ostéoblastique murine MC3T3-E1, ainsi que sur les lignées ostéoblastiques humaines MG 63 et U2 OS. Un modèle de différenciation a été obtenu en traitant les MC3T3 avec de l'acide ascorbique et du glycérol-2-phosphate. Une approche pharmacologique a été utilisée afin de cerner les voies d'entrée du Cd dans ces cellules. L'expression des canaux membranaires de type TRPM et TRPV, des candidats comme voie d'entrée du Cd dans les ostéoblastes, a été vérifiée dans les 3 lignées par RT-PCR.

Résultats. Sur 3 minutes, les cellules MC3T3 accumulent plus de Cd que les cellules MG 63 et U2 OS. Par contre, l'accumulation sur 24h est supérieure dans les lignées humaines. La hausse du Ca extracellulaire diminue la cytotoxicité et le transport du Cd dans les MC3T3 immatures et les MG 63; le Mg a un impact semblable sur les 3 lignées. Un modulateur de canaux TRP, le 2-APB, protège significativement les MG 63 et les U2 OS contre le Cd, surtout en absence de Mg, mais demeure sans effet dans les MC3T3. La différenciation des MC3T3-E1 diminue la cytotoxicité et le transport du Cd.

Conclusion. La maturité ostéoblastique est un facteur important dans la sensibilité de ces cellules au Cd. L'effet différent du Ca et du Mg sur les 3 lignées suggère des mécanismes de transport calciques et magnésiques distincts perméables au Cd. Le 2-APB offrant une protection efficace dans les lignées humaines, certains canaux de la classe des TRPM sont soupçonnés d'être des voies d'entrée importantes pour le Cd dans les ostéoblastes humains, ainsi que des TRPV dans les ostéoblastes murins.

Mots-clefs : ostéoblaste – cadmium – cytotoxicité – accumulation cellulaire – calcium – magnésium

INTRODUCTION.

LE SQUELETTE ET LE CADMIUM

Le système squelettique

À l'exception des poissons cartilagineux, tous les Vertébrés ont en commun une structure squelettique minéralisée; l'os est un organe complexe dont l'anatomie présente plusieurs niveaux structuraux (Fig. 1). Ce tissu est également caractérisé par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) disposés parallèlement au sein d'une matrice protéique (Weiner et Traub 1992). En plus de fournir au corps structure et soutien, le squelette est un réservoir minéral préservant l'homéostasie de l'organisme (Calvo *et al* 1996) et opérant des fonctions vitales au niveau immunologique (Athanasou *et al* 1996) et neuromoteur (Kondo *et al* 2005, Hess *et al* 2004), notamment. Le tissu osseux comprend deux principales composantes : une matrice extracellulaire inerte, et des composantes cellulaires métaboliquement actives (Manolagas 2000, Raisz 1999). Quoique les cellules ne forment qu'une infime fraction du volume osseux, leurs fonctions sont essentielles au constant renouvellement de ce tissu (Manolagas 2000, Calvo *et al* 1996). Effectivement, l'équilibre entre la formation et la résorption osseuses, effectuées respectivement par les ostéoblastes (OB) et les ostéoclastes (OC), est un élément crucial dans le maintien de la santé des os (Canalis 2003, Manolagas 2000). Les cellules de la lignée ostéoblastique sont particulièrement importantes à cet effet, car non seulement elles

forment l'os, mais orchestrent également l'activité des OC (Manolagas 2000). Les OB proviennent de la différenciation ostéoblastique de précurseurs mésenchymaux (MPC) de la moelle osseuse; ce processus engendre des cellules gagnant progressivement en maturité tout en préservant la niche de cellules souches (Canalis 2003, Funato *et al* 2001). Les MPC s'engageant dans la voie ostéoblastique subissent une métamorphose caractérisable dans le temps par le biais de marqueurs, dont les plus utilisés sont l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) et le potentiel de minéralisation. Une fois à maturité, ces cellules accomplissent leurs principales fonctions que sont la synthèse et la minéralisation de la matrice osseuse (Wenstrup *et al* 1996).

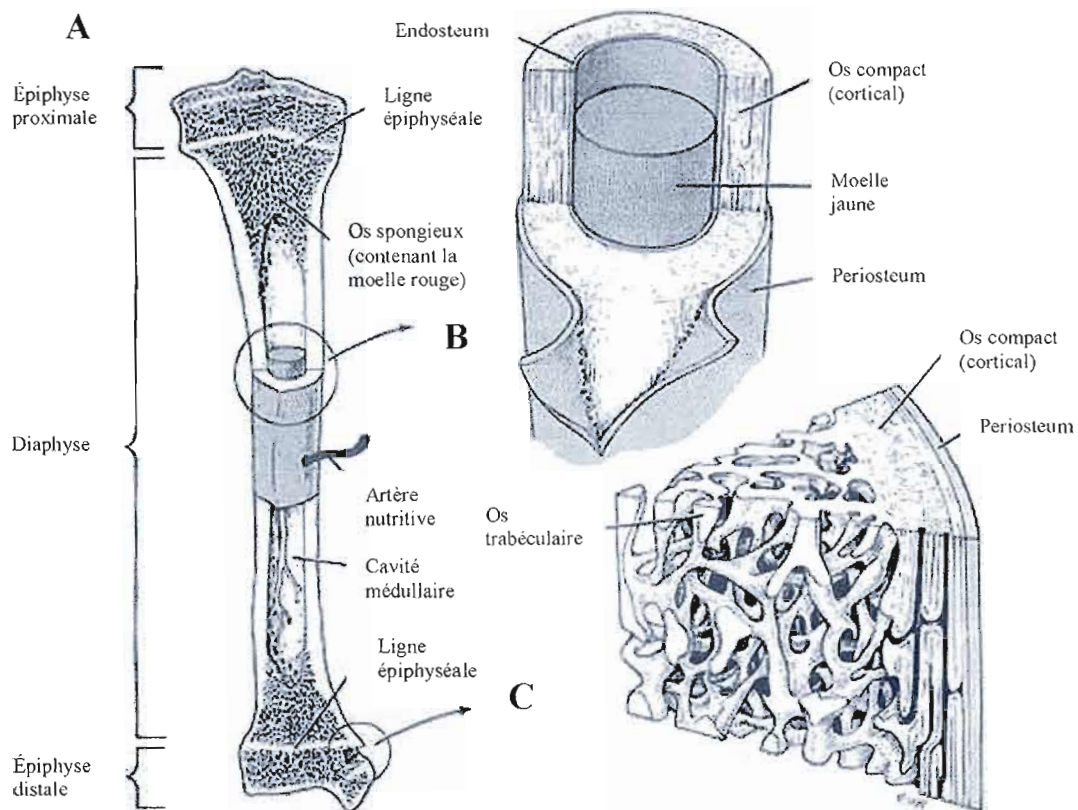


Figure 1 : Organisation du tissu osseux. A. Structure générale d'un os long (tibia). B. Grossissement de la diaphyse et organisation du cortex osseux. C. Grossissement de l'épiphyse et structure trabéculaire de l'os. Tiré de <http://pharyngula.org/images/bonefiles/bonestruct.jpg>.

Composantes du tissu osseux

L'os comporte une matrice rigide lui donnant sa forme et sa solidité. Cette matrice extracellulaire (ECM) osseuse est constituée en partie de minéraux inorganiques, mais également de constituants protéiques opérant chacun une fonction précise. Le collagène de type I (Col I), composant près de 90% de l'ECM osseuse (Kern *et al* 2001), sert de structure de soutien aux cristaux d'hydroxyapatite (Qin *et al* 2004). Le Col I est une glycoprotéine hétérodimérique résultant de l'addition séquentielle de résidus galactosyl à l'hydroxylysine (Stanford et Keller 1991). Le Col I sécrété par les OB semble différer de celui produit par d'autres types cellulaires, tels les fibroblastes, par l'absence de résidus glucosyl dans sa structure (Stanford et Keller 1991). Cet échafaudage complexe crée une surface régulatrice et structurale permettant la liaison de divers facteurs ainsi que l'attachement, la prolifération et la migration des cellules (Stanford et Keller 1991). Des expériences démontrent que l'action paracrine du Col I est essentielle à la différenciation des OB (Wenstrup *et al* 1996). L'ECM osseuse comprend également 10% de protéines non collagéniques (Stanford et Keller 1991). Parmi celles-ci, on retrouve l'ostéopontine (OPN), qui ralentit la nucléation, la croissance et l'agrégation des cristaux d'hydroxyapatite (Mazzali *et al* 2002), et la sialoprotéine osseuse (BSP) qui stimule la nucléation des cristaux, puis en dirige la croissance sur la matrice collagénique (Qin *et al* 2004). La ALP, une enzyme zinc (Zn)-dépendante responsable de l'hydrolyse des groupements phosphate-esters, fournit le phosphate inorganique nécessaire à la minéralisation (Kim *et al* 2004). L'ostéocalcine (OCN) est une protéine non-collagénique de 5.7 kDa dont le rôle exact dans la minéralisation demeure méconnu (Jiang *et al* 2004). Outre ces 5 protéines majeures de l'ECM osseuse, il existe une variété d'autres composantes mineures dont le rôle reste à déterminer, telles que la vitronectine, la fibronectine, les protéoglycanes et l'ostéonectine (Stanford et Keller 1991, Heinegard et Oldberg 1989).

De nombreux types cellulaires existent au sein de l'os; la moelle comprend l'ensemble des précurseurs hématopoïétiques et mésenchymaux de l'organisme (Minguell *et al* 2001). Cependant, deux lignées sont d'une importance particulière dans la formation et le renouvellement de ce tissu : les cellules ostéoblastiques et les cellules ostéoclastiques (Manolagas 2000, Raisz 1999). Les activités respectives et la communication entre ces deux lignées sont essentielles au maintien d'un os en santé (Manolagas 2000). Les OB sont des fibroblastes hautement spécialisés dans la sécrétion et la minéralisation de l'ECM (Ross et Christiano 2006). Quoique leur phénotype s'apparente à celui des fibroblastes lorsqu'ils sont immatures, leur différenciation change leur aspect et ils adoptent une forme cuboïde lorsqu'ils atteignent la maturité (Liu *et al* 2003). Une fois enfouis dans la matrice osseuse, ils prennent un aspect caractéristiquement étoilé, avec diverses projections filiformes rappelant les neurones; ils sont alors désignés « ostéocytes » (Manolagas 2000). Quant aux OC, ils sont plutôt apparentés aux cellules hématopoïétiques desquelles ils proviennent (Athanasou *et al* 1996). Ce sont de grosses cellules multinucléées comportant une bordure en brosse qui leur est propre. Ces cellules sont spécialisées dans la dégradation de l'os auquel elles se fixent du côté de leur bordure (Janssens et Van Hul 2002). C'est par cette structure que sont sécrétées les protéinases nécessaires à la dissolution de l'ECM à résorber; les fragments résultants sont par la suite rejetés du côté opposé selon un transport transcellulaire (Calvo *et al* 1996).

Le remodelage osseux

Le remodelage osseux comporte une séquence d'évènements complexes et étroitement contrôlés par nombre d'hormones et de facteurs paracrines (Raisz 1999) (Fig.2); il est défini comme un renouvellement périodique de l'os chez les Vertébrés adultes. Ce remodelage est gouverné par l'activité des OC résorbant la matrice vieillie ou endommagée et des OB synthétisant la matrice osseuse (Calvo *et al* 1996). Ces cellules font partie d'une structure temporaire, l'unité multicellulaire

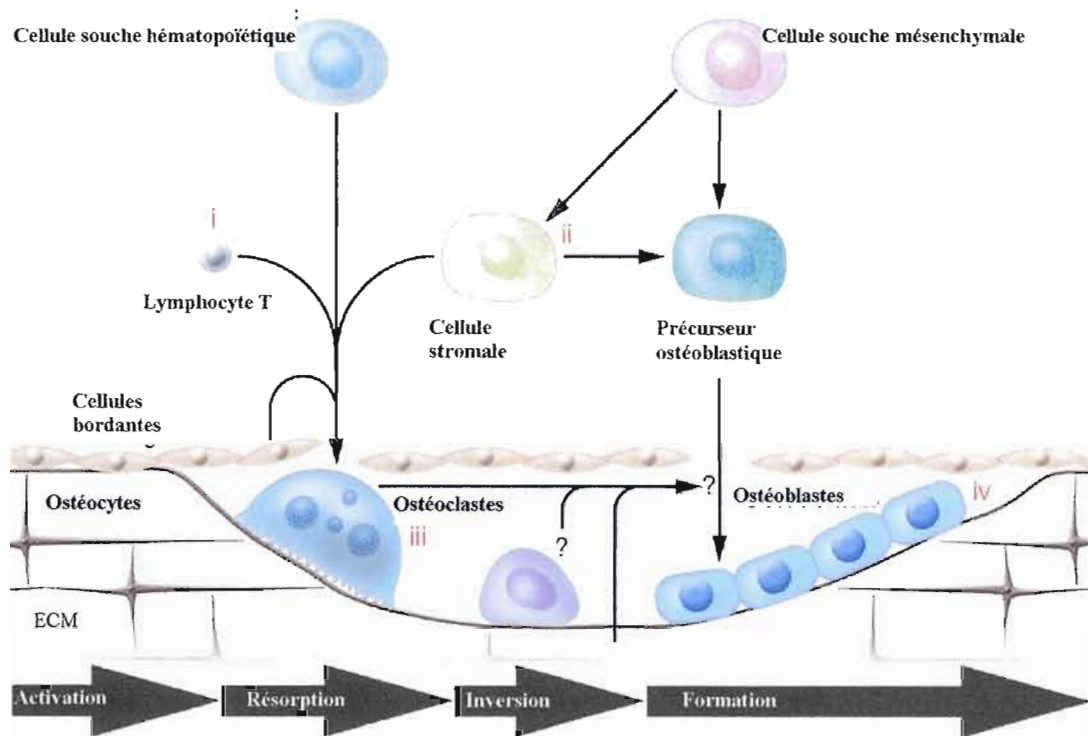


Figure 2 : Les différentes étapes du remodelage. (i) Activation et recrutement des précurseurs ostéoclastiques par les lymphocytes T, les cellules stromales et les cellules bordantes; (ii) Activation et recrutement des précurseurs ostéoblastiques par les cellules stromales et les ostéoclastes; (iii) Résorption osseuse; (iv) Formation osseuse. Les flèches marquées d'un point d'interrogation indiquent que certaines interactions cellulaires sont encore méconnues. Tiré de Raisz 2005.

de base (BMU). Ces BMU sont une organisation spatio-temporelle opérant le modelage/remodelage osseux; elles comprennent une équipe d'OB, un groupe d'OC, un capillaire vasculaire central, une innervation et les tissus conjonctifs associés (Manolagas 2000). Chez un adulte en santé, 3 à 4 millions de BMU sont initiées par année et 1 million opèrent à chaque instant. Ces unités persistent de 6 à 9 mois, évoluent à 25 $\mu\text{m}/\text{jour}$ et remplacent environ 0.025 mm^3 d'os dans leur existence. Ces structures sont d'environ 1.2 mm par 0.2-0.4 mm; c'est dans celles-ci que les OB et OC exercent leurs fonctions respectives (Manolagas 2000). Les BMU ont une origine, soit leur formation spatio-temporelle, une progression, c'est-à-dire une

évolution vers une cible à remodeler, ainsi qu'une terminaison se soldant en dissolution par apoptose ou différenciation de leurs composants cellulaires (Manolagas 2000). La formation et l'activité des BMU sont principalement modulés par deux hormones du système homéostatique du calcium (Ca), soit l'hormone parathyroïdienne (PTH) et la 1,25-dihydrovitamine D₃ (1,25-(OH)₂D₃). Effectivement, lorsque les niveaux sériques de Ca sont bas, la glande parathyroïde augmente sa sécrétion de PTH qui stimule la 1 α -hydroxylase au niveau des tubules proximaux rénaux (Toromanoff *et al* 1997). La PTH permet ainsi l'activation de la vitamine D, ce qui augmente la réabsorption rénale de Ca et rehausse l'absorption intestinale de Ca et de phosphore (P) (Demiralp *et al* 2002). La PTH et la 1,25-(OH)₂D₃ provoquent une hausse de l'ostéoclastogenèse, et donc de la résorption osseuse ainsi que la libération de Ca dans la circulation sanguine.

Les OC sont des cellules multinucléées provenant de la fusion de précurseurs hématopoïétiques de la lignée des monocytes/macrophages, sous le contrôle du microenvironnement osseux (Li *et al* 2002, Shin *et al* 1995). Les MPC sont à l'origine des cellules stromales, essentielles au microenvironnement de la moelle osseuse; celles-ci sont en contact étroit avec les cellules souches hématopoïétiques (HSC), dont les CD34⁺ donnant naissance aux OC (Mbalaviele *et al* 1999). Quoique les mécanismes de cette transformation demeurent spéculatifs, il est démontré que les MPC induisent la différenciation ostéoclastique des HSC sans apport de facteurs de croissance, de cytokines ou d'hormones (Mbalaviele *et al* 1999). La fonction primaire des OC est la résorption de la matrice osseuse. D'abord, ces cellules se fixent à la surface de l'os au site de résorption, créant un microenvironnement hermétique très acide par l'action de pompes H⁺-ATPase, dissolvant les cristaux d'hydroxyapatite (Janssens et Van Hul 2002). Elles s'attaquent ensuite aux composants matriciels en sécrétant des collagénases, les cathepsines K, B et L, avec l'aide des métalloprotéinases synthétisées par les OB (Janssens et Van Hul 2002, Manolagas 2000). Une fois dégradés, les composants matriciels sont endocytosés par la bordure

en brosse des OC pour être transcytosés vers la membrane opposée, puis relâchés dans l'organisme (Manolagas 2000, Calvo *et al* 1996). Une fois la résorption osseuse effectuée, les OC subissent l'apoptose et cèdent la place aux OB pour la formation osseuse subséquente (Manolagas 2000).

Les OB jouent un rôle majeur dans la régulation du métabolisme osseux. La fonction principale de l'OB est de produire et sécréter les protéines formant l'ECM osseuse, puis de contrôler la minéralisation en modulant la déposition d'hydroxyapatite (Manolagas 2000). De plus, ces cellules régissent indirectement le processus de résorption osseuse en influençant l'activité des OC par la sécrétion d'ostéoprotégérine (OPG) et en exprimant le *Receptor Activator of NF κ B Ligand* (RANKL) (Lerner 2004, Manolagas 2000). Effectivement, les précurseurs ostéoblastiques et les cellules stromales expriment RANKL, qui se lie au récepteur RANK à la surface des précurseurs ostéoclastiques pour stimuler leur différenciation et leur activité; la sécrétion par les OB matures d'OPG, un récepteur soluble captant RANKL, bloque son interaction avec RANK et inhibe ainsi l'activité ostéoclastique (Li *et al* 2002, Thomas *et al* 2001, Manolagas 2000). L'expression d'OPG augmente tout au long de la différenciation, répond peu à la vitamine D mais est inhibée par la PTH; inversement, l'expression de RANKL demeure stable au cours de la différenciation, mais est significativement induite par la vitamine D (Thomas *et al* 2001). Le ratio des acides ribonucléiques messagers (ARNm) RANKL/OPG est utilisé comme un indice du stimulus ostéoclastogénique; ce ratio diminue avec la maturation des OB, qui produisent de plus en plus d'OPG et inhibent davantage la résorption osseuse (Thomas *et al* 2001).

La différenciation ostéoblastique

La moelle osseuse comprend une population réduite de MPC, de l'ordre de 2 à 5 cellules pour 10^6 cellules nucléées, capable de se différencier en OB, chondrocytes, adipocytes, myoblastes ou cellules stromales. Ces cellules progénitrices peuvent être

extraites de la moelle osseuse, purifiées et cultivées (Anjos-Afonso *et al* 2004, Liu *et al* 2003). C'est une population relativement homogène de cellules semblables à des fibroblastes; très peu sont engagées dans la prolifération (seulement 10% en phases S+G₂+M), la plupart d'entre elles étant en phase G₀/G₁ (Anjos-Afonso *et al* 2004). Lors de la différenciation ostéoblastique, les MPC prolifèrent et affichent progressivement les caractères des OB, permettant ainsi le renouvellement de cette population (Liu *et al* 2003) (Fig.3). Les OB peuvent aussi former une couche de cellules à la surface de l'os, les cellules bordantes (« lining cells »). Leur fonction est la dégradation de la matrice osseuse non minéralisée, sur laquelle les ostéoclastes ne peuvent se fixer. Ce système permet aux précurseurs ostéoclastiques de migrer vers ces sites nécessitant une résorption, suite à un signal émis par les cellules bordantes, elles-mêmes influencées par les ostéocytes (Manolagas 2000).

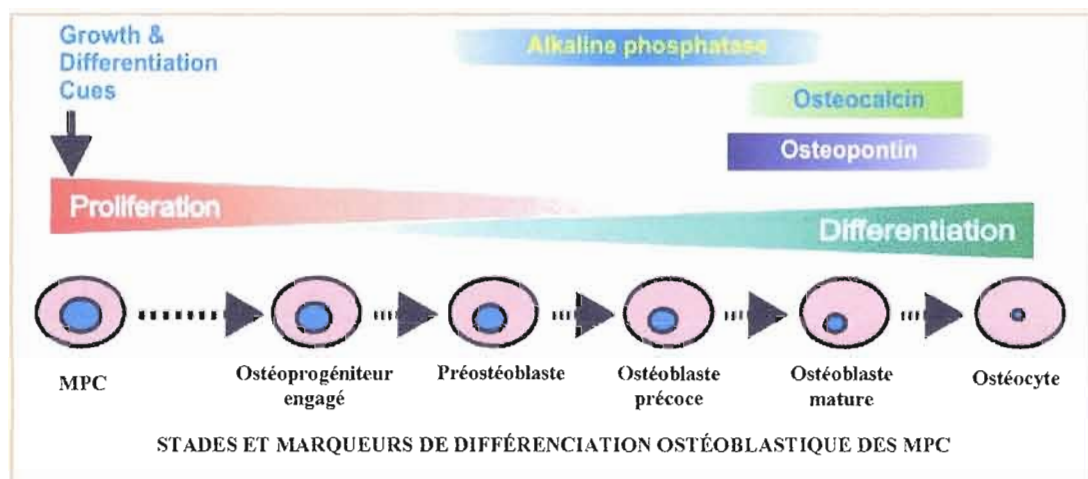


Figure 3 : La différenciation ostéoblastique. Les MPC se différencient vers la lignée ostéoblastique expriment progressivement des marqueurs spécifiques tels la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine et l'ostéopontine. Tiré de www.boneandcancer.org/research.htm.

Dans les tissus embryonnaires ou en régénération, l'engagement des descendants d'une cellule souche est suivie d'une amplification, *i. e.* plusieurs cycles mitotiques consécutifs lors des stades précoces de la différenciation (Manolagas

2000, Franceschi 1999). Effectivement, les cellules différenciées et les cellules souches ne se divisent généralement pas; les lignées cellulaires utilisées pour étudier la prolifération ostéoblastique sont donc issues de cette « zone grise » de stades transitoires (Manolagas 2000). La différenciation est associée à une foule d'évènements biochimiques et morphologiques, dont un arrêt en phase G_1 suivi d'une sortie irréversible du cycle cellulaire, dite engagement (« commitment »), et d'une expression ordonnée de gènes spécifiques au tissu osseux (Franceschi 1999). La relation entre la prolifération et la différenciation est étroitement contrôlée par des facteurs de transcription et des protooncogènes. Dans l'OB, la phase proliférative est caractérisée par une forte expression de protooncogènes diminuant progressivement dès le déclenchement de la différenciation (Franceschi 1999); l'expression soutenue de ces gènes à ce stade est associée à la tumorigénèse (Joseph *et al* 2001). Lors du modelage/remodelage, les MPC sont amenées à exprimer des gènes spécifiques aux OB (Sowa *et al* 2004). Les marqueurs de différenciation les mieux connus sont le collagène de type I (Col I), la phosphatase alcaline (ALP), l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéocalcine (OCN), dont l'expression est induite selon une séquence temporelle bien établie (Fig.3) (Liu *et al* 2003). L'expression ordonnée de ces marqueurs ostéoblastiques permet de suivre l'évolution de la différenciation; il est possible de discerner arbitrairement divers stades ostéoblastiques selon le nombre et le degré d'expression des marqueurs observés (Liu *et al* 2003, Van Vlasselaer *et al* 1994). Cependant, deux marqueurs sont particulièrement utilisés à cet effet : la ALP ainsi que le potentiel de minéralisation. Effectivement, la ALP est considérée comme une enzyme ostéoblaste-spécifique dans le tissu osseux et n'est pas détectée dans les MPC. Une hausse de l'activité ALP ainsi que la minéralisation de l'ECM sont les atouts d'ostéoblastes matures (Candelieri *et al* 1999).

Pathologies du système osseux

Le squelette étant un organe dynamique, il est donc sujet à des désordres métaboliques provoquant divers états pathologiques. Ces pathologies osseuses se résument essentiellement à un déséquilibre du modelage/remodelage osseux, soit dû à un défaut des fonctions ostéoclastiques ou des fonctions ostéoblastiques (Raisz 2005, Manolagas 2000). Les répercussions possibles sont multiples et dépendent du type de déséquilibre : lorsque la formation domine sur la résorption, il y a une hausse de la densité osseuse et apparition d'ostéopétrose. Cette condition est plutôt rare et généralement liée à des facteurs génétiques (Janssens et Van Hul 2002). Dans le cas inverse, il y a diminution de la masse osseuse et apparition d'ostéopénie ou d'ostéoporose (Raisz 2005); l'ostéoporose est maintenant un problème de santé majeur, affectant surtout les personnes âgées et/ou mal nourries et les femmes post-ménopausées (Noël *et al* 2004, Staessen *et al* 1999). Les causes sous-jacentes ne sont pas encore totalement élucidées, notamment parce que les facteurs semblent être multiples et interagir entre eux.

L'ostéoporose

L'ostéoporose est définie comme une diminution de la masse osseuse ainsi qu'une propension à la fragilité osseuse (Fig. 4). Cette définition laisse amplement place à l'interprétation, puisqu'il s'agit avant tout d'un ensemble de symptômes aux causes potentielles multiples (Ralston et de Crombrughe 2006, Kondo *et al* 2005, Riggs *et al* 2002). La perte de masse et de force du tissu osseux peut-être due à (a) l'incapacité d'atteindre une masse osseuse optimale lors de la croissance, (b) une résorption osseuse excessive ultérieure à l'atteinte de la masse optimale ou (c) une formation osseuse inadéquate lors du remodelage (Raisz 1999). Ce dernier point implique un défaut des fonctions ostéoblastiques pouvant être attribué à la sénescence cellulaire, dans le cas de l'ostéoporose sénile, mais également à une baisse de la synthèse ou de l'activité de facteurs de croissance systémiques ou locaux (Raisz

1999). Parmi les différents facteurs de risque de l'ostéoporose, l'exposition au cadmium (Cd) est reconnu pour entraîner une réduction de la masse osseuse, particulièrement dans les populations carencées en éléments tels le fer (Fe) et le Ca, et chez les femmes post-ménopausées (Noël *et al* 2004, Staessen *et al* 1999). Les données expérimentales et épidémiologiques suggèrent que le Cd altère le métabolisme osseux selon des mécanismes directs et indirects. D'une part, le Cd a des effets néphrotoxiques menant à une altération du métabolisme de la vitamine D, un élément impliqué dans la régulation du remodelage osseux. D'autre part, le Cd est à même d'affecter le métabolisme osseux, bien avant l'apparition de dommages aux reins (Noël *et al* 2004). L'impact de ce métal sur le métabolisme osseux a été initialement mis en évidence dans la maladie Itai-Itai (Staessen *et al* 1999).

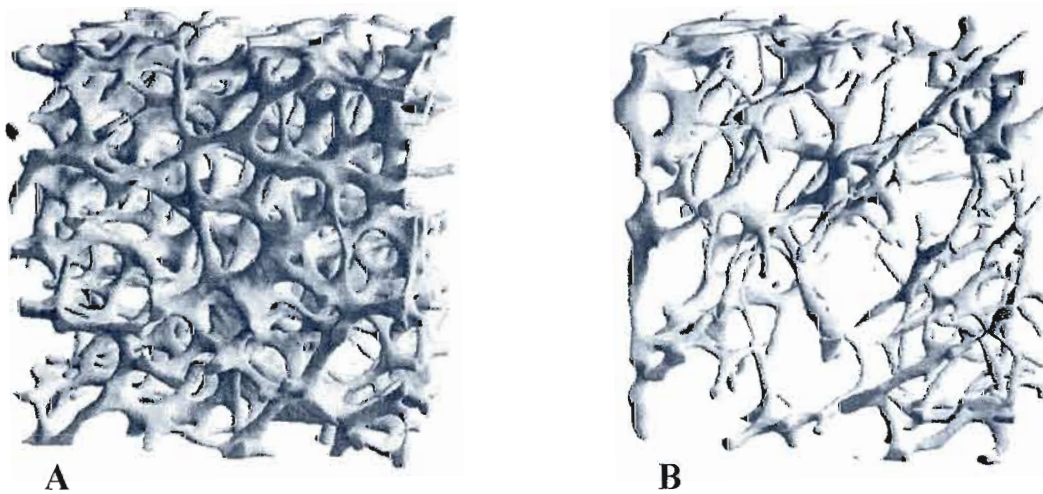


Fig. 4: Diminution de la densité osseuse lors de l'ostéoporose. Représentation de la portion trabéculaire d'un os sain (A) et d'un os ostéoporotique (B). Tiré de Riggs *et al* 2002.

La maladie Itai-itai

Dans les années 1940, le Japon a vu surgir une maladie drastique liée à l'ingestion massive et chronique de Cd. Ses symptômes incluent des dommages nécrotiques au niveau des reins et du foie, des lésions ostéoporotiques et

ostéomalaciques (*i. e.* zones de matrice non minéralisée) ainsi qu'une fragilité accrue aux fractures, particulièrement chez les femmes post-ménopausées. L'étiologie de la maladie Itai-itai, mot japonais pour « aïe-aïe », est généralement attribuée aux dysfonctions rénales perturbant l'activation de la vitamine D (Staessen *et al* 1999). Effectivement, les enzymes nécessaires à la conversion de la vitamine D en 25-OH-D₃ par le foie, puis en 1,25-(OH)₂-D₃ par les reins, sont fortement inhibés par le Cd (Chalkley *et al* 1998). Parmi les symptômes cliniques figurent diverses perturbations du métabolisme rénal (polyurie, enzymurie, néphropathie morphologique) (Katsuta *et al* 1994); la conséquence de ce dérèglement est une diminution marquée de l'absorption intestinale de Ca et, conséquemment, une diminution de la minéralisation osseuse. Cependant, plusieurs autres éléments de la maladie ne cadrent pas avec l'hypothèse d'un mécanisme indirect, notamment les lésions ostéoporotiques et ostéomalaciques apparaissant avant tout dommage rénal (Staessen *et al* 1999, Katsuta *et al* 1994). L'étiologie de ce syndrome impliquerait donc les deux voies de toxicité, directe et indirecte.

Le cadmium

Le Cd est un métal lourd largement utilisé dans les pays industrialisés. Selon la fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques de l'INERIS (<http://chimie.ineris.fr/fr/lespdf/metodexpchron/cadmium.pdf>), c'est un élément relativement rare dans la nature, se retrouvant à des concentrations de l'ordre de 1-2 particules par million (ppm) dans la croûte terrestre. Ce métal fait partie intégrante de notre quotidien et est présent dans nombre d'objets usinés. En ordre d'importance, l'industrie utilise le Cd dans la fabrication de batteries (75%), de pigments (12%), de surfaces métallisées (8%), d'agents stabilisateurs de matières plastiques (4%) et d'autres usages moins fréquents tels que les analyses chimiques, les lubrifiants, les verres et les miroirs (1%) (Huff *et al* 2007). Étant un toxique reconnu, divers organismes gouvernementaux et internationaux ont établi des valeurs

toxicologiques de référence oscillant entre 0.2 à 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ (<http://www.epa.gov/iris/subst/0141.htm>; <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>).

Propriétés physico-chimiques et voies d'exposition

Découvert en 1817, le Cd (numéro atomique = 108) est un métal de transition du groupe IIB, de masse atomique 112.4 et possédant un seul état de valence, le Cd^{2+} . Cet élément a un rayon ionique de 0.99 Å, très près de celui du Ca (0.97 Å), lui conférant un puissant potentiel Ca-mimétique (Henson et Chedrese, 2004). En termes purement chimiques, le Cd existe sous plusieurs formes : les colloïdes (Cd), les chlorures (CdCl_2), les sulfures (CdS), les sulfates (CdSO_4), les carbonates (CdCO_3), les oxydes (CdO), les sulfhydryles (CdSH) (Muller *et al* 2002) et les nitrates (CdNO_3^+) (Bergeron et Jumarie 2006, Elisma et Jumarie 2001). Les colloïdes, carbonates, oxydes et sulfures de Cd sont peu solubles dans l'eau, et l'exposition à ces substances survient le plus souvent *via* des activités particulières. Par contre, les chlorures, sulfates et nitrates sont solubles dans l'eau, et sont donc susceptibles de contaminer la population générale (Muller *et al* 2002). De ces formes, la seule pouvant être générée par un système biologique est le CdSH, notamment par sa liaison avec la métallothionéine (MT) ainsi que de nombreuses protéines contenant des groupes sulfhydryles (Henson et Chedrese 2004).

Le Cd est un sous-produit de l'extraction minière de Zn et de Pb, largement utilisé par les industries (batteries Ni-Cd, galvanisation) et l'agriculture (fertilisants phosphatés cadmiés) (Henson et Chedrese 2004, Jarüp 2002). Lorsque sa concentration dans le milieu augmente, le Cd contamine le sol et la nourriture, mais la principale source d'exposition pour la population générale demeure le tabagisme (Henson et Chedrese 2004). Puisque le Cd s'accumule dans les os, sa demi-vie biologique est très longue, soit de 15 à 30 ans chez l'Humain, principalement à cause de son faible taux d'excrétion (Huff *et al* 2007, Muller *et al* 2002). Selon sa forme, le Cd peut être inhalé ou ingéré; son absorption par les poumons, dont la

biodisponibilité avoisine les 25%, lui permet de traverser la barrière alvéolo-capillaire et de court-circuiter le système hépatique, provoquant un plus lourd fardeau sanguin que lorsque ingéré par le tractus gastrointestinal, la biodisponibilité orale étant de 3-5%. L'absorption cutanée est négligeable, soit de 0.02-0.05% (Kim et Sharma 2004, Muller 2002).

Cytotoxicité et accumulation cellulaire du Cd

Il est depuis longtemps reconnu que le Cd est apte à « remplacer » le Ca dans certains systèmes cellulaires (Henson et Chedrese 2004, Kim et Sharma 2004). De plus, ces travaux soulignent l'affinité supérieure du Cd pour certains sites de liaison du Ca. Il a d'ailleurs été démontré dans plusieurs types cellulaires que des canaux calciques participent à l'accumulation cellulaire du Cd; notamment, les canaux calciques voltages-dépendants (VDCC) sont impliqués dans les neurones (Usai *et al* 1999) et les cellules pituitaires (Hinkle *et al* 1992, Hinkle *et al* 1987). Une fois dans la cellule, le Cd peut déclencher l'apoptose selon divers mécanismes (Kim et Sharma 2004) dont la déstabilisation de la membrane mitochondriale et la hausse de la concentration intracellulaire de Ca (Pulido et Parrish 2003). De plus, des travaux récents prêtent également au Cd des propriétés Zn-, manganèse (Mn)- et Fe-mimétiques (Bannon *et al* 2003, King *et al* 2000, Yanagiya *et al* 2000). L'ensemble de ces études met en évidence les multiples mécanismes par lesquels le Cd peut entrer dans la cellule et interférer avec les fonctions cellulaires.

N'ayant qu'un seul état de valence, le Cd est inapte à générer des radicaux libres; cependant, des résultats suggèrent qu'il prend la place de métaux Fenton physiologiques, tels le Fe et le cuivre (Cu), qui eux provoquent un stress oxydatif (Henson et Chedrese 2004). Les perturbations qu'il provoque au niveau de la concentration intracellulaire de Ca déstabilisent la membrane mitochondriale, générant des radicaux libres (Kim et Sharma 2004, Joseph *et al* 2001). Dans la cellule, le Cd peut déplacer le Ca de ses sites de liaison sur des protéines régulatrices,

telles la calmoduline (CaM) et la protéine kinase C (PKC), induisant la transcription de gènes normalement très contrôlés par ces cascades de transduction de signaux. Ceci engendre le plus souvent des désordres fonctionnels résultant de l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcription (protooncogènes), d'enzymes (kinases, endonucléases) ou de récepteurs (oestrogéniques) (Henson et Chedrese 2004). Les protéines à doigts de Zn peuvent aussi être affectées par le Cd : leur activité transcriptionnelle est altérée par la substitution d'atomes de Zn par des atomes de Cd (Asmuss *et al* 2000). Le Cd provoque conséquemment les mêmes effets qu'une carence en Zn, soit le ralentissement ou l'arrêt de la transcription des gènes dont le promoteur contient des régions liant des protéines à doigts de Zn (Keen *et al* 2003), entre autres ceux de l'OCN, de la BSP et du Col I (Ganss et Jheon 2004). De plus, sa forte affinité pour les groupements SH lui permet de dénaturer diverses enzymes, altérant donc leur structure et leur activité (Henson et Chedrese 2004).

Mécanismes cellulaires de défense

Pour contrer leurs effets toxiques, la cellule a développé certains mécanismes de défense face au stress provoqué par les métaux lourds tel le Cd. La stratégie principale est simple : la séquestration des ions libres les empêche de perturber le cours normal des fonctions cellulaires. Diverses protéines synthétisées par la cellule sont aptes à lier le Cd. La métallothionéine (MT) est une protéine ubiquitaire de faible poids moléculaire (6.5 kD) fortement induite par des cations tels que le Cu^{2+} , le Zn^{2+} et le Cd^{2+} (Liu *et al* 2004). La MT comporte de nombreux groupements sulfhydryles dû à son riche contenu en cystéine, permettant la liaison de plusieurs atomes de Cd, diminuant ainsi le stress provoqué par la présence d'ions libres (Erfurt *et al* 2003, Habeebu *et al* 2000). Un fort contenu cellulaire en MT est généralement corrélé à une plus grande résistance aux effets néfastes du Cd (Habeebu *et al* 2000). L'impact principal d'un riche contenu cellulaire ou tissulaire en MT est donc une plus faible concentration d'ions Cd^{2+} libres, la forme néfaste du Cd (Huff *et al* 2007). D'autres

peptides, par exemple le glutathion (GSH), sont également synthétisés par la cellule pour contrer ce type de stress selon des mécanismes similaires (Erfurt *et al* 2003). De la même façon que la MT, le GSH lie les ions Cd^{2+} et en prévient les effets cytotoxiques. Quoique ces protéines ne seront pas étudiées dans ce projet, la connaissance de leur impact sur l'accumulation cellulaire aide à comprendre les phénomènes observés.

CHAPITRE I.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les études épidémiologiques et expérimentales démontrent l'impact de la toxicité directe du Cd sur le métabolisme osseux (Noël *et al* 2004, Staessen *et al* 1999, Katsuta *et al* 1994); les dommages occasionnés précéderaient ceux provoqués par les désordres associés à la néphrotoxicité et au déficit de vitamine D₃. De plus, les cellules ostéoblastiques au sein de l'os sont en fait un ensemble de populations hétérogènes, ces cellules variant phénotypiquement selon leur degré d'engagement dans la lignée ostéoblastique (Calvo *et al* 1996). La compréhension des mécanismes d'action directs du Cd sur le métabolisme osseux implique une meilleure connaissance de ses effets sur les cellules ostéoblastiques, ce qui permettra de détecter les stades précoces de l'ostéoporose induite par le Cd ainsi que de prévenir cette maladie, et éventuellement de la traiter plus efficacement.

L'objectif global de cette étude est de caractériser l'accumulation cellulaire du Cd et sa cytotoxicité dans les cellules ostéoblastiques. La présente étude émet donc les hypothèses suivantes : i) les OB sont une cible directe du Cd, ce qui engendre des désordres osseux sans néphrotoxicité; ii) la sensibilité des cellules de la lignée ostéoblastique au Cd varie avec leur stade de maturité et iii) en accord avec sa propriété de mimétisme du Ca, le Cd entre dans les cellules par des canaux cationiques de type VDCC ou des canaux « transient receptor potential » (TRP). Chaque hypothèse est détaillée dans les sections suivantes.

1.1 Les OB sont une cible du Cd

Les désordres osseux provoqués par le Cd ont longtemps été attribués à ses effets néphrotoxiques altérant l'absorption intestinale de Ca par la diminution de l'activation de la vitamine D (Jarup 2002). Normalement, l'absorption intestinale de Ca est rehaussée par la vitamine D qui doit être activée au niveau des tubules rénaux par la 1α -hydroxylase et convertie en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Chalkley *et al* 1998). Toutefois, les altérations du métabolisme osseux provoquées par le Cd, quoique leurs mécanismes soient nébuleux et complexes, semblent correspondre à un effet direct sur les ostéoblastes. Ses propriétés Ca-mimétiques et Zn-mimétiques sont les plus étudiés (King *et al* 1999, Long 1997). Plusieurs travaux soulignent que les rôles/activations des trois sous-familles de MAPK, soit Jnk, p38 et Erk, semblent Ca-dépendants; ces MAPK sont donc toutes des cibles potentielles du Cd (Kim et Sharma 2004, Joseph *et al* 2001, Long 1997). Ainsi, un objectif méthodologique afin de vérifier si les ostéoblastes constituent une cible du Cd sera de démontrer l'entrée du Cd et la toxicité dans les OB.

1.1.1 Accumulation cellulaire du Cd dans les OB

L'accumulation cellulaire est un paramètre capital de la cytotoxicité du Cd; il importe donc de mesurer le potentiel d'accumulation du Cd dans les cellules ostéoblastiques. Peu d'études ont été faites afin de mesurer les niveaux d'accumulation dans les OB (Lévesque *et al* 2008); de plus, ce type de données peut permettre de caractériser des mécanismes d'entrée empruntés par le Cd. Le premier sous-objectif est donc d'observer le potentiel d'accumulation du Cd par les OB par rapport à sa concentration et au temps d'exposition.

1.1.2 Cytotoxicité du Cd sur les OB

Diverses études démontrent que le Cd affecte les OB à des concentrations de l'ordre de quelques μM (Coonse *et al* 2007, Miyahara *et al* 2001, Long 1997, Dohi *et*

al 1993), prouvant donc que les cellules ostéoblastiques sont des cibles de ce toxique. Les mesures de cytotoxicité permettront de comparer les valeurs obtenues en conditions basales à celles observées suite à divers traitements. Toute condition influençant la cytotoxicité du Cd sera parallèlement vérifiée en termes d'accumulation cellulaire; un effet protecteur ou sensibilisant pourrait donner un indice des voies d'entrée impliquées dans l'accumulation de ce métal. Un second sous-objectif sera donc d'observer la sensibilité au Cd des modèles cellulaires étudiés en fonction de diverses conditions de culture et de différents traitements aux agents pharmacologiques.

1.2 La différenciation affecte la sensibilité des ostéoblastes au Cd

De nombreux résultats expérimentaux soulignent des caractéristiques phénotypiques stade-spécifiques des cellules s'engageant dans la différenciation ostéoblastique (Liu *et al* 2003, Candelieri *et al* 1999). De plus, des études ont mis en évidence des différences d'ordre métabolique, notamment en ce qui a trait à l'énergie nécessaire pour la sécrétion de l'ECM osseuse (Komarova *et al* 2000). Pour ces raisons, il est donc stipulé que les cellules ostéoblastiques peuvent avoir des potentiels d'accumulation et des sensibilités au Cd variant selon leur degré de maturité. Les objectifs découlant de cette idée sont donc de reproduire *in vitro* le processus de différenciation ostéoblastique et d'évaluer la sensibilité au Cd des cellules en fonction de la différenciation.

1.2.1 Modèle *in vitro* de différenciation ostéoblastique

Afin d'observer le comportement de précurseurs ostéoblastiques à divers degrés de différenciation, il est nécessaire de recréer ce processus dans un environnement contrôlé. Divers ouvrages dans la littérature scientifique citent l'impact de l'acide ascorbique et du glycérol-2-phosphate sur la différenciation *in vitro* des ostéoblastes (Minguell *et al* 2001). Un sous-objectif est donc d'induire la

différenciation ostéoblastique d'un modèle cellulaire au phénotype encore immature et d'en caractériser l'évolution en mesurant l'activité ALP et la calcification obtenues en culture. La lignée cellulaire utilisée dans le cadre de ce projet est la MC3T3-E1.4, un sous clone reconnu pour son potentiel de minéralisation suite à ce type de traitement (Yamauchi *et al* 2005, Jadowiec *et al* 2004). La mise en place de ce modèle permettra d'étudier la cytotoxicité et de l'accumulation cellulaire du Cd en fonction du stade de différenciation.

1.2.2 La sensibilité au Cd en fonction de la maturité ostéoblastique

Suite à la mise en place du modèle de différenciation, l'accumulation cellulaire et la cytotoxicité du Cd peuvent être étudiées à divers stades de maturité ostéoblastique, ainsi que sur différents modèles représentant des stades variés de différenciation. Ces observations permettront d'évaluer les différences de sensibilité entre ces stades, si elles existent. Ces données indiqueront si certaines populations ostéoblastiques au sein de l'os représentent des cibles particulières du Cd. D'un point de vue physiologique, l'atteinte préférentielle d'une de ces populations pourrait avoir une grande importance dans l'étiologie des désordres osseux directement provoqués par le Cd. Il importe donc de bien caractériser la population ostéoblastique ciblée par le Cd; ce type d'information pourrait, à long terme, avoir des implications cliniques. Dans l'éventualité d'une plus grande sensibilité des OB matures, des agents stimulants l'ostéoblastogenèse (par exemple l'AA ou la protéine morphogénétique osseuse (BMP-2)) pourraient être utilisés pour maintenir cette population; inversement, l'atteinte préférentielle des MPC pourrait être remédiée par l'utilisation d'agents stimulant la prolifération, comme le platelet-derived growth factor (PDGF).

1.3 Les VDCC et les TRP sont des voies d'entrée cellulaires du Cd dans les OB

Le Cd peut pénétrer dans les cellules selon différents mécanismes, dont certains impliquent la participation de canaux ioniques, tels les VDCC (Usai *et al*

1999, Hinkle *et al* 1992, Hinkle *et al* 1987); d'autres canaux, tel TRPM7, sont reconnus pour être plus perméables au Cd qu'au Ca (Monteilh-Zoller *et al* 2003). Toutefois, les voies d'entrée du Cd dans les OB ne sont pas connues. Dans les OB, les VDCC (Bergh *et al* 2004, Barry *et al* 1995) et plusieurs types de canaux TRP sont exprimés (Abed et Moreau 2007, Labelle *et al* 2007). Ainsi, il est proposé que ces types de canaux permettent l'entrée du Cd dans les OB. Les sections suivantes traitent donc de l'identification de ces deux classes de canaux membranaires.

1.3.1 Les canaux calciques voltages-dépendants (VDCC)

Des études pharmacologiques suggèrent que les VDCC peuvent participer à l'entrée de Cd dans les cellules rénales (Endo *et al* 2002), pituitaires (Hinkle *et al* 1992, 1987) et hépatiques (Long 1997) tel qu'observé par l'inhibition partielle de sa cytotoxicité par l'ajout d'inhibiteurs spécifiques aux VDCC. Cependant, l'influence de ces inhibiteurs varie grandement d'un type cellulaire à l'autre (Foulkes 2000, Long 1997). Au niveau ostéoblastique, l'expression de plusieurs membres des VDCC est répertoriée chez l'humain (Barry 2000), le rat (Barry *et al* 1995) ainsi que la souris (Bergh *et al* 2004, Yamaguchi *et al* 1989). Les VDCC sont classés en deux groupes : les HVA (*High Voltage-Activated*) et les LVA (*Low Voltage-Activated*). Ces groupes sont divisés selon la cinétique d'ouverture et de fermeture de leur pore central. Les HVA comprennent les types L, N, P/Q et R-VDCC, et les LVA contiennent les types T-VDCC (Yamakage et Namiki 2002, Barry 2000). Puisque les L-VDCC sont largement distribués à travers l'organisme et que leur structure est plus complexe, ceux-ci seront étudiés (Figure 5). Les fonctions des VDCC englobent la génération de potentiels d'action et la transduction de divers signaux à partir de la membrane cellulaire (Yamakage et Namiki 2002). Dans les OB matures, les VDCC modulent la synthèse et la sécrétion d'OPG (Bergh *et al* 2004).

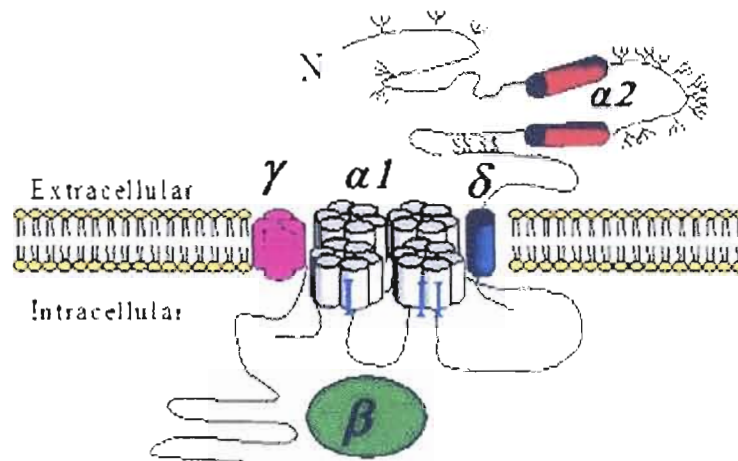


Figure 5 : Structure des canaux VDCC. Ce canal est composé de 5 sous unités polypeptidiques de masses moléculaires différentes : α_1 (175kDa), formant le pore central et le site de liaison au Ca; α_2 (143kDa), associé à α_1 et lourdement glycosylé; β (54kDa), associé à α_1 pour former le site de phosphorylation par des kinases AMPc-dépendantes; il y a aussi γ (30kDa) et enfin δ (27kDa), qui tout comme α_2 possède une portion extracellulaire fortement glycosylé. Tiré de www.biochem.ubc.ca.

1.3.2 Les canaux transient receptor potential (TRP)

Plusieurs canaux calciques de la famille des TRP participent à l'homéostasie d'ions divalents, tels le Ca et le magnésium (Mg) (Huang 2004). Les TRP sont des canaux cationiques non sélectifs composés de 6 domaines transmembranaires (S1 à S6) (Clapham *et al* 2003). Ils sont divisés en 3 grandes familles selon leurs propriétés respectives: les TRPC (Canoniques), les TRPM (Mélstatine) et les TRPV (Vanilloïdes), chacune de ces familles étant subdivisée en plusieurs sous-familles (figure 6) (Padinjat et Andrews 2004, Clapham *et al* 2003). Les rôles précis de tous ces canaux sont encore méconnus. Les TRPC sont associés aux influx calciques phospholipase C (PLC)-dépendants, plus spécialement TRPC3 (Huang 2004, Rosker *et al* 2004); ce mécanisme est d'ailleurs sollicité dans la réponse cellulaire non génomique à la vitamine D (Le Mellay *et al* 1997). Les TRPV et les TRPM sont associés à la transduction thermique, nociceptive, mécanosensorielle et gustative (Huang 2004). Ces deux familles participent également à l'homéostasie du Ca et du

Mg au cours de la prolifération (Schlingmann et Gudermann 2005, Huang 2004). Leur rôle dans la différenciation ostéoblastique est indéterminé pour l'instant; leur expression est démontrée dans les ostéoblastes humains (Abed et Moreau 2005). Les TRPM sont particulièrement intéressants à ce niveau car l'un d'entre eux, le TRPM7, semble crucial dans l'ostéogenèse puisque des poissons osseux (*danio rerio*) déficients en TRPM7 (TRPM7^{-/-}) ont une ossification anormale lors de l'embryogenèse (Elizondo *et al* 2005). De plus, TRPM7 possède une plus grande affinité aux métaux traces divalents qu'au Ca. Le profil d'affinité de ce canal selon un ordre décroissant est : Zn = Ni >> Ba > Co > Mg > Mn > Sr > Cd > Ca par comparaison équimolaire à 10mM (Monteilh-Zoller *et al* 2003).

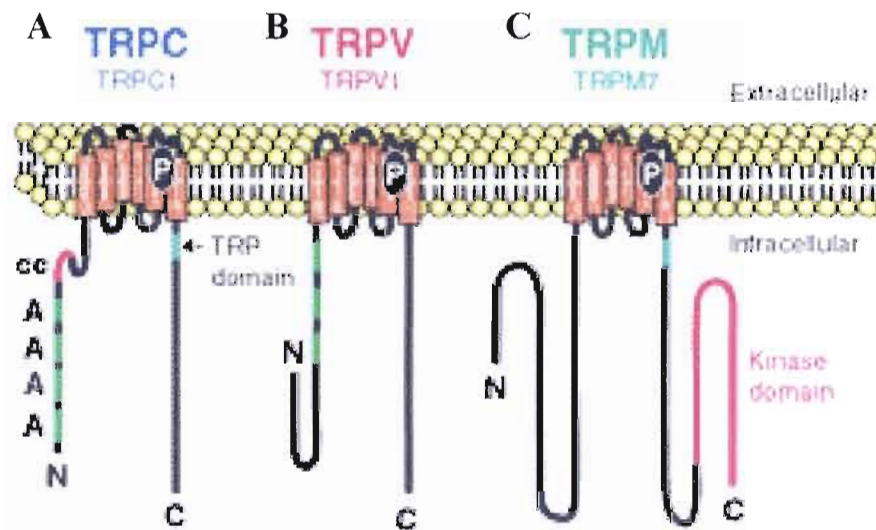


Figure 6: Structure des canaux de type TRP. Les canaux TRP comportent 6 segments transmembranaires ainsi que des N- et C-termini spécifiques selon chaque classe. **A.** Les TRPC (ex. TRPC1) contiennent des répétitions ankyrines (A) et un domaine coiled-coil (cc) à leur extrémité N-terminale, ainsi qu'un domaine désigné TRP caractéristique de cette famille de canaux à leur extrémité C-terminale. **B.** Les TRPV (ex. TRPV1) possèdent également des répétitions A, mais pas de domaine cc ni TRP. **C.** Les TRPM (ex. TRPM7) n'ont ni répétitions A ni domaine cc, mais possèdent un domaine TRP ainsi qu'un domaine kinase à leur extrémité C-terminale. Tiré de Clapham *et al* 2003, Minke et Cook 2002.

1.3.3 Expression des canaux suspectés dans les OB

Suivant les résultats d'accumulation et de cytotoxicité obtenus, il importera de démontrer la présence des canaux suspectés. Il a déjà été démontré que les VDCC sont exprimés dans diverses cultures ostéoblastiques (Barry *et al* 1995, Barry 2000, Bergh *et al* 2004). Par contre, la présence de canaux de type TRP dans les OB n'a été démontrée que récemment et dans très peu de modèles (Abed et Moreau 2007, Labelle *et al* 2007). Le dernier objectif de cette étude était donc de démontrer la présence de canaux TRP susceptibles de transporter le Cd dans les divers modèles ostéoblastiques étudiés.

1.4 Modèles cellulaires à l'étude

Les résultats du chapitre suivant ont tous été obtenus à partir de lignées cellulaires affichant un phénotype ostéoblastique, c'est-à-dire qu'elles comportent plusieurs des caractéristiques des ostéoblastes retrouvées chez les Vertébrés, desquels elles sont d'ailleurs dérivées. Un constat important doit cependant être considéré : ces lignées cellulaires ont subi un processus d'immortalisation, soit leur transformation en lignée stable et pouvant proliférer longuement *in vitro* (Sorkin *et al* 2004). L'immortalisation de cellules a fort probablement un impact sur leur comportement; cependant, plusieurs avantages subsistent par rapport à l'utilisation de cultures primaires. Tout d'abord, elles sont commercialement disponibles, faciles d'entretien, forment des populations homogènes et sont le plus souvent capables de subir plusieurs dizaines de passages tout en maintenant leur phénotype. De plus, la gamme de phénotypes maintenant disponibles comprend la plupart des tissus normaux et tumoraux connus.

1.4.1 Les cellules MC3T3-E1 sous-clone 4 (No. ATCC CRL-2593)

Les cellules de la lignée MC3T3-E1 sont dérivées de calvaria de souriceaux nouveau-nés et affichent un phénotype dit « normal »; ces cellules au phénotype

fibroblastique sont capables de se différencier pleinement en OB *in vitro*, formant une matrice de collagène se minéralisant lors des stades propres à un processus analogue à celui de l'ostéogenèse *in vivo* (Jadlowiec *et al* 2004, Pischon *et al* 2004, Wang *et al* 1999). Cette lignée cellulaire est monopotente, *i.e.* que ces cellules ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire, soit les OB (Sorkin *et al* 2004, Wang *et al* 1999, Yamaguchi *et al* 1989). De plus, l'apport d'acide ascorbique est nécessaire à la déposition de collagène et donc au processus de différenciation (Wenstrup *et al* 1996). Elles constitueront donc un excellent modèle de précurseurs ostéoblastiques dans le cadre de cette étude.

1.4.2 Les cellules MG 63 (No. ATCC CRL-1427)

Les cellules de la lignée MG 63 sont issues d'un ostéosarcome humain (Sorkin *et al* 2004, Billiau *et al* 1977). Elles présentent un phénotype dit préostéoblastique, soit plus matures que celui des cellules MC3T3-E1. Elles ont cependant un pauvre potentiel de différenciation; certaines études affirment qu'elles présentent une activité ALP accrue en présence de vitamine D₃ dans des conditions de culture pauvres en sérum (Funato *et al* 2001). Cependant, la différenciation de ces cellules n'a pas été envisagée sur cette lignée puisque même l'apport en vitamine D₃ ne permet pas la minéralisation par la lignée MG 63. Elles permettront néanmoins de comparer les fonctions cellulaires humaines et murines.

1.4.3 Les cellules U2 OS (No. ATCC HTB-96)

Les cellules de la lignée U2 OS proviennent également d'un ostéosarcome humain et sont sensiblement plus matures que les MG 63; elles représentent plutôt un stade ostéoblastique (Sorkin *et al* 2004, Yao et Schaffer 1995). Étant donné l'impossibilité de faire différencier les MG 63, les U2 OS permettront de comparer deux lignées humaines représentant des stades de maturité différents.

CHAPITRE II.

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS SOUS FORME D'ARTICLES

2.1. Premier article: CADMIUM ACCUMULATION AND CYTOTOXICITY IN VARIOUS OSTEOBLAST-LIKE CELL LINES

L'article suivant, intitulé *Cadmium accumulation and cytotoxicity in various osteoblast-like cell lines* (Accumulation et cytotoxicité du cadmium dans différentes lignées cellulaires ostéoblastiques), fut rédigé au cours de ma maîtrise effectuée au laboratoire de métabolisme osseux de Dr. R. Moreau, PhD. J'ai rédigé l'article présentant mes travaux de recherche, ainsi que des résultats obtenus par Lee-Ann Jomphe, B.Sc., ayant complété un stage de formation pratique dans notre laboratoire de septembre à novembre 2007. Figurent également dans la liste d'auteurs mes codirecteurs, Catherine Jumarie et Robert Moreau.

Les résultats présentés dans cet article sont le fruit d'une étude comparative de l'accumulation cellulaire et de la sensibilité au Cd de trois différentes lignées cellulaires au phénotype ostéoblastique. En effet, ces travaux ont été effectués dans la seconde moitié de mon cheminement de maîtrise, suite à mes travaux concernant la différenciation ostéoblastique présentés dans la deuxième partie de ce chapitre. Le but initial était de comparer des systèmes murins et humains; ces systèmes présentaient en effet des écarts significatifs en terme de potentiel d'accumulation du Cd, de sensibilité à cet ion ainsi que de mécanismes membranaires impliqués dans son entrée cellulaire. Cependant, une comparaison directe était impossible, tout simplement parce que les modèles cellulaires choisis représentaient différents stades de maturité ostéoblastiques. Les variations observées entre les modèles ne pouvaient donc pas être strictement attribuées à des caractéristiques liées à l'espèce. Pour cette raison, cet article ne fait que résumer les différences relevées tout en rappelant au lecteur la possibilité de l'impact du stade de maturité sur les paramètres étudiés.

Je tiens à souligner la participation de Lee-Ann Jomphe, étudiante au baccalauréat en biologie APP de l'UQAM, qui a activement participé à mes travaux pratiques au cours de l'automne 2007, particulièrement pour les essais de transport et de cytotoxicité. De plus, j'aimerais mentionner les participations de Élie Abed,

étudiant au PhD, et Dominique Labelle, étudiante au PhD, également du laboratoire de métabolisme osseux, pour leurs travaux concernant l'expression et la fonction des canaux de type TRP dans les ostéoblastes. Sans eux, la réalisation de cet article aurait été impossible.

CADMIUM ACCUMULATION AND CYTOTOXICITY IN VARIOUS
OSTEOBLAST-LIKE CELL LINES

Corine Martineau^{1,2}, Lee-Ann Jomphe¹, Catherine Jumarie² and Robert Moreau^{1*}

¹Laboratoire du Métabolisme osseux, Centre BioMed, UQÀM,
²Laboratoire de Toxicologie cellulaire des métaux, Toxen, UQÀM,
Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal
Montréal, Qc, Canada H3C 3P8

Running title: Cadmium uptake and cytotoxicity in osteoblast-like cells

Keywords: osteoblasts; cadmium; cytotoxicity; calcium; magnesium;
osteoblastic maturity; transient receptor potential channel; voltage-
dependent calcium channel

*To whom correspondence should be addressed:

Robert Moreau, PhD
Assistant professor
Département des sciences biologiques
Université du Québec à Montréal
CP 8888, succ Centre-Ville
Montreal (Quebec)
Canada H3C 3P8
E-mail: moreau.robert@uqam.ca

ABSTRACT

Introduction. Exposure to low non nephrotoxic levels of cadmium (Cd) was shown to affect bone metabolism. Cd accumulates in bone-forming osteoblastic cells, yet its mechanisms of entry remain elusive.

Aims. This study aimed at characterizing Cd cytotoxicity and uptake processes in various osteoblast-like cell lines and to evaluate their relative sensitivity to this metal ion.

Methods. Human osteoblast-like MG-63 and U2 OS cell lines, showing a mature phenotype, as well as the murine MC3T3-E1 cell line, resembling immature osteoprogenitors, were compared in terms of Cd sensitivity (MTT assay) and Cd uptake (^{109}Cd accumulation measurements). Toxicity and transport were estimated under various experimental conditions testing the possible involvement of TRP channels, whose expression were verified by RT-PCR.

Results. Higher sensitivity but lower levels of accumulation were obtained with the MC3T3 cells compared to the MG63 and U2 OS cell lines. The initial 3-min uptake of ^{109}Cd was faster in MC3T3 cells than in MG 63 and U2 OS cells. Extracellular calcium (Ca) and magnesium (Mg) decreased Cd uptake and cytotoxicity in MC3T3 and MG 63 cells, and the TRP inhibitor 2-APB had a similar protective effect in MG 63 and U2 OS cells. Study of TRP mRNA expression reveals that some isoforms are expressed in all of these cell lines whereas TRPM1 is expressed according to osteoblastic differentiation status and/or species.

Conclusion. Cadmium uptake and cytotoxicity in osteoblast-like cells vary among cell lines of similar phenotype. While the uptake mechanisms remain elusive, data indicate the implication of Ca and Mg transport mechanisms possibly of the TRPM and/or TRPV class.

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a toxic divalent metal that may induce apoptosis and/or necrosis in numerous cell types (Kil *et al* 2006, Erfurt *et al* 2003, Li *et al* 2003, Kim *et al* 2002, Foulkes 2000). Epidemiological studies have also established a clear relationship between exposure to Cd and several osteopathies such as osteoporosis and the sadly famous Itai-Itai disease (Alfven *et al* 2002, Miyahara *et al* 2001, Staessen *et al* 1999, Katsuka *et al* 1994). The latter is caused by massive ingestion of Cd and affected subjects show characteristic necrosis of kidney cells as well as osteomalacic and osteoporotic lesions. However, the mechanisms by which Cd causes these disorders remain controversial. It has long been thought that Cd affects bone primarily through its nephrotoxicity, thus leading to impaired vitamin D₃ activation (Jarup 2002, Chalkley *et al* 1998). Recently, it has been demonstrated that Cd can disrupt bone metabolism by direct interaction with bone cells in the absence of any kidney lesions (Miyahara *et al* 2001, Staessen *et al* 1999, Katsuka *et al* 1994). Numerous laboratories are now investigating the direct effect of Cd on bone cells (Brzóska and Moniuszko-Jakoniuk 2004, Miyahara *et al* 2001, Habeebu *et al* 2000, Long 1997, Wilson *et al* 1996, Dohi *et al* 1993).

The bone is a dynamic tissue submitted to constant remodelling (Manolagas 2000, Raisz 1999). This process results from two main activities: bone resorption, accomplished by osteoclasts, and bone formation done by osteoblasts (Canalis 2003). Osteoclasts come from the fusion of hematopoietic precursors of the monocyte/macrophage lineage resulting in large multinuclear cells (Mbalaviele *et al* 1999, Athanasou *et al* 1996). Osteoblasts are derived from the differentiation of mesenchymal progenitor cells found in the bone marrow (Canalis 2003, Yamaguchi 2000). There is a critical balance between bone formation and resorption: osteoblastic and osteoclastic cells together act within an arbitrary unit called «Basal Multicellular Unit» (BMU), ensuring the proper renewal of bone tissue (Lerner 2004, Manolagas 2000). Any unbalance between osteoblast and osteoclast activities leads to several bone disorders ranging from osteopenia to osteopetrosis (Raisz 2005, Canalis 2003, Janssens and Hul 2002).

In osteoblasts, the mechanisms of Cd uptake are unknown. Some transporters have been identified in other cell types: voltage-dependant calcium channels (VDCC) are involved in neuronal, renal, pituitary and hepatic cells (Endo *et al* 2002, Usai *et al* 1999, Long 1997, Hinkle *et al* 1992), while the iron transporter NRAMP2 is mainly responsible for the intestinal uptake of Cd²⁺ (Bannon *et al* 2003, Park *et al* 2002, Élisma and Jumarie 2001). Transient receptor potential (TRP) channels are mainly associated with calcium (Ca) influx (Huang 2004, Rosker *et al* 2004), but most of them show significant affinity for many other cations such as sodium (Na), magnesium (Mg) and a number of trace metals (Huang 2004, Monteilh-Zoller *et al* 2003,). In transfected HEK293 and CHOK1 cells, the TRP-melastatin-related 7 (TRPM7) channel was found to be permeable to Cd (Li *et al* 2006, Monteilh-Zoller *et al* 2003). Expression of TRPM7 and its homolog TRPM6 have recently been demonstrated in the MG 63, U2 OS and SaOS human cell lines (Abed and Moreau 2007).

This study aimed at characterizing Cd uptake and toxicity in three osteoblast-like cell lines, each having a distinct differentiation status. Our results show that Ca and Mg reduce Cd uptake in MG 63 and MC3T3 cells, while only Mg significantly decreased it in U2 OS cells. While TRPC modulators (e.g. thapsigargin and SKF96365) had no impact on Cd cytotoxicity or accumulation, 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) significantly reduced Cd uptake and toxicity in the human MG 63 and U2 OS cells. The genic expression of a number of TRP channels has been observed in all three cell lines. Data are discussed with respect to the expression of these channels.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines and culture

The MC3T3-E1 subclone 4, MG 63 and U2 OS cell lines were obtained from the American Type Cell Collection (ATCC) and were maintained in α MEM, DMEM-F/12 or Mc Coy medium (all from HyClone), respectively, with 10% FBS (Cansera) at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere. Cells were harvested weekly by trypsinisation (0.05% trypsin 0.02% EDTA; Invitrogen) and were plated at a cell density of 15 000 and 3000 cells/cm² for the MC3T3 or the MG 63/U2 OS cells, respectively.

Cytotoxicity assays

Cells cultured in 96-well or 24-well plates were serum-starved and exposed for 24 h to 0-100 μ M Cd under the following conditions: Ca- (0.1 mM) or Mg- (0 mM) poor media, high potassium (50 mM)-induced membrane depolarisation, 5 μ M thapsigargin (TG) with or without 10 μ M SKF 96365, two known modulators of TRPC channels (Hermosura *et al* 2002), or 0-100 μ M 2-APB, a TRPC/TRPM inhibitor and TRPV1-2-3 activator (Li *et al* 2006, Hu *et al* 2004) (all from Sigma). Cell viability was assessed using the microtiter tetrazolium assay (MTT). Briefly, 2 to 4 h prior to the end of exposure, 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) was added to each well at a final concentration of 0.5 mg/mL and the cells were incubated at 37°C for 2 or 4 h in 24-well plates and 96-well plates, respectively. The medium was then removed and the formazan crystals formed by living cells were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma). The resulting coloration was read by spectrophotometry at 575 nm. Data are expressed relative to control cells unexposed to Cd.

Measurement of Cd and Ca uptake

Uptake measurements were conducted under various experimental conditions using $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd (specific activity range from 4 to 3 $\mu\text{Ci}/56 \mu\text{g}$; Eckert & Ziegler) and 0.5 mM ^{45}Ca (specific activity range from 12.6 to 7.8 $\mu\text{Ci}/22 \text{ mg}$; GE Healthcare). Transport medium, referred to as nitrate (NO_3^-), contained (in mM): 10 Hepes, 4 D-glucose, 137 NaNO_3 , 5.9 KNO_3 , pH 7.4. Uptake experiments were performed using Ca- and Mg-free media, unless specified otherwise. Contrary to the chloride (Cl^-) medium, the NO_3^- medium was used to increase the level of dissolved Cd recovered as Cd^{2+} (Élisma and Jumarie 2001, Bergeron and Jumarie 2006). Depolarisation media consisted of an equimolar substitution of Na^+ for K^+ ions in the Cl^- or NO_3^- medium. Cells were preincubated for 10 min in the 137 mM KCl medium and then exposed to radiotracer in the 137 mM KNO_3 medium. Transport measurements were also performed in the presence of 100 μM Cd, 5 mM Ca, 2.5 mM Mg, or the specific modulators thapsigargin (TG) (5 μM), SKF96365 (10 μM) or 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) (0-100 μM). Briefly, the cells were rinsed 4 times with the radiotracer-free Cl^- medium before a 3-min or 24-h exposure to 1 mL of the ^{109}Cd - or ^{45}Ca -containing medium at room temperature. The cellular accumulation was stopped with 4 rinses of the ice-cold STOP medium containing 2 mM EDTA to minimize extracellular Cd on the cellular surface. The cells were lysed in 500 μl NaOH 1N and 300 μl aliquots were used for radioactivity determination. ^{45}Ca and ^{109}Cd samples were quantified using a β (Wallac 1409 DSA, Wallac Oy, Turku, Finland) and a γ counter (Cobra II, Canberra Packard Canada), respectively. Data are expressed as nmol of ^{45}Ca or pmol of ^{109}Cd per mg of protein. Specific cellular transport data were corrected for non specific contribution ($k_D \times [\text{tracer}]$) to total uptake, possibly including binding.

Protein quantification

For protein quantification of transport measurements, the Bradford method was used (BioRad) according to the furnisher's protocol. Bovine serum albumin (BSA) was used as the calibration standard.

RNA extraction and semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted with TriZol (Invitrogen) and 2 µg of total RNA were reverse transcribed with Omniscript reverse transcriptase (Qiagen) following furnisher's recommendations. The cDNA obtained was used to amplify selected TRP channels (Table I) following a 40-cycles PCR (Multigene, Labnet) with a 58 °C annealing temperature. The PCR products were revealed by ethidium bromide staining and UVC exposure following electrophoretic migration in a 2% agarose gel. Quantity of PCR products was estimated by densitometry relatively to GAPDH housekeeping gene intensity using the AlphaImager software (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

Table I: Description of specific primers used for PCR amplification of selected TRP genes.

Gene:	Forward:	Reverse:
mGAPDH	5'-GGA GAT TGT TGC CCA TCA ACG A-3'	5'-TGG GAG TTG CTG TTG AAG TCG-3'
mTRPM1	5'-CGA GGA GCT TCT GTT TGA TT-3'	5'-GCT TCC GTG CTC TTG AAA TC-3'
mTRPM4	5'-AAG CCA AGT GTC TCC GAG CTG C-3'	5'-TCA GCA GCT TCC GCT CTG CTT C-3'
mTRPM6	5'-AAG GCG GTC ATT GCT AGT ATC C-3'	5'-TGG GTA CAA GAA TGC GAC AC-3'
mTRPM7	5'-ATG ACG ATG GAG GAT AGT G-3'	5'-TTG TCG GGA GAG TGG AGT C-3'
mTRPM8	5'-AAG AGG ACA GAA GCA GCA GG-3'	5'-AAT GAT ACG AGG CCA CAG CC-3'
mTRPV2	5'-ATG GAG CGA ATG TTC ACA TCC-3'	5'-TGA TTT CCA GGA CCG AGT TC-3'
hGAPDH	5'-GAG TCA AAC GGA TTT GGT CGT ATT G-3'	5'-GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC-3'
hTRPM3	5'-GAG GGG TTA ACA CAG GTG TTA TTC G-3'	5'-CTC GAA GGT ACT CCA AAA CAA TCG-3'
hTRPM4	5'-GTT CAT AGT TGA CTC CAC AGA TCC G-3'	5'-GTT GAT GAG GGT GTC TCT ATT CCG-3'
hTRPM6	5'-TCA CTG GAC CTA TGA GTA CAC TCG G-3'	5'-GAC GCT GAT GTA ATC AAC ATC ACG-3'
hTRPM7	5'-TGC ACC TAT ACT AGG AAA CGT TTT CG-3'	5'-CAT GAT AAA AGG CAT AAA ACT TTC GC-3'
hTRPM8	5'-GTA TAT ACG TCT GTC CTG CGA CAC G-3'	5'-CCA TAG TTG GAA TCT TGA ATA GTG CG-3'
hTRPV2	5'-CAA GGG ACT TGC TTT TAT TTC GG-3'	5'-CAG AAG CCA GGT CAT ACA GCG-3'

Statistical analyses

All experiments were performed on at least three independent cell cultures in duplicate. Cell viability as a function of increasing concentrations of Cd was analyzed according to the dose-response Eq (1)

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + 10^{(\log LC_{50} - X) * Hillslope}} \quad (1)$$

where Y_{\max} and Y_{\min} are the maximal and minimal ratio of cell viability, respectively, and LC_{50} is the concentration of Cd for which a cell viability ratio of 0.5 is observed.

Nonlinear regression analyses were performed with Prism 4 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The errors associated with the parameter values given in the text represent the standard error of regression (SER). Statistical analyses were performed with the unpaired student's *t*-test or ANOVA with Bonferoni's post-test. Statistical significance was assessed at the $p < 0.05$ level.

RESULTS

Sensitivity of MC3T3, MG 63 and U2 OS cells to Cd

Although being osteoblast-like cell lines, these cells show characteristics of their own which may modify their sensitivity to Cd. Cell viability as a function of increasing concentrations of Cd are shown in Fig.1. Data analyses according to Eq (1) gave LC₅₀ values allowing to rank cell lines relative to sensitivity to Cd: MC3T3 ($9.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$), MG 63 ($22.2 \pm 1.1 \mu\text{M}$) and U2 OS ($37.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$).

Effect of calcium or magnesium on Cd uptake and cytotoxicity

In order to get further insights on the transport mechanisms possibly involved in Cd uptake, two important divalent cations for osteoblastic functions (Purroy and Spurr 2002), e.g. Ca and Mg, were tested for their putative inhibitory effect. Figure 2a shows that high concentrations of Ca or Mg in the transport medium significantly reduced ¹⁰⁹Cd uptake in MG 63 and undifferentiated MC3T3 cells while only Mg had significant effect in U2 OS cells. However, accumulation levels recorded following a 24-h exposure to ¹⁰⁹Cd in the serum-free media also revealed inhibitory effects by either Ca or Mg or both (Fig. 2c). Also, lower LC₅₀ values were obtained following exposure to Cd under low extracellular concentration of Ca (0.1 mM), whereas no difference could be noted in U2 OS cells (Fig. 2b). On the other hand, Mg-free conditions of exposure lowered the LC₅₀ values in the three cell lines. These observations suggest that Cd uptake in MC3T3 and MG 63 cells may involve Ca transport mechanisms, whereas Mg transport mechanisms could also participate in Cd uptake in the three cell lines.

Involvement of VDCCs in Cd uptake and cytotoxicity

Some investigators have reported the involvement of VDCC in Cd uptake in various cell types including neuronal (Usai *et al* 1999), pituitary (Hinkle *et al* 1992, 1987), renal (Endo *et al* 2003) and hepatic cells (Long 1997). To verify

whether a comparable trend was found in osteoblasts, uptake measurements were performed under high K^+ conditions known to activate VDCC channels. In order to validate these conditions, ^{45}Ca uptake experiments were conducted in the three cell lines under both basal and high- K^+ depolarisation conditions. Higher levels of accumulation were obtained with the U2 OS and MC3T3 cells (Fig. 3a, open columns). Moreover, in all cell lines, the uptake was enhanced under high K^+ condition (150 mM) (Fig. 3a, filled columns). However, depolarisation had an impact on neither ^{109}Cd uptake (Fig. 3b) nor Cd cytotoxicity (Fig.3c). These results exclude VDCCs as important uptake mechanisms for Cd in osteoblast-like cells.

Involvement of TRPCs in Cd uptake and cytotoxicity

Though VDCC are unlikely to be involved in Cd uptake in osteoblast-like cells, Ca seemed to be a potent inhibitor, leading to the hypothesis that other Ca pathways might be of importance. The expression of numerous transient receptor potential (TRP) channels has been confirmed by colleagues in osteoblast-like cell lines (Abed and Moreau 2007, Labelle *et al* 2007). TRPC channels are typically associated with capacitative Ca entry (CCE), a mechanisms activated by thapsigargin (TG) and inhibited by SKF96365 (Hermosura *et al* 2002). Our results show that TG did not significantly affect either Cd cytotoxicity (Fig. 4a) or the 24-h accumulation level of ^{109}Cd in either cell lines (Fig.4b). However, SKF96365 seemed to slightly sensitize MC3T3 and MG 63 cells to Cd cytotoxicity (Fig. 4a) without having any significant impact on accumulation (Fig. 4b). According to these results, neither TG nor SKF96365 affected the 24-h or 3-min accumulation of Cd (Fig.4b,c). Therefore, TRPC channels are also unlikely to be involved in Cd uptake, and toxicity.

Effect of 2-APB and Mg-starvation on Cd uptake and cytotoxicity

Calcium is not the only ion transported by TRP channels. Several studies underscored the affinity of some TRPM channels for Mg (Schlingmann and Gudermann 2005, Konrad *et al* 2004). Since our results do not support the

involvement of TRPC channels in Cd uptake, another TRP modulator, 2-APB, reported to inhibit TRPC and TRPM channels and to activate TRPV1-2-3 channels (Hu *et al* 2004), was also tested. As illustrated in Fig. 5a, 100 μ M 2-APB had no impact on Cd-induced cell death in MC3T3 cells but protected to some extent MG 63 cells (LC_{50} of 41.0 ± 1.2 vs 23.4 ± 1.1 μ M in the presence or the absence of 2-APB, respectively) and U2 OS cells (LC_{50} of 44.9 ± 1.1 vs 35.7 ± 1.2 μ M in the presence or the absence of 2-APB, respectively) against Cd toxicity. Accordingly, 2-APB also reduced the 24-h cellular accumulation of ^{109}Cd in both MG 63 and U2 OS cell lines, but not in MC3T3 cells (Fig. 5b). Moreover, the 3-min uptake of ^{109}Cd was reduced in the presence of 2-APB, this effect being significant in Mg-free media (-) (Fig. 5c).

Genic expression of TRPM and TRPV channels

As 2-APB modulates Cd accumulation and toxicity in the MG 63 and U2 OS, but not in the MC3T3 cells, we investigated whether murine and human cells express various TRPM channels. Our RT-PCR analyses revealed that the TRPM1 channel was expressed in the MC3T3 cells only, TRPM3 was present only in both human cell lines, whereas TRPM4, TRPM6, TRPM7 and TRPM8 were detected in the three cell lines (Fig. 6). Keeping in mind that 2-APB is also a TRPV1-2-3 agonist (Neeper *et al* 2007, Hu *et al* 2004), we also studied the expression of these channels. The only 2-APB-sensitive member of the TRPV class detected was TRPV2 in the three cell lines.

DISCUSSION

Though Cd has been shown to cause bone disorders at non nephrotoxic exposure levels, its uptake mechanisms remain to be identified in osteoblasts. Sensitivity to Cd and levels of accumulation were compared in different osteoblast-like cell lines, the MC3T3, a murine osteoprogenitor-like cell line, the MG 63 and U2 OS, two human preosteoblast-like cell lines. Both parameters were found to differ amongst the cell lines studied; furthermore, the impact of extracellular Ca and Mg or TRP channel modulators was also found to vary between cell lines, underscoring either species- or differentiation-related differences. To further investigate the involvement of TRP channels in these osteoblast-like cells, their expression was studied in each cell line by semi-quantitative RT-PCR. The TRP gene expression profile was found to be different between cell lines; the impact these differences have on Cd uptake and subsequent cytotoxicity remains to be determined.

Murine osteoprogenitor cells are more sensitive to Cd

To better characterize the toxicity of Cd in osteoblasts, 3 different cellular models all exhibiting an osteoblast-like phenotype at various degrees of maturity were used: the murine MC3T3 cell line and the two human cell lines MG 63 and U2 OS. The MC3T3 cell line is by far the most sensitive, followed by MG 63 and U2 OS, respectively (Fig. 1a). The human preosteoblast-like MG 63 and U2 OS cell lines display a more mature phenotype than their murine counterpart (Sorkin *et al* 2004); the differentiation status might have an impact on cell sensitivity. The LC₅₀ values obtained were similar to those observed in other cell types, notably the human hepatoma cell lines PLC/PRF5 (13 µM) and HepG2 (24 µM) (Shimoda *et al* 2001), with LC₅₀ close to that of MC3T3 and MG 63 cells respectively, as well as the cervical adenocarcinoma cells HeLa (32 µM) and Chang (28 µM), (Othumpangat *et al* 2005), for which LC₅₀ values are closer to the one estimated for the U2 OS cells. The phenotype itself does not seem to affect cell sensitivity to

Cd; therefore, cell maturity may have a deeper impact than the tissue or species of origin.

VDCC do not contribute appreciably to Cd uptake and cytotoxicity

In some cell types, VDCC have been reported to significantly participate in Cd uptake (Endo *et al* 2003, Usai *et al* 1999, Long 1997, Hinkle *et al* 1992, 1987). Our results show the presence of functional VDCC channels in the three cell lines (Fig. 3a). Their expression and functions have previously been demonstrated by our team in MG 63 cells (Labelle *et al* 2007). Herein we show that exposure conditions leading to higher uptake of Ca do not modify Cd uptake levels (Fig. 3b) or cytotoxicity (Fig. 3c). Taken together, these results suggest that VDCC do not contribute appreciably to Cd uptake in osteoblast-like cells, either from murine or human origin. Cadmium has been largely used as a VDCC inhibitor (Usai *et al* 1999); it was also shown to permeate across these channels. It has a higher affinity for L-type VDCC compared to Ca, therefore blocks its passage, yet two Cd²⁺ ions simultaneously occupy the binding site resulting in a moderate Cd influx (Usai *et al* 1999). Since VDCC were reported to participate in Cd uptake in some other cell types, it is possible that osteoblasts express a VDCC subtype not permeable to this ion or, more likely, that the higher contribution of some other transport mechanisms hinders VDCC's participation.

Ca and Mg reduce Cd accumulation and toxicity

Because our results revealed that Cd uptake is insensitive to membrane depolarisation, uptake mechanisms other than VDCC were investigated. Calcium and Mg were both found to be potent inhibitors of Cd uptake in MG 63 and MC3T3 cells, while only Mg had a significant effect on Cd uptake in U2 OS cells (Fig. 2a). These results are consistent with the increased cell sensitivity observed following exposure to Cd in Ca- or Mg-deprived media (Fig. 2b). Moreover, other studies showed that Ca and Mg deficiency may lead to osteoporosis in humans (Nieves 2005) and rats (Stendig-Lindberg 2004, Geng and Wright 2001). Interestingly, while the presence of extracellular Ca increased Cd LC₅₀ values in

MG 63 cells, thus lowered MG 63 cells sensitivity to Cd, Ca had no impact on the 24-h cellular accumulation of Cd (Fig. 2b). Note that following a 24-h exposure to Cd, in addition to membrane transport processes the cellular accumulation is the result of a number of processes including Cd binding to intracellular proteins, the synthesis of which may be up-regulated (Liu *et al* 2004, Erfurt *et al* 2003, Habeebu *et al* 2000). It remains unclear whether Ca and Mg act on distinct or similar channels, but differences in their respective effect on Cd uptake in the three cell lines studied suggest that a Ca sensitive mechanism would be present in MG 63 and MC3T3 but not in U2 OS cells.

Evidence for the involvement of TRP channels in Cd uptake and toxicity

A largely expressed mechanism of regulation of intracellular levels of Ca is capacitative Ca entry (CCE). This type of Ca influx is most often associated with TRPC channels (Hermosura *et al* 2002). The activation of CCE implies Ca release from the endoplasmic reticulum and subsequent activation of membrane TRPC channels (Hermosura *et al* 2002). To determine whether TRPC channels are involved in Cd uptake and subsequent cytotoxicity in osteoblast-like cell lines, TG and SKF96365 were used as a TRPC activator and inhibitor, respectively. Although we have previously shown the presence of functional TRPC channels in these cell lines (Abed et Moreau 2007, Labelle *et al* 2007), TG and SKF96365 did not affect Cd uptake, but the latter sensitised MC3T3 and MG 63 cells to Cd (Fig. 4). This compound has been reported to also inhibit TRPV2 channels (Clapham *et al* 2003); other unspecific or unidentified targets may contribute to the observed effect. Thus, it is unlikely that TRPC channels contribute appreciably in Cd uptake in osteoblast-like cells.

While TRPC modulators had little impact on Cd uptake, the TRPC/TRPM inhibitor 2-APB significantly protected the two human cell lines against Cd toxicity in the absence of Mg (Fig. 5a,b). Li and colleagues (2006) have demonstrated the inhibition of heterologously expressed TRPM7 channel activity by micromolar concentrations of this compound. Moreover, the expression and

activity of these channels were shown to be modulated by Mg (Abed and Moreau 2007, Schlingmann and Gudermann 2005, Gwanyanya *et al* 2004, Jiang *et al* 2003). This suggests that TRPM7 channels may participate in Cd uptake in human osteoblastic cells. Despite the lack of effect of 2-APB on Cd uptake in MC3T3 cells, the possible involvement of TRPM channels cannot be excluded. Indeed, a recent report states the differences in TRPV2 activation mechanisms between murine and human cells, rendering the human channel insensitive to 2-APB (Neeper *et al* 2007). It is conceivable that the activation of TRPV2 in MC3T3 cells could hinder the 2-APB-induced inhibition of TRPM. The expression of TRPV2 has been observed in the three cell lines studied (Fig. 6). Its presence could explain the absence of a protective effect by 2-APB against Cd toxicity in mouse cells. Its functionality remains to be demonstrated in the cell lines studied.

To test the possible implication of TRPM in Cd uptake, their expression has been investigated using RT-PCR: TRPM2 and TRPM5, associated with sensitivity to redox status and taste perception, respectively (Konrad *et al* 2004), were not observed in any of the cell lines studied. TRPM4, M6, M7 and M8 were found to be present in the three cell lines. Little information is available about TRPM4 and M8 channels properties, however a growing number of studies indicate that TRPM6 and M7 can transport Cd (Li *et al* 2006, Monteihl-Zoller *et al* 2003). Interspecies differences may be responsible for the differential expression of TRPM1. Though it was the first of its class to be identified, TRPM1 remains poorly characterized in terms of pharmacology and no agent has been identified as a specific modulator of its activity (Harteneck 2005). This channel is mainly associated with cell proliferation and promotion of benign melanomas, but was shown to be repressed in aggressive melanomas (Miller *et al* 2004). Its expression in MC3T3 cells is likely to be related to the immature phenotype of this cell line, originally harvested from fetal mouse calvaria, since it was reported to be constitutively expressed in embryonic tissues (Harteneck 2005). Like TRPM6 and M7, which genes share a significant degree of homology, TRPM1 may transport Ca and Mg (Harteneck 2005, Fleig and Penner 2004, Huang 2004).

Though its functions remain to be characterized in osteoblasts, TRPM1 may influence murine cells' sensitivity to Cd compared to human cells.

Conclusion

Our results revealed differences in Cd uptake and toxicity between the MG 63, U2 OS and MC3T3 cells suggesting to focus future studies on various transport mechanisms possibly involved in metal accumulation in osteoblasts. The inhibitory effect of extracellular Mg and 2-APB observed in the human cells suggests the participation of TRPM6 and M7 channels in Cd uptake in this cell type (Li *et al* 2006, Jiang *et al* 2003). However, the lack of protective effect of 2-APB in the murine cell line unveils the possible involvement of the TRPV2 channel, which is selectively activated by 2-APB in murine cells (Neeper *et al* 2007). These results reveal important inter-species differences in Cd uptake mechanisms and cell sensitivity. Moreover, the expression of TRPM1 in osteoblastic cells may be related to the differentiation status, since only the immature cell line MC3T3 was shown to express it. In humans, TRPM1 mRNA is expressed throughout embryogenesis, but it was reported to be limited to skin and eye tissues in adults (Harteneck 2005). Its absence from human cell lines is therefore not species-related; however, TRPM1 was found not to be expressed in malignant or metastatic melanomas, and might be inherent to the osteosarcomic nature of the MG 63 and U2 OS cells (Miller *et al* 2004).

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

References

- Abed E, Moreau R (2007), Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation, *Cell Prolif.* 40: 849-865
- Alfven T, Elinder CG, Carlsson MD, Grubb A, Hellstrom L, Persson B, Pettersson C, Spang G, Schutz A, Jarup L (2000), Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 15: 1579-1586
- Alfven T, Jarup L, Elinder CG (2002), Cadmium and lead in blood in relation to low bone mineral density and tubular proteinuria, *Environ. Health Perspect.* 110:699-702
- Athanasou NA (1996), Current Concepts Review - Cellular Biology of Bone-Resorbing Cells, *J Bone Joint Surg Am* 78: 1096-1112
- Bannon DI, Abounader R, Lees PS, Bressler JP (2003), Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells, *Am.J Physiol Cell Physiol* 284: C44-C50
- Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J (2004), Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure. *Toxicol. Sci.* 82: 468-477.
- Canalis E (2003), Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis, *Curr.Opin.Rheumatol.* 15: 454-457
- Chalkley SR, Richmond J, Barltrop D (1998), Measurement of vitamin D3 metabolites in smelter workers exposed to lead and cadmium, *Occup.Environ.Med.* 55: 446-452
- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D (2003), International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels, *Pharmacol.Rev.* 55: 591-596
- Dohi Y, Sugimoto K, Yoshikawa T, Ohgushi H, Katsuda T, Tabata S, Moriyama T (1993), Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells: biochemical evidence of decreased bone formation capacity, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 120: 274-280
- Elisma F, Jumarie C (2001), Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells, *Biochem Biophys.Res.Commun.* 285: 662-668

- Endo T, Kimura O, Sakata M (2002), Effects of P-glycoprotein inhibitors on cadmium accumulation in cultured renal epithelial cells, LLC-PK1, and OK, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 185: 166-171
- Erfurt C, Roussa E, Thevenod F (2003), Apoptosis by Cd²⁺ or CdMT in proximal tubule cells: different uptake routes and permissive role of endo/lysosomal CdMT uptake, *Am.J Physiol Cell Physiol* 285: C1367-C1376
- Fleig GA, Penner R (2004), The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features, *TRENDS in Pharmacological Sciences* 25(12): 633-639
- Foulkes EC (2000), Transport of toxic heavy metals across cell membranes, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 223: 234-240
- Geng W, Wright GL (2001), Skeletal sensitivity to dietary calcium deficiency is increased in the female compared with the male rat, *Can. J Physiol. Pharmacol.* 79: 379-385
- Gwanyanya A, Amuzescu B, Zakharov SI, Macianskiene R, Sipido KR, Bolotina VM, Vereecke J, Mubagwa K (2004), Magnesium-inhibited, TRPM6/7-like channel in cardiac myocytes: permeation of divalent cations and pH-mediated regulation, *J. Physiology* 559(3): 761-776
- Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD (2000), Metallothionein-null mice are more susceptible than wild-type mice to chronic CdCl₂-induced bone injury, *Toxicol.Sci.* 56: 211-219
- Harteneck C (2005), Function and pharmacology of TRPM cation channels, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371: 307-314
- Hermosura MC, Monteilh-Zoller MK, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2002), Dissociation of the store-operated calcium current ICRAC and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNum, *Journal of Physiology* 539(2): 445-458
- Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC (1987), Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels, *J Biol.Chem.* 262: 16333-16337
- Hinkle PM, Shanshala ED, Nelson EJ (1992), Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake, *J Biol.Chem.* 267: 25553-25559
- Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX (2004), 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3, *J. Biol. Chem.* 279: 35741-35748

- Huang CL (2004), The transient receptor potential superfamily of ion channels, *J Am.Soc.Nephrol.* 15: 1690-1699
- Jadlowiec J, Koch H, Zhang X, Campbell PG, Seyedain M, Sfeir C (2004), Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway, *J Biol.Chem.* 279: 53323-53330
- Janssens K, Van Hul W (2002), Molecular genetics of too much bone, *Hum.Mol.Genet.* 11: 2385-2393
- Jarup L (2002), Cadmium overload and toxicity, *Nephrol.Dial.Transplant.* 17 Suppl 2: 35-39
- Jiang X, Newell EW, Lyanne C. Schlichter LC (2003), Regulation of a TRPM7-like current in rat brain microglia, *J Biol. Chem.* 278(44): 42867-42876
- Jiang D, Franceschi RT, Boules H, Xiao G (2004), Parathyroid hormone induction of the osteocalcin gene. Requirement for an osteoblast-specific element 1 sequence in the promoter and involvement of multiple-signaling pathways, *J Biol.Chem.* 279: 5329-5337
- Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell PG, Denizeau F (2001), Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of Cd complexation by chloride, glutathione, and phytochelatins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170: 29-38.
- Katsuta O, Hiratsuka H, Matsumoto J, Iwata H, Toyota N, Tsuchitani M, Umemura T, Marumo F (1994), Cadmium-induced osteomalacic and osteopetrotic lesions in ovariectomized rats, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 126: 58-68
- Kil IS, Shin SW, Yeo HS, Lee YS, Park JW (2006), Mitochondrial NADP⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Protects Cadmium-Induced Apoptosis, *Molecular Pharmacology* 70(3): 1053-1061
- Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, Cho JY, Ryoo HM (2004), Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2, *J Biol.Chem.* 279: 50773-50780
- Kim BJ, Kim MS, Kim KB, Kim KW, Hong YM, Kim IK, Lee HW, Jung YK (2002), Sensitizing effects of cadmium on TNF- α - and TRAIL-mediated apoptosis of NIH3T3 cells with distinct expression patterns of p53, *Carcinogenesis* 23(9): 1411-1417
- Konrad K, Schlingmann KP, Gudermann T (2004), Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis, *Am J Am Renal Physiol* 286: F599-F605

- Labelle D, Jumarie C, Moreau R (2007), Capacitative calcium entry and proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells, *Cell Prolif.* 40: 866-884
- Lerner UH (2006), Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis, *J Dent.Res.* 85: 584-595
- Lerner UH (2004), New molecules in the tumor necrosis ligand and receptors superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption, *Crit Rev Oral Biol Med* 15(2): 64-81
- Li M, Jiang J, Yue L (2006), Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7, *J Gen.Physiol* 127: 525-537
- Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N (2002), p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function, *Endocrinology* 143: 3105-3113
- Liu AL, Zhang ZM, Zhu BF, Liao ZH, Liu Z (2004), Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation, *Cell Biol.Int* 28: 905-911
- Long GJ (1997), Cadmium perturbs calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells; a possible role for protein kinase C, *Toxicol.Lett.* 91: 91-97
- Manolagas SC (2000), Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr.Rev.* 21: 115-137
- Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den BC, Thiede M (1999), Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors, *Endocrinology* 140: 3736-3743
- Miller AJ, Du J, Rowan S, Hershey CL, Widlund HR, Fisher DE (2004), Transcriptional Regulation of the Melanoma Prognostic Marker Melastatin (TRPM1) by MITF in Melanocytes and Melanoma, *Cancer Research* 64, 509-516
- Miyahara T, Tonoyama H, Watanabe M, Okajima A, Miyajima S, Sakuma T, Nemoto N, Takayama K (2001), Stimulative effect of cadmium on prostaglandin E2 production in primary mouse osteoblastic cells, *Calcif.Tissue Int* 68: 185-191

- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003), TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions, *J Gen. Physiol* 121: 49-60
- Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (2007), Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence, *J Biol. Chem.* 282: 15894-15902
- Nieves JW (2005), Osteoporosis: the role of micronutrients, *Am. J Clin. Nutr.* 81: 1232S-1239S
- Othumpangat S, Kashon M, Joseph P (2005), Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride, *Journal of Biological Chemistry* 80(26): 25162-25169
- Park JD, Cherrington NJ, Klaassen CD (2002), Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats, *Toxicological Sciences* 68: 288-294
- Pischon N, Darbois LM, Palamakumbura AH, Kessler E, Trackman PC (2004), Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor-alpha in osteoblasts, *J Biol. Chem.* 279: 30060-30065
- Purroy J, Spurr NK (2002), Molecular genetics of calcium sensing in bone cells, *Human Molecular Genetics* 11(20): 2377-2384
- Raisz LG (2005), Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, *J Clin. Invest* 115: 3318-3325
- Raisz LG (1999), Physiology and pathophysiology of bone remodeling, *Clin. Chem.* 45: 1353-1358
- Rosker C, Graziani A, Lukas M, Eder P, Zhu MX, Romanin C, Groschner K (2004), Ca(2+) signaling by TRPC3 involves Na(+) entry and local coupling to the Na(+)/Ca(2+) exchanger, *J Biol. Chem.* 279: 13696-13704
- Schlingmann KP, Gudermann T (2005), A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport, *J Physiol* 566: 301-308
- Shimoda R, Nagamine T, Tagaki H, Mori M, Waalkes MP (2001), Induction of apoptosis in cells by cadmium: quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate, *Toxicological Sciences* 64: 208-215
- Sorkin AM, Dee KC, Knothe Tate ML (2004), "Culture shock" from the bone cell's perspective: emulating physiological conditions for mechanobiological investigations, *Am. J Physiol Cell Physiol* 287: C1527-C1536

- Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J, Fagard R (1999), Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group, *Lancet* 353: 1140-1144
- Stendig-Lindberg G, Koeller W, Bauer A, Rob PM (2004), Experimentally induced prolonged magnesium deficiency causes osteoporosis in the rat, *Eur.J Intern.Med.* 15: 97-107
- Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C (1999), Pathways of cadmium influx in mammalian neurons, *J Neurochem.* 72: 2154-2161
- Wilson AK, Cerny EA, Smith BD, Wagh A, Bhattacharryya MH (1996), Effects of cadmium on osteoclast formation and activity *in vitro*, *Toxicology and Applied Pharmacology* 140: 451-460
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000), Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1, *Endocrine Reviews* 21(4): 393-411

Figure 1. Martineau et al.

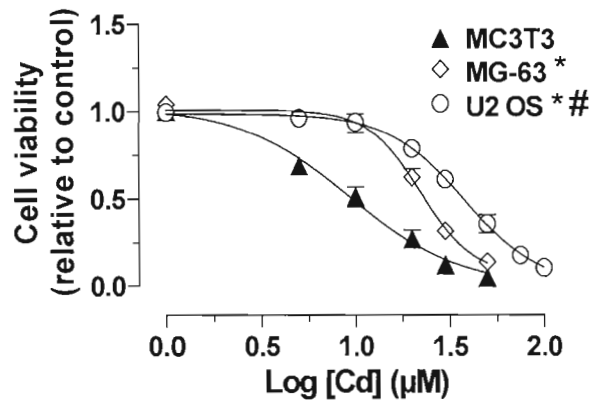


Fig. 1. LC₅₀ values determination in three osteoblast-like cell lines exposed to Cd. Dose-response curves to Cd for MC3T3 (▲), MG 63 (◇) and U2 OS (○) cell lines exposed to increasing concentrations (0-200 μM) of Cd for 24h in a serum-free culture medium. Significant difference (* p < 0.0001 versus MC3T3; # p < 0.0001 versus MG 63, 2-way ANOVA).

Figure 2. Martineau et al

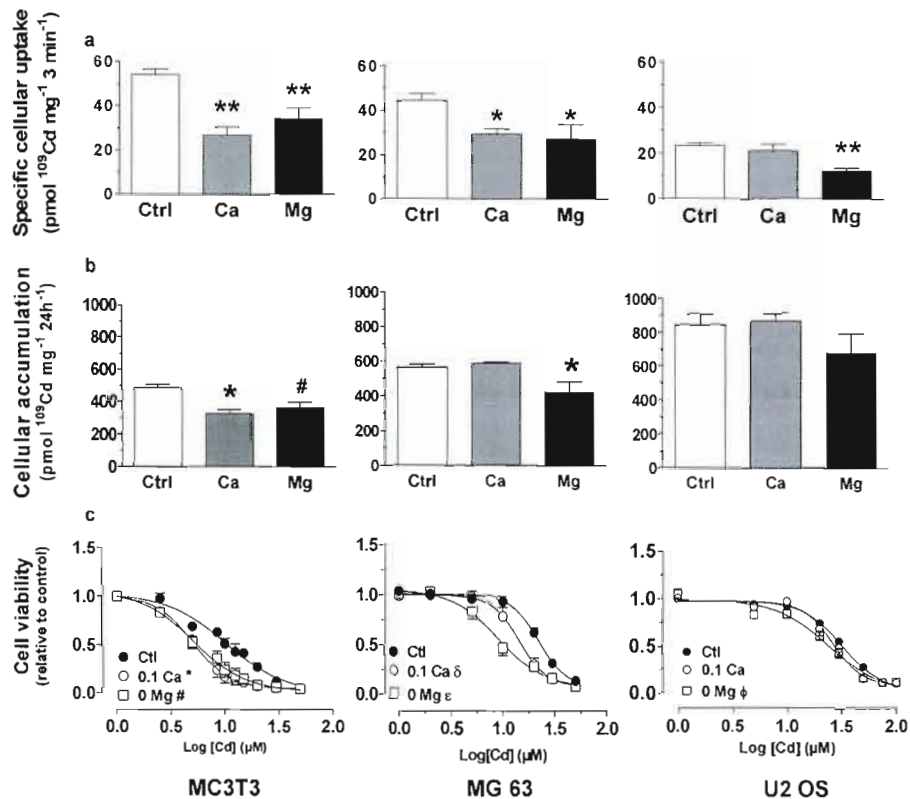


Fig. 2. Impact of Ca and Mg in Cd uptake and cytotoxicity in osteoblast-like cell lines. (a) The initial 3-min uptake of 0.5 μ M Cd in the MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines measured in the absence (Ctrl) or in the presence of 5 mM Ca or 2.5 mM Mg. Significant difference (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus control, Dunnett). (b) 24-h cellular accumulation of 0.5 μ M Cd measured in the presence of 5 mM Ca or 2.5 mM Mg in the incubation media in MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines, respectively. Significant difference (* $p < 0.01$, # $p < 0.05$ versus control, Dunnett). (c) Dose-response curves to Cd for control (●), Ca-starved (○) or Mg-starved (□) MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines, respectively. Significant difference (* $p = 0.0005$; # $p = 0.0233$; $\delta p = 0.0128$; $\epsilon p < 0.0001$; $\Phi p = 0.0070$ versus control, 2-way ANOVA).

Figure 3. Martineau et al.

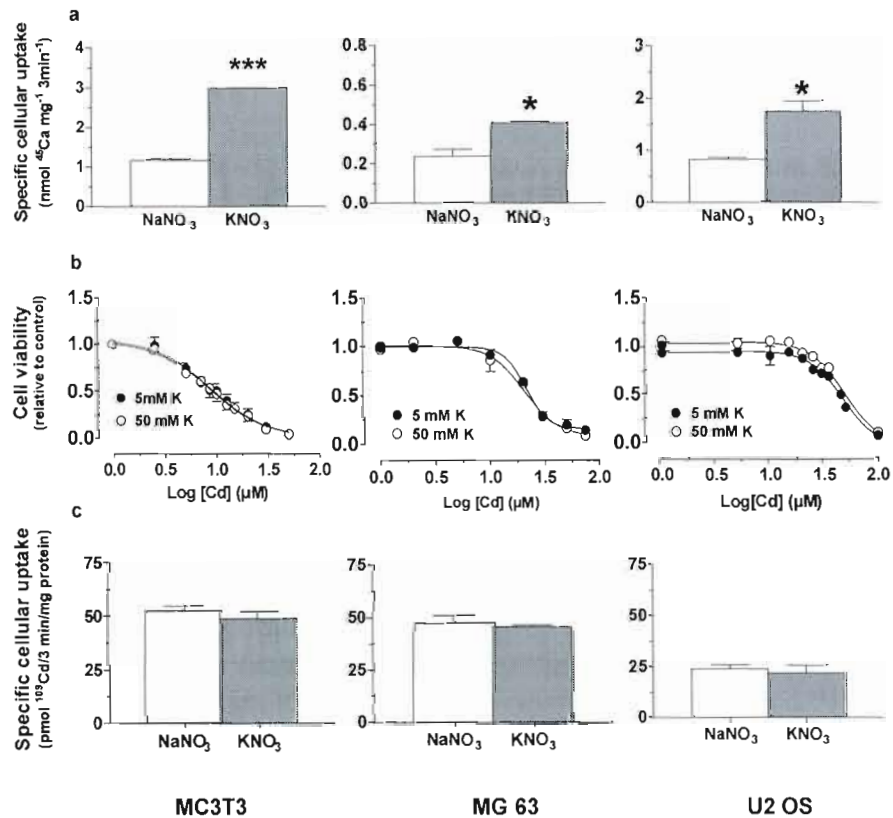


Fig. 3. Impact of potassium-induced membrane depolarisation in uptake and Cd cytotoxicity in osteoblast-like cell lines. (a) The initial 3-min uptake of 0.5 mM ^{45}Ca in MG 63, U2 OS and MC3T3 cell lines measured under standard Na or high K exposure conditions. Significant difference (* $p = 0.0476$; ** $p = 0.0105$; *** $p < 0.0001$ versus NaNO₃, 2-tailed unpaired t test). (b) Dose-response curves to Cd for MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines measured in standard (●) or high potassium (○) conditions. (c) The initial 3-min uptake of 0.5 μM ^{109}Cd in the MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines measured under standard Na or high K exposure conditions.

Figure 4. Martineau et al

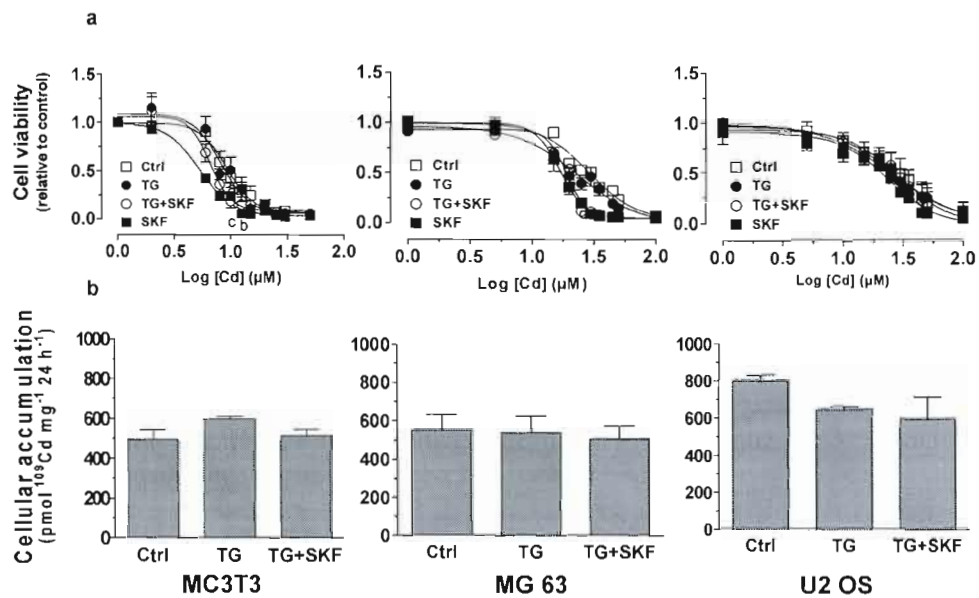


Fig. 4. Impact of TG and SKF on Cd cytotoxicity and accumulation in osteoblast-like cell lines. (a) Dose-response curves to Cd for MC3T3, MG 63 and U2 OS cells measured under control conditions (\square) or in the presence of TG (\bullet) and/or SKF (\circ/\blacksquare). **(b)** 24-h accumulation of $0.5\mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in the MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines in the presence of TG and/or SKF.

Figure 5. Martineau et al.

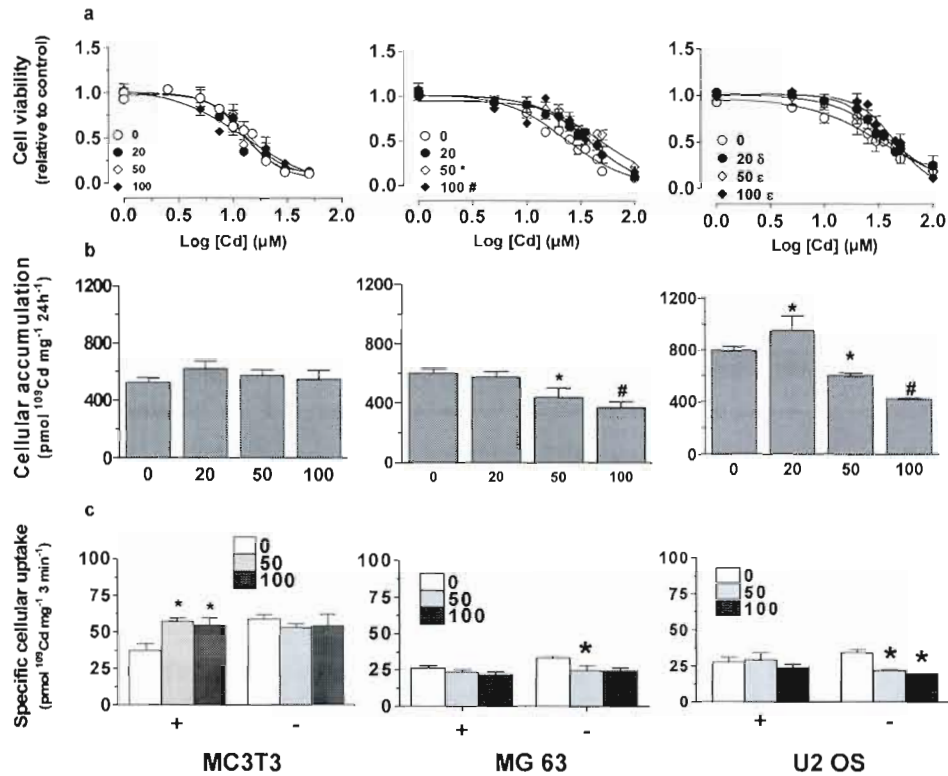


Fig. 5. Impact of 2-APB on Cd cytotoxicity and accumulation in osteoblast-like cell lines. (a) Dose-response curves to Cd for MC3T3, MG 63 and U2 OS cells measured under control conditions (○) or in the presence of 20 (●), 50 (◇) or 100 μM (◆) 2-APB. Significant difference (* p = 0.0087; # p = 0.0004; δ p = 0.0001; ϵ p < 0.0001 versus control, 2-way ANOVA). (b) 24-h accumulation of 0.5 μM ^{109}Cd in the MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines in the presence of various concentrations (0-100 μM) of 2-APB. Significant difference (* p < 0.05; # p < 0.01 versus 0 2-APB, Bonferoni). (c) 3-min uptake of 0.5 μM ^{109}Cd in MC3T3, MG 63 and U2 OS cells in the presence of various concentrations (0-100 μM) of 2-APB, with (+) or without (-) 1.2 mM Mg. Significant difference (* p < 0.05 versus 0 2-APB, Bonferoni).

Figure 6. Martineau et al

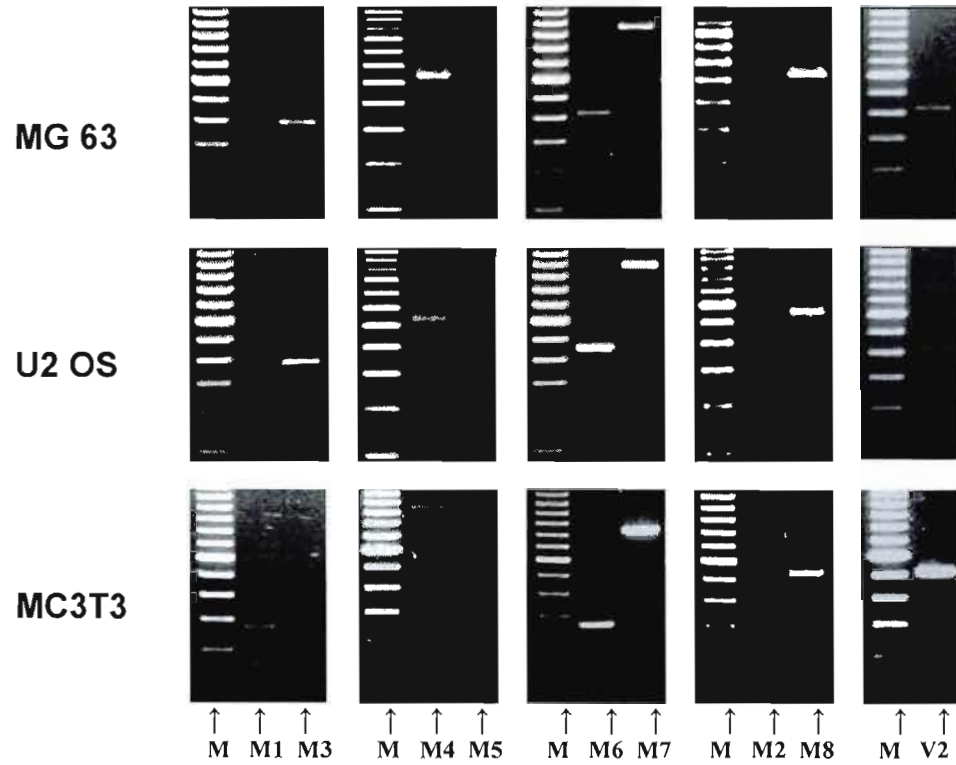


Fig. 6. Gene expression of TRPM and TRPV channels in the 3 cell lines studied. RT-PCR reactions were performed following total RNA extraction from the MC3T3, MG 63 and U2 OS cell lines. Specific primers for TRPM1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 and V2 were used (see Tab.I in Methodology). M = Molecular weight marker (100 bp).

2.2. Deuxième article: IMPACT OF MC3T3 OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION ON CELLULAR CADMIUM ACCUMULATION AND CYTOTOXICITY

Ce second article s'intitule *Impact of MC3T3 osteoblastic differentiation on cellular cadmium accumulation and cytotoxicity* (Impact de la différenciation ostéoblastique des MC3T3 sur l'accumulation cellulaire et la cytotoxicité du cadmium) et constitue le cœur de ma maîtrise au laboratoire de Dr. Moreau. C'est effectivement le projet initial que j'ai entrepris en débutant en septembre 2005. Je suis la première auteure l'article, qui présente mes travaux de recherche avec la contribution de Guillaume Médina, ayant complété un stage de formation pratique parmi nous de mai à août 2007. Robert Moreau et Catherine Jumarie apparaissent également dans la liste des auteurs.

La littérature concernant la sensibilité au Cd en fonction de la différenciation est très pauvre; les quelques études existantes se penchent plutôt sur l'impact du Cd sur la différenciation elle-même. De plus, les études concernant la cytotoxicité de cet élément sur les cellules ostéoblastiques sont également peu nombreuses; les effets néfastes de ce toxique sur les os ont longtemps été attribués à des mécanismes systémiques indirects impliquant la vitamine D₃. Étant donné l'impact direct du Cd sur le compartiment osseux de plus en plus évident, le cœur de cet article concerne la sensibilité au Cd des ostéoblastes en fonction de leur stade de différenciation. En effet, le milieu physiologique de la moelle osseuse comprend des populations hétérogènes de cellules ostéoblastiques à divers degrés de maturité. Je me suis donc penchée sur la question à savoir si une de ces populations était plus sensible que les autres. Cependant, la différenciation est un processus progressif n'affichant pas de stades discontinus; ceux étudiés dans ce travail sont donc arbitraires et limités par les méthodes de détection utilisées.

La caractérisation des cellules MC3T3 non différenciées a principalement été accomplie par Guillaume Médina, étudiant de l'Université de Dijon, France; je tiens à souligner son importante contribution à ce travail. Toutes les autres manipulations ont été accomplies par moi-même dans les laboratoires de Dr. Moreau et Dr. Jumarie. Le présent écrit est grandement inspiré des résultats présentés lors du congrès de l'*International Bone and Mineral Society* (Société Internationale des Os et Minéraux) en 2007 (voir Annexe A). Cet article sera d'ailleurs prochainement soumis à la revue *Toxicology and Applied Pharmacology*, ayant un facteur d'impact de 4.73 en 2008.

**IMPACT OF MC3T3 OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION ON
CELLULAR CADMIUM ACCUMULATION AND CYTOTOXICITY**

Corine Martineau¹, Guillaume Médina¹, Catherine Jumarie² and Robert Moreau^{1*}

1. Laboratoire du Métabolisme osseux, BioMed, UQÀM,
2. Laboratoire de Toxicologie cellulaire des métaux, Toxen, UQÀM,
Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal
Montréal, Qc, Canada H3C 3P8

Running title: Cd uptake and cytotoxicity in human and murine osteoblasts

Keywords: osteoblasts; differentiation; extracellular matrix; cadmium;
cytotoxicity; calcium; magnesium; voltage-dependent calcium
channel

*To whom correspondence should be addressed:

Robert Moreau, PhD
Assistant professor
Département des sciences biologiques
Université du Québec à Montréal
CP 8888, succ Centre-Ville
Montreal (Quebec)
Canada H3C 3P8
E-mail : moreau.robort@uqam.ca

ABSTRACT

Introduction. Exposure to the heavy metal cadmium (Cd) has been shown to disrupt bone metabolism, causing diseases such as osteoporosis. The underlying mechanisms are mostly attributed to alteration of renal vitamin D metabolism which consequently affects bone metabolism. However, recent studies support the hypothesis of a direct effect of Cd on bone cells at non nephrotoxic exposure levels.

Aims. The present study aimed at characterizing Cd cytotoxicity and uptake in cells at various states of osteoblastic maturity using the *in vitro* osteoblastic differentiation of the MC3T3-E1 cells.

Methods. Microtiter tetrazolium assays and ^{109}Cd uptakes were performed to characterize the effect of Cd on cell viability and the mechanism of cellular Cd entry, respectively, in cells with different levels of osteoblastic maturity. Studies were conducted as a function of extracellular concentrations of Ca or Mg, or of depolarisation induced by high concentrations of potassium (K).

Results. Cd promoted cell death in a dose-dependent manner with a basal 50% lethal concentration (LC_{50}) of $9.9 \pm 0.5\mu\text{M}$. Calcium and Mg starvation decreased LC_{50} values, but when present in the incubation medium they inhibited Cd uptake in undifferentiated cells. Potassium-induced depolarisation did not modify the LC_{50} or the kinetics of Cd uptake suggesting that VDCCs are not significantly involved in the cellular uptake of Cd. As cell cultures differentiation proceeded, a progressive increase in the LC_{50} was observed whereas the inhibitory effect of Ca and Mg on Cd uptake was lost. An increase of the non displaceable accumulation was revealed as a function of days in culture, suggesting that the secretion of extracellular matrix could be responsible for the apparent increase in LC_{50} value.

Conclusions. Cd uptake in undifferentiated MC3T3 cells is inhibited by Ca and Mg while VDCC are not responsible for the cellular accumulation of Cd. Moreover, Cd uptake and cytotoxicity are reduced in differentiated cultures; this decrease seems to be related to extracellular matrix secretion, and the consequent adsorption of Cd thus reducing heavy metal availability for cellular uptake.

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is a divalent toxic heavy metal showing calcium- and zinc-mimetic properties (Ballatori 2002, Asmuss *et al* 2000, Goyer and Clarkson 1991). Originally a byproduct of zinc and lead ore extraction, its use for decades in the manufacturing of fungicides and batteries created significant industrial sources of emission. Once in the environment, Cd accumulates in soil as well as in plants and animals destined to human consumption (Henson and Chedrese 2004). Chronic low-level exposures to Cd have been linked to increased bone fragility and associated risk of fracture (Noël *et al* 2004, Staessen *et al* 1999). This metal has a long biological half-life of 15-30 years in humans, mainly because it is poorly excreted (Huff *et al* 2007). It may disrupt bone metabolism by an indirect and a direct toxic effect. In indirect toxicity, mostly associated with massive ingestion, circulating Cd affects cells in the renal proximal tubules, leading to decreased vitamin D₃ activation thus impairing the intestinal uptake of calcium (Ca) (Jarüp 2002, Chalkley *et al* 1998). Direct toxicity implies that Cd in the blood stream directly reaches the bone compartment to exert its direct toxic effects on the osteoblasts and the osteoclasts at doses not affecting the kidneys (Miyahara *et al* 2001, Long 1997, Wilson *et al* 1996). Furthermore, given the capacity of Cd to accumulate into bone (Wilson *et al* 1996), Cd present in this tissue may be released following bone remodelling to then exert toxic effects on bone cells. Therefore, direct toxicity mechanisms could include subsequent exposure linked to extracellular matrix (ECM) degradation.

In order to evaluate the impact of Cd on bone metabolism, the cellular processes involved in bone remodelling must be considered. Bone metabolism is mainly regulated by osteoblasts that differentiate from mesenchymal progenitor cells (MPCs) and whose major functions are secretion of ECM and its mineralization (Liu *et al* 2003, Calvo *et al* 1996), and osteoclasts originating from the fusion of hematopoietic precursors and that essentially degrade the old or damaged bone (Li *et al* 2002, Calvo *et al* 1996). The balance between bone formation and resorption is critical for controlled and constant remodelling of the

skeleton; any unbalance leads to a wide array of symptoms, ranging from osteopenia (bone mass deficit) to osteopetrosis (excessive bone density) (Manolagas 2000). Osteoblastic differentiation, *e. g.* the evolution of MPCs to osteoblasts, is a key element of remodelling. Any substance exerting deleterious effects on the differentiation process has a negative impact on the bone, as the renewal rate and lifespan of osteoblasts are crucial elements in both osteoblastic and osteoclastic activities (Manolagas 2000). Osteoblasts not only directly form bone but indirectly regulate its degradation by secreting two main factors: osteoprotegerin (OPG) and the receptor activator of NF κ B ligand (RANKL). The latter is strongly expressed by immature osteoblasts and is osteoclastogenic upon binding to the RANK receptor on osteoclastic cells; OPG is secreted by mature osteoblasts and acts as a soluble decoy receptor for RANKL, inhibiting its effects (Lerner 2004). Impaired osteoblastic differentiation therefore means altered bone formation and resorption.

A key parameter in Cd cytotoxicity is its cellular accumulation; no data are currently available concerning the mechanisms of uptake involved in Cd accumulation in osteoblastic cells. Voltage-dependent Ca channels (VDCCs) have been shown to be responsible for Cd uptake in renal, pituitary and hepatic cells (Endo *et al* 2002, Long 1997, Hinkle *et al* 1992, 1987). The iron transporter NRAMP2/DMT-1 has been shown to participate in Cd uptake by intestinal cells (Bannon *et al* 2003, Park *et al* 2002, Elisma and Jumarie 2001) and the «TRP-melastatin-related 7» (TRPM7) channel was found to be able to transport this ion in transfected HEK293 cells (Monteilh-Zoller *et al* 2003). However the involvement of either of these channels in Cd uptake by osteoblasts remains to be demonstrated and it is unknown how osteoblastic differentiation may modulate Cd uptake and toxicity. In the present study, we have characterized Cd uptake and toxicity in the murine MC3T3-E1 cells, used as an *in vitro* model for immature osteoblasts (Jadlowiec *et al* 2004, Pischon *et al* 2004). The possible implication of VDCCs in Cd uptake was also investigated through uptake measurements following high-potassium-induced membrane depolarisation. Furthermore, the use

of culture conditions promoting the osteoblastic differentiation of this cell line allowed us to study Cd transport and cytotoxicity as a function of differentiation status of OB.

METHODOLOGY

Cell line and differentiation treatment

The MC3T3-E1 cell line, subclone 4, (from the American Type Culture Collection, ATCC; Rockville, MD, USA) was maintained in complete alpha-modified minimum essential medium (alpha-MEM; Sigma, Oakville, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cansera, Etobicoke, Ontario, Canada), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. For culture maintenance, the cells were seeded at a density of 8 000 cells/cm² and subcultured every 7 days with an 0.05% trypsin-0.02% EDTA solution (Invitrogen) at 15 000 cells/cm².

At confluence, considered as day 0 (D0), generally 7 days post-seeding (15 000 cells/cm²), cells were induced to differentiate by incubation in a modified MEM medium (HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% FBS, 10 mM β-glycerophosphate (Sigma) and 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma). The medium was changed twice a week for a 28-day period. The differentiation was verified by measuring alkaline phosphatase activity as well as the mineralization potential at different time points.

Alkaline phosphatase activity and mineralization potential

The cells were rinsed twice with ice-cold PBS (0.1 g/l CaCl₂, 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH₂PO₄, 0.1 g/l MgCl₂, 8 g/l NaCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, pH 7.4), then dissolved in 150 µL of alkaline phosphatase buffer (100 mM glycine, 1 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, pH 10.5) for enzyme activity determination or fixed for 1h in 70% ice-cold ethanol (EtOH) for extracellular calcium quantification. Enzyme activity was estimated by measuring the conversion of *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP; Sigma) into *p*-nitrophenolate (*p*-NP) for 2 h; the optical density was read at 410 nm using a Tecan Spectra FluorPlus (Esbe Scientific Industries Inc. Canada) spectrophotometer and absorbance values were

analyzed relative to those of a p-NP standard (Sigma) (Moreau *et al* 1997). Five μL aliquots were used for protein quantification using the microBCA technique (Pierce, Rockford, IL, USA) using a BSA calibration curve. Results were expressed as nmol of p-NP produced per mg protein per hour. Mineralization was evaluated as described by Gregory *et al* (2004). Briefly, following a 30-min incubation in Alizarin Red S (ARS : 40 mM in a 10% (w/v) cetylpyridinium chloride [CPC] buffer dissolved in 10 mM Na_2PO_4 , pH adjusted to 4.1 prior to use; all from Sigma) at room temperature under agitation, the cells were washed 3 times for 30 min with 1mL of ultrapure water to remove excess dye. The colored cells were then incubated in 10% CPC buffer at room temperature for 1 h to solubilize the Ca-ARS complexes and the optical density was read at 575 nm. The values are expressed as percentage of mineralization relatively to control cells. The control consisted in undifferentiated cells cultured in MEM with 10% FBS.

Cytotoxicity

Cell survival following various exposure conditions was assessed using the microtiter tetrazolium (MTT) method. Briefly, the cells were exposed for 24 h to increasing concentrations of Cd. Two to 4 h prior to the end of the treatment, 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) was added at a final concentration of 0.5 mg/mL, the medium was then removed and the formazan crystals formed by live cells' activity were dissolved in DMSO (Sigma). The resulting level of purple coloration was considered to be directly proportional to cell viability and was read at 575 nm. The LC_{50} values obtained were compared to values observed in the presence of 0.1-1 mM CaCl_2 , 0-0.8 mM MgSO_4 or 50 mM KCl (high potassium depolarizing conditions. Results were expressed relative to control unexposed cells.

Cd and Ca transport

Transport experiments were conducted at room temperature in a chloride (Cl^-) or nitrate (NO_3^-) buffer containing (in mM): 10 HEPES, 4 D-glucose, 137 NaCl or $-\text{NO}_3$, 5.9 KCl or $-\text{NO}_3$ with or without 2.5 CaCl_2 or $-(\text{NO}_3)_2$ and/or 1.2

MgSO₄ adjusted to pH 7.4 with NaOH on both D0 and D28-cultures. The nitrate buffer was used to increase the concentration of Cd²⁺ species (in the chloride buffer only 14% of the total dissolved metal is present as Cd²⁺ compared to 85% in a nitrate buffer (Elisma and Jumarie 2001, Bergeron and Jumarie 2006). Depolarising conditions consisted in a 10-min preincubation in potassium chloride buffer (in mM: 10 HEPES, 4 D-glucose, 142 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, pH 7.4) prior to the measurement of uptake performed in the presence of 137 mM K⁺ in the nitrate buffer. All initial uptake measurements were corrected for non specific uptake ($k_p X [^{109}\text{Cd}]$) estimated in the presence of an excess (100 μM) of unlabeled Cd used as a competitive inhibitor of tracer uptake.

For transport experiments, the cells were seeded at 15 000 cells/cm² in 35 mm Petri dishes (Sarstedt, Montréal, Québec, Canada) and were serum-starved 24 h prior to experiment. The dishes were rinsed 4 times with 2 mL of chloride buffer (same as the nitrate buffer but containing chloride salts), then exposed for 3 min to 0.5 mM ⁴⁵Ca (5 μCi/μmol; GE Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada) or to 0.5 μM ¹⁰⁹Cd (0.3 μCi/pmol; Eckert & Ziegler, Berlin, Germany). Transport was stopped with 4 rinses of 2 mL of ice-cold STOP chloride buffer (containing 2 mM EDTA, pH 7.4). The cells were then lysed in 500 μL of NaOH 1N and 300-μL aliquots were kept for radioactivity determination using a gamma counter (Cobra II, Canberra Packard Canada) or scintillation counter (Wallac 1409 DSA, Wallac Oy, Turku, Finland). Fifty μl of the remaining samples were used to determine protein content using the Bradford Assay kit (BioRad) and the results were expressed as nmol of ⁴⁵Ca or pmol of ¹⁰⁹Cd accumulated over a 3-min period of time per mg protein, unless specified otherwise.

Measurement of Cd accumulation on ECM and Col I

The adsorption or binding of Cd on ECM secreted by D0 and D28 cell cultures was estimated following hypotonic shock by incubating cultures in 2 mL of ultrapure water until complete cell detachment and cell lysis. The remaining ECM in the petri dishes was exposed for 3-min to ¹⁰⁹Cd-labeled nitrate buffer. For

accumulation assays on Col I, petri dishes were incubated for 2 h at 37 °C with 1 mL of rat tail type I collagen (Col I) (2 mg/mL) (a kind gift from Dr. Borhane Annabi, UQÀM, Montréal, Canada), then dried for 24 h under UV irradiation prior to the 3-min exposure to ^{109}Cd -labeled nitrate buffer. In order to determine the “specific adsorption/binding” (e.g. the displaceable component) of ^{109}Cd , competition experiments were also conducted in the presence of 100 μM unlabeled Cd used as a specific inhibitor of tracer adsorption. These experiments were performed as described in the Ca and Cd transport section.

Statistical analysis

All experiments were performed on at least 3 independent cell cultures, each case in duplicate. Cell viability as a function of increasing concentrations of Cd was analyzed according to the dose-response Eq (1)

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + 10^{(\log LC_{50} - X) \cdot \text{Hillslope}}} \quad (1)$$

where Y_{\max} and Y_{\min} are the maximal and minimal ratio of cell viability, respectively, and LC_{50} is the concentration of Cd for which a cell viability ratio of 0.5 is observed.

The kinetic parameters of ^{109}Cd uptake were determined by analyses of the one-time point measurements at 3 min (v_3) according to the modified Michaelis-Menten Eq. (2)

$$v_3 = \frac{V_{\max} [^{109}\text{Cd}]}{K_m + [^{109}\text{Cd}] + [\text{Cd}]} + k_D [^{109}\text{Cd}] \quad (2)$$

where V_{\max} and K_m have their usual meaning, $[^{109}\text{Cd}]$ was set at 0.5 μM , whereas $[\text{Cd}]$ increased from 0 to 100 μM , and k_D represents the non-specific contributions to the 3-min uptake data.

Nonlinear regression analyses were performed with Prism 4 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA). The errors associated with the

parameter values given in the text represent the standard error of regression (SER). Statistical analyses were performed with the unpaired student's *t*-test or ANOVA with Bonferoni's post-test. Statistical significance was assessed at the $P < 0.05$ level.

RESULTS

Characterization of Cd uptake and cytotoxicity in the MC3T3-E1 cell line

In order to investigate to what extent MC3T3 cells may accumulate Cd, these cells were exposed to $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ for up to 24 h (Fig.1a). Cadmium accumulation was time-dependent and reached $524 \pm 54 \text{ pmol/mg protein}$ by 24 h. Cell viability following a 24-h exposure decreased with increasing concentrations of Cd in the medium (Fig.1b). Data analyses according to Eq (1) gave a LC_{50} value of $9.0 \pm 1.3 \mu\text{M}$. The impact of Cd speciation on Cd uptake was studied using chloride (Cl^-) versus nitrate (NO_3^-) transport media (Fig.1c). Total uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ significantly decreased in the chloride medium whereas, as expected, the non specific uptake (measured in the presence of an excess of $100 \mu\text{M}$ unlabeled Cd) remained unmodified. These results suggest a preferential uptake of Cd^{2+} species. Figure 1d shows competitive inhibition of the 3-min cellular uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in the nitrate medium with increasing unlabeled Cd concentrations used as a specific inhibitor of tracer uptake. Data analyses according to the modified Michaelis-Menten Eq (2) gave the following values: $K_m = 3.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$; $V_{\text{max}} = 135 \pm 21 \text{ pmol } ^{109}\text{Cd}/3 \text{ min/mg protein}$, and $k_D = 28 \pm 1 \text{ pmol } ^{109}\text{Cd}/3 \text{ min}/\mu\text{M/mg protein}$. Note that k_D represents all non specific contributions to total uptake levels (possibly including binding).

Implication of Ca transport mechanisms in the cellular uptake and cytotoxicity of Cd

Many studies emphasize the similarities between Cd and Ca ions, mainly because they share similar ionic radii (Kim and Sharma 2004, Joseph *et al* 2001). Accordingly, one may hypothesize that Cd could use one or various Ca channels to enter osteoblastic cells. Therefore, the initial 3-min uptake of ^{109}Cd was measured in the presence of 5 mM Ca in the NO_3^- medium used to optimize the levels of Cd^{2+} species. As shown in Fig.2a, the specific uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ was inhibited by 50% in the presence of 5 mM Ca . In accordance with this observation, the sensitivity of MC3T3 cells to Cd was found to increase

significantly when Ca concentration was lowered from 1 to 0.1 mM (9.0 ± 1.2 vs. 5.1 ± 1.1 μ M, respectively) (Fig. 2b). Note that lowering Ca, by itself did not modify cell viability (Fig. 2b, Inset). These results suggest that Ca and Cd may, at least in part, share common transport mechanisms, thus Ca may modify the cytotoxicity of Cd in immature murine osteoblasts.

Since we observed that Ca inhibits Cd uptake and since VDCCs are involved in Cd entry into various cell types (Endo *et al* 2002, Long 1997, Hinkle *et al* 1987), we have tested whether VDCC were responsible for Cd uptake and, as a consequence, for Cd cytotoxicity in the MC3T3 cells. First of all, high K^+ -induced depolarisation was tested for its ability to stimulate ^{45}Ca uptake in MC3T3 cells. As shown in Fig. 3a, the specific uptake of 0.5 mM ^{45}Ca was 2-fold higher when measured under depolarisation conditions showing the presence of operational VDCCs in MC3T3 cells. However, the specific uptake of 0.5 μ M ^{109}Cd was not significantly influenced by depolarisation (Fig. 3b). Moreover, high K^+ -induced depolarisation did not affect the sensitivity of cells to Cd (Fig. 3c). These results show that VDCCs are unlikely to play a significant role in Cd uptake in MC3T3 cells.

Implication of Mg transporters in the cellular uptake and cytotoxicity of Cd

Since Ca inhibits Cd uptake without evidence for the involvement of VDCCs, other mechanisms that have been shown to transport Ca were tested for their ability to transport Cd in MC3T3 cells. TRP channels are among such mechanisms, some of which show significant permeability to other divalent cations (Clapham 2003). For example, TRPM6 and TRPM7 regulate renal reabsorption of Mg^{2+} (Schlingmann *et al* 2007). We therefore investigated the impact of Mg on Cd uptake and toxicity. Similarly to Ca, 2.5 mM Mg inhibited by 40% the 3-min uptake of 0.5 μ M ^{109}Cd in the NO_3^- medium (Fig. 4a). Accordingly, Mg reduced Cd cytotoxicity in a dose-dependent manner since LC_{50} values decreased when the extracellular concentration of Mg was lowered (Fig. 4b). Variations in extracellular Mg concentration alone did not affect cell viability

(Fig. 4. Inset). These results suggest that Cd and Mg may, in part, share common uptake mechanisms.

Cd uptake and cytotoxicity as a function of osteoblastic differentiation status

In order to investigate the influence of osteoblastic differentiation on the cellular accumulation and cytotoxicity of Cd, the differentiation of MC3T3 cells was induced using specific well-established culture conditions. Alkaline phosphatase activity (ALP) and mineralization potential were used as osteoblastic differentiation markers (Yamauchi *et al* 2005, Jadowiec *et al* 2004, Minguell *et al* 2001). As shown in Fig. 5a, cells incubation with 50 $\mu\text{g/mL}$ ascorbic acid and 10 mM β -glycerophosphate for 28 days increased ALP activity in a time-dependent manner compared to untreated control cells. Likewise, the mineralization potential was significantly augmented on day 28 (D28) compared to day 0 (D0), this increase being much higher in the treated cells (Fig. 5b). Taken together, these results confirm the efficiency of the treatment to promote MC3T3 cells osteoblastic differentiation.

Then, we studied Cd uptake and cytotoxicity as a function of days in culture and in relation to the osteoblastic differentiation status. First, we observed that cell sensitivity to Cd decreased as a function of days in culture since LC_{50} values varied from 6.7 ± 1.2 at D0 to 20.3 ± 1.2 at D28 ($p = 0.0151$) (Fig.6a). Interestingly, the decrease in cell sensitivity was reached earlier, as soon as D14 ($\text{LC}_{50} = 18.9 \pm 1.3 \mu\text{M}$, $p = 0.0247$), in cells undergoing osteoblastic differentiation (Fig. 6b). To further investigate the loss of sensitivity to Cd, the 3-min uptake of ^{109}Cd was measured at D0 as well as in 28-days old treated (D28T) or untreated (D28B) cell cultures. ^{109}Cd uptake was higher at D0 compared to D28 cell cultures, regardless of the culture conditions (Fig. 6c). To determine whether this reduced uptake in older cell cultures was specific to Cd, ^{45}Ca uptake was measured under the same conditions (Fig. 6d); only control D28 cell cultures without treatment to induce the differentiation process showed lower ^{45}Ca uptake.

Therefore, the observed lower Cd uptake measured in differentiated cultures seems to be specific to that ion.

Influence of extracellular matrix secretion on the discrimination between specific and non specific cellular accumulation

Since ^{109}Cd uptake decreased on D28 independently of culture conditions, the influence of osteoblastic differentiation was further studied. The increase ECM secretion during differentiation may influence results for cellular uptake when data are expressed relative to total mg of protein. Specific uptake (corrected for the non specific diffusional and/or binding components) is the correct measure representative of cellular transport processes. Therefore total and non displaceable accumulations were measured as a function of the differentiation status. Results obtained for ^{45}Ca are shown in Fig. 7a: both components of accumulation significantly rose as a function of days in culture for control and differentiated cells, resulting in increased accumulation levels of ^{45}Ca (Fig. 7a. Inset). On the other hand, the relative contribution of the non displaceable accumulation of ^{109}Cd increased much more compared to total measurements, resulting in a decreased specific accumulation as a function of osteoblastic differentiation (Fig. 7b). However, this decrease was much lower compared to variation in "specific" (non displaceable) adsorption of ^{109}Cd on ECM (Fig. 7c). These results show that although ^{109}Cd was found to significantly adsorb to both the cell-secreted ECM and type I collagen (Fig.7c), the decrease in ^{109}Cd uptake previously observed (Fig. 6c) was not an artefact.

Impact of Ca, Mg and depolarization on Cd uptake and cytotoxicity in differentiated cells

Figure 8a shows dose-response curves of 28D undifferentiated (B) and differentiated (T) MC3T3 cells as a function of extracellular concentration of Ca. Control cells were more sensitive to Cd in the absence of Ca ($\text{LC}_{50} = 6.3 \pm 1.1$ vs. $18.5 \pm 1.2 \mu\text{M}$, $p < 0.001$), as was the case for differentiated cells ($\text{LC}_{50} = 7.1 \pm 1.2$ vs. $25.7 \pm 1.5 \mu\text{M}$, $p < 0.001$). Interestingly, contrary to what has been

observed on D0 (Fig. 2b), Ca did not inhibit ^{109}Cd uptake on D28 independently of the differentiation status (Fig. 8b). Similar observations were obtained with Mg: cell sensitivity to Cd significantly increased in both undifferentiated (7.9 ± 1.3 vs. $19.3 \pm 1.2 \mu\text{M}$) and differentiated cells (16.0 ± 1.2 vs. $25.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$, $p < 0.05$) without Mg in the exposure medium (Fig. 8c) and the inhibition of ^{109}Cd uptake by Mg was also lost after 28 days of culture, independently of the differentiation status (Fig. 8d). As a follow-up of experiments conducted with undifferentiated cells (Fig. 3), the activation of VDCC was also verified in differentiated cells (Fig. 9a), but these channels are also unlikely to contribute appreciably in ^{109}Cd accumulation in differentiated cells (Fig. 9b).

DISCUSSION

Little information is available about Cd toxicity as a function of the differentiation status of bone cells; most studies have emphasized on the impact that Cd itself has on differentiation (Wilson *et al* 1996, Dohi *et al* 1993). Moreover, the transport mechanisms responsible for Cd uptake in osteoblastic cells have not yet been identified. Therefore we have investigated the cellular accumulation and cytotoxicity of Cd using an *in vitro* model of osteoblastic differentiation. While VDCCs were shown to be involved in Cd uptake in some cell types (Endo *et al* 2002, Usai *et al* 1999, Hinkle *et al* 1992, 1987), herein we demonstrated that these channels are unlikely to be involved in Cd uptake, and subsequent cytotoxicity, in the MC3T3 cells. Although Ca and Mg were potent inhibitors of Cd cytotoxicity in both immature and differentiated cultures, these ions inhibited Cd uptake in immature cells only. In addition, both the cellular accumulation and toxicity of Cd were found to be dramatically reduced in differentiated cells. As a result of ECM content in differentiated cultures, the accumulation measurements may increase, but a decrease in the specific cellular accumulation was clearly observed.

Investigation of Cd uptake and cytotoxicity in MC3T3 cells under basal culture condition

The time-dependent cellular accumulation of Cd in MC3T3 cells, leading to about 500 pmol per mg protein following a 24-h exposure to 0.5 μM ^{109}Cd in the serum-free medium (Fig.1a), reached levels quite comparable to those reported for metallothionein (MT)-deficient murine embryonic fibroblasts (Leslie *et al* 2006). The LC_{50} value determined using MTT activity measurement (Fig.1b) was consistent with those observed for these same cells as well as in the HepG2 and PLC/PR/5 cells (Shimoda *et al* 2001) and in the GH_4C_1 cells (Hinkle *et al* 1987). Cadmium uptake was also found to vary with metal speciation as conditions known to increase the level of Cd^{2+} species significantly enhanced its uptake (Fig. 1c). Preferential Cd^{2+} uptake by the Caco-2 cells (Elisma and Jumarie

2001; Jumarie *et al* 2001) was also observed, suggesting the involvement of a cationic transport mechanism for Cd entry. Note that contrarily to Cd, Ca and Mg speciation does not vary appreciably in the Cl^- versus NO_3^- medium: Ca and Mg were mainly recovered as aqua ion in both media. Cadmium uptake in MC3T3 cells was found to be saturable with Michaelis-Menten kinetics: a specific system of high affinity was characterized (Fig.1d) The value obtained for K_m ($3.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$) was similar to that reported for primary cultures of hepatocytes ($3.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$) (Pham *et al* 2004) and for the HIEC cells ($5.1 \pm 1.1 \mu\text{M}$) (Bergeron and Jumarie 2006). Note that K_m values in HIEC cells were the same in both nitrate and chloride media. However, the V_{\max} value for the MC3T3 cells ($135.3 \pm 21.0 \text{ pmol } ^{109}\text{Cd}/3 \text{ min}/\text{mg protein}$) was somewhat lower than those evaluated in the hepatocytes ($219 \pm 45 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg protein}$) and the HIEC cells ($342 \pm 76 \text{ pmol}/3\text{min}/\text{mg protéine}$). Interestingly, the V_{\max} value for HIEC cells was 2-fold higher in nitrate than chloride media.

Calcium is a vital ion in cell signalling and many types of channels exist to allow the passage of Ca across the cell membrane (for reviews, see Clapham 2003 and Yamakage and Namiki 2002). To determine the role of such channels in Cd toxicity, cell viability and Cd uptake were measured in the presence of various concentrations of Ca in the incubation media. Cell survival following a 24-h exposure to Cd was shown to increase along with the extracellular concentration of Ca (Fig. 2a); these two ions may compete either for cellular entry or for intracellular binding sites, therefore influencing Cd cytotoxicity (No l *et al* 2004, DelRaso *et al* 2003). The addition of Ca in the transport buffer inhibited nearly half the specific transport of Cd in immature osteoblasts (Fig.2b). These results are not surprising, as Cd has been known to exhibit Ca-mimetic properties in some systems (Kim and Sharma 2004, Chuang *et al* 2000). Currently explored hypotheses concern the calcium-dependent cellular processes, some of which are shown to be Cd-sensitive (King *et al* 1999, Long 1997).

Many cations, such as barium and cobalt, have been shown to permeate across VDCCs. Like Cd, these ions have long been used for their calcium channel-blocking properties (Kim *et al* 2000, Shen *et al* 2000, Huang *et al* 1989). The first step to study the involvement of VDCCs in Cd uptake was to demonstrate their functionality in the studied model. Figure 3a shows increased ^{45}Ca uptake through activated VDCCs; a 50% rise was observed, underscoring the presence of depolarisation-induced Ca uptake mechanisms. Even though VDCCs are known to be involved in the cellular uptake of Cd in some other cells types (Endo *et al* 2002, Usai *et al* 1999, Hinkle *et al* 1992), the present work clearly excludes their role in Cd entry in MC3T3 cells (Fig.3b). Moreover, the LC_{50} remained unchanged following a 24-h exposure under depolarisation conditions (fig.3c). These results were an incentive to investigate other pathways for cellular uptake of Cd. Many Ca channels other than VDCC could contribute to the cellular accumulation of Cd; TRPs are non selective cationic channels mainly transporting Ca (Clapham 2003).

Since the inhibition of Cd uptake by Ca did not involve VDCCs, other pathways were investigated. Many TRP channels are permeable to both Ca and Mg ions (Clapham 2003); in this context, Mg is an important cation for cell function (Schlingmann *et al* 2007, Rubin 2005,). Its impact in Cd cytotoxicity and cellular uptake was therefore evaluated using the same approach as for Ca. As observed for Ca, Mg displayed a dose-dependent protective effect (Fig.4a). This result was further supported by the 40% inhibition of Cd uptake on D0 in the presence of Mg in the transport buffer (Fig.4b). Interestingly, 2.5 mM Mg inhibited Cd uptake at similar levels than 5 mM Ca, showing an inhibition nearly twice as efficient as observed for Ca. This fact underscores the importance of Mg transport mechanisms in Cd uptake by these cells. Certain TRP channels, namely TRPM6 and TRPM7, are known to show a higher permeability for Mg than Ca (Voets *et al* 2004, Nadler *et al* 2001). Moreover, we have demonstrated the expression of these channels in human osteoblast-like cell lines (Abed and

Moreau 2007). Their expression and functionality remain to be determined in MC3T3 cells.

Impact of *in vitro* differentiation on Cd uptake and cytotoxicity in MC3T3 cells

Having reproduced culture conditions promoting osteoblastic differentiation of the MC3T3 cells (fig.5a,b), the first step was to investigate whether differentiated cells display any difference in Cd sensitivity following 24-h exposures. The observed LC_{50} values increased as a function of days in culture both for basal and differentiated cultures, yet the difference was significant earlier in differentiated cells (Fig.6a,b). This resistance phenomenon could imply a lower level of Cd uptake and therefore a reduced cytotoxicity. As demonstrated in Fig.6c, Cd uptake in MC3T3 cells was significantly reduced after 28 days of culture, independently of treatment. The Ca uptake profile under the same conditions was shown to be different, as only long-term cell cultures displayed a decrease (fig.6d). It was recently reported by Koizumi and colleagues (2003) that the percentage of Ca-responsive cells was high in sparsely cultured MC3T3 cells but low in densely cultured cells; long-term untreated cultures are considered “hyperconfluent” relative to D0 cultures. This phenomenon has not been verified in differentiated cells. The lower uptake observed following differentiation therefore seems to be Cd-specific.

Osteoblastic cells secrete an important quantity of protein during the 28-day culture period; the quantity of protein therefore does not reflect the number of cells. Indeed, differentiating MC3T3 cell monolayers, although being at a similar cell density at confluence, secrete an abundant ECM as they mature *in vitro*, thus overestimating the quantity of cellular protein. The data have therefore been re-analyzed as tracer accumulation profiles (Fig. 7). The profiles obtained for Ca and Cd differed; the asymmetrical increase in non displaceable Cd accumulation caused a decrease in cellular accumulation (Fig.7b inset), contrary to what is observed for Ca (Fig.7a inset). As depicted in Fig.7c, total Cd adsorption to ECM

did not vary with the treatment, contrary to the non displaceable adsorption. Note that on D0, the layer of ECM was relatively thin and flat, comparable to that of Col I-coated dishes. Cadmium's affinity for ECM still didn't explain the lower uptake values observed in differentiated cells. Indeed, the exposure media could not have been tracer depleted during the 3-min uptake; Cd uptake was therefore shown to decrease with cell maturity.

Since differences were observed in Cd sensitivity and uptake between immature and mature cells, we investigated whether Ca and Mg remained potent inhibitors. Calcium-poor media enhanced Cd toxicity in both untreated and differentiated cells (fig.8a). Similar results were obtained with Mg-depleted media, control and differentiated cells both showed an approximate 50% decrease in LC_{50} values (fig.8c). Interestingly, the decrease in the uptake caused by the addition of Ca or Mg in the transport media was lost in control and differentiated cells (fig.8b,d), suggesting that some transporters present in immature cells are absent in differentiated cells. This also means that Cd uptake being no longer inhibited by these ions, intracellular mechanisms are affected by Cd in their absence therefore promoting cell death. Such mechanisms might include Ca-dependant apoptotic pathways (Brookes *et al* 2004, Pulido and Parrish 2003) or Mg-induced cell survival (Martin *et al* 2003). As a follow-up of experiments conducted on D0, depolarisation conditions still had no impact in Cd uptake, despite the apparent functionality of VDCC on D28 (fig.9a,b).

Conclusion

Significant differences were observed between immature and differentiated MC3T3 cells in terms of cellular accumulation and sensitivity to Cd. Because undifferentiated cells are more vulnerable to the toxic effects, our results suggest that Cd may impair osteoblastogenesis and subsequent bone remodelling. As demonstrated by these ions' inhibitory potential, Ca and Mg supplementation could slow down Cd accumulation by immature cells and reduce cytotoxicity in osteoblasts regardless of their degree of maturity. Some studies

state that hypomagnesemia and hypocalcemia might be important risk factors in the development of bone disease such as osteoporosis (Nieves 2005, Stendig-Lindberg *et al* 2004). Nevertheless, Cd has been shown to adsorb to cell-secreted ECM, leading to the possibility of being released following bone resorption.

The physiological relevance of higher accumulation levels and sensitivity to Cd in immature cells is critical: osteoblastic precursors would be the main target in bone. Wu and colleagues (2003) have shown that impaired osteoblastic differentiation leads to severe osteoporosis in mice. Furthermore, fewer osteoblastic precursors results in an impaired remodelling capacity, since immature osteoblasts are responsible for the onset of bone resorption. A decreased resorption process also impairs bone formation since osteoclasts recruit osteoblasts (Lerner, 2004). Although the aetiology of Cd-induced osteoporosis remains to be clarified, our results suggest that Cd decreases the number of osteoblastic precursor which may result in an unbalance between bone resorption and formation.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

Reference

- Abed E, Moreau R (2007), Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif.* 40, 849-865.
- Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, Hartwig A (2000), Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* 21, 2097-2104.
- Ballatori N (2002), Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ. Health Perspect.* 110 Suppl 5, 689-694.
- Bannon DI, Abounader R, Lees PS, Bressler JP (2003), Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am. J Physiol Cell Physiol* 284, C44-C50.
- Bergeron PM, Jumarie C (2006), Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology* 219, 156-166.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS (2004), Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J Physiol Cell Physiol* 287, C817-C833.
- Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM (1996), Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr. Rev.* 17, 333-368.
- Chalkley SR, Richmond J, Barltrop D (1998), Measurement of vitamin D3 metabolites in smelter workers exposed to lead and cadmium. *Occup. Environ. Med.* 55, 446-452.
- Chuang SM, Wang IC, Yang JL (2000), Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis* 21, 1423-1432.
- Clapham DE (2003), TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-524.
- DelRaso NJ, Foy BD, Gearhart JM, Frazier JM (2003). Cadmium uptake kinetics in rat hepatocytes: correction for albumin binding. *Toxicol. Sci.* 72, 19-30.
- Dohi Y, Sugimoto K, Yoshikawa T, Ohgushi H, Katsuda T, Tabata S, Moriyama T (1993), Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells: biochemical evidence of decreased bone formation capacity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 274-280.

- Elisma F, Jumarie C (2001), Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 662-668.
- Endo T, Kimura O, Sakata M (2002), Effects of P-glycoprotein inhibitors on cadmium accumulation in cultured renal epithelial cells, LLC-PK1, and OK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185, 166-171.
- Goyer R (1991), Toxic effects of metals. In: Amdur, M.O., Doull, J.D., Klaassen, C.D. (Eds.), *Casarett and Doull's Toxicology*, pp. 623-680.
- Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ (2004), An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem* 329, 77-84.
- Henson MC, Chedrese PJ (2004), Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.) 229, 383-392.
- Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC (1987), Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* 262, 16333-16337.
- Hinkle PM, Shanshala ED, Nelson EJ (1992), Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake. *J Biol. Chem.* 267, 25553-25559.
- Huang Y, Quayle JM, Worley JF, Standen NB, Nelson MT (1989), External cadmium and internal calcium block of single calcium channels in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *Biophys. J* 56, 1023-1028.
- Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF (2007), Cadmium-induced cancers in animals and in humans, *Int J Occup. Environ. Health* 13: 202-212
- Jadlowiec J, Koch H, Zhang X, Campbell PG, Seyedain M, Sfeir C (2004), Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway. *J Biol. Chem.* 279, 53323-53330.
- Jarüp L (2002), Cadmium overload and toxicity. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17 Suppl 2, 35-39.
- Joseph P, Muchnok TK, Klishis ML, Roberts JR, Antonini JM, Whong WZ, Ong T (2001), Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.* 61, 295-303.

- Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell PG, Denizeau F (2001), Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of Cd complexation by chloride, glutathione, and phytochelatin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170, 29-38.
- Kim CS, Coyne MD, Gwathmey JK (2000), Voltage-dependent calcium channels in ventricular cells of rainbow trout: effect of temperature changes in vitro. *Am. J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 278, R1524-R1534.
- Kim J, Sharma RP (2004), Calcium-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and apoptosis in response to cadmium in murine macrophages. *Toxicol. Sci.* 81, 518-527.
- King LM, Banks WA, George WJ (1999), Differences in cadmium transport to the testis, epididymis, and brain in cadmium-sensitive and -resistant murine strains 129/J and A/J. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 825-830.
- Koizumi T, Hikiji H, Shin WS, Takato T, Fukuda S, Abe T, Koshikiya N, Iwasawa K, Toyooka T (2003), Cell Density and Growth-dependent Down-regulation of Both Intracellular Calcium Responses to Agonist Stimuli and Expression of Smooth-surfaced Endoplasmic Reticulum in MC3T3-E1 Osteoblast-like Cells. *J Biol. Chem.* 278(8); 6433-6439.
- Lerner UH (2004), New molecules in the tumor necrosis ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption, *Crit Rev Oral Biol Med* 15(2): 64-81
- Leslie EM, Liu J, Klaassen CD, Waalkes MP (2006), Acquired cadmium resistance in metallothionein-I/II(-/-) knockout cells: role of the T-type calcium channel Ca_v1G in cadmium uptake. *Mol. Pharmacol.* 69, 629-639.
- Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N (2002), p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function. *Endocrinology* 143, 3105-3113.
- Liu F, Malaval L, Aubin JE (2003), Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J. Cell Sci.* 116, 1787-1796.
- Long GJ (1997), The effect of cadmium on cytosolic free calcium, protein kinase C, and collagen synthesis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143, 189-195.
- Manolagas SC (2000), Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21, 115-137.

- Martin H, Richert L, Berthelot A (2003), Magnesium deficiency induces apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *J Nutr.* 133, 2505-2511.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001), Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.) 226, 507-520.
- Miyahara T, Tonoyama H, Watanabe M, Okajima A, Miyajima S, Sakuma T, Nemoto N, Takayama K (2001), Stimulative effect of cadmium on prostaglandin E2 production in primary mouse osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.* 68, 185-191.
- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003), TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J. Gen. Physiol* 121, 49-60.
- Moreau R, Aubin R, Lapointe JY, Lajeunesse D (1997), Pharmacological and biochemical evidence for the regulation of osteocalcin secretion by potassium channels in human osteoblast-like MG-63 cells. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1984-1992.
- Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM, Fleig A (2001), LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411, 590-595.
- Nieves JW (2005), Osteoporosis: the role of micronutrients, *Am.J Clin.Nutr.* 81: 1232S-1239S
- Noël L, Guerin T, Kolf-Clauw M (2004), Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1203-1210.
- Park JD, Cherrington NJ, Klaassen CD (2002), Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicol. Sci.* 68, 288-294.
- Pham TN, Segui JA, Fortin C, Campbell PG, Denizeau F, Jumarie C (2004), Cadmium uptake in rat hepatocytes in relation to speciation and to complexation with metallothionein and albumin. *J. Cell Physiol* 201, 320-330.
- Pischon N, Darbois LM, Palamakumbura AH, Kessler E, Trackman PC (2004), Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor-alpha in osteoblasts. *J Biol. Chem.* 279, 30060-30065.
- Pulido MD, Parrish AR (2003), Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat. Res.* 533, 227-241.

- Rubin H (2005), The membrane, magnesium, mitosis (MMM) model of cell proliferation control. *Magnes. Res.* 18, 268-274.
- Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T (2007), TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 813-821.
- Shen JB, Jiang B, Pappano AJ (2000), Comparison of L-type calcium channel blockade by nifedipine and/or cadmium in guinea pig ventricular myocytes. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 562-570.
- Shimoda R, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP (2001), Induction of apoptosis in cells by cadmium: quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol. Sci.* 64, 208-215.
- Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J, Fagard R (1999), Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group. *Lancet* 353, 1140-1144.
- Stendig-Lindberg G, Koeller W, Bauer A, Rob PM (2004), Experimentally induced prolonged magnesium deficiency causes osteoporosis in the rat, *Eur.J Intern.Med.* 15: 97-107
- Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C (1999), Pathways of cadmium influx in mammalian neurons. *J Neurochem.* 72, 2154-2161.
- Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG (2004), TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol. Chem.* 279, 19-25.
- Wilson AK, Cerny EA, Smith BD, Wagh A, Bhattacharyya MH (1996), Effects of cadmium on osteoclast formation and activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140, 451-460.
- Wu XB, Li Y, Schneider A, Yu W, Rajendren G, Iqbal J, Yamamoto M, Alam M, Brunet LJ, Blair HC, Zaidi M, Abe E (2003), Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice. *J. Clin. Invest.* 112, 924-934.
- Yamakage M, Namiki A (2002), Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can. J Anaesth.* 49, 151-164.

Yamauchi M, Yamaguchi T, Kaji H, Sugimoto T, Chihara K (2005), Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 288, E608-E616.

Figure 1. Martineau et al

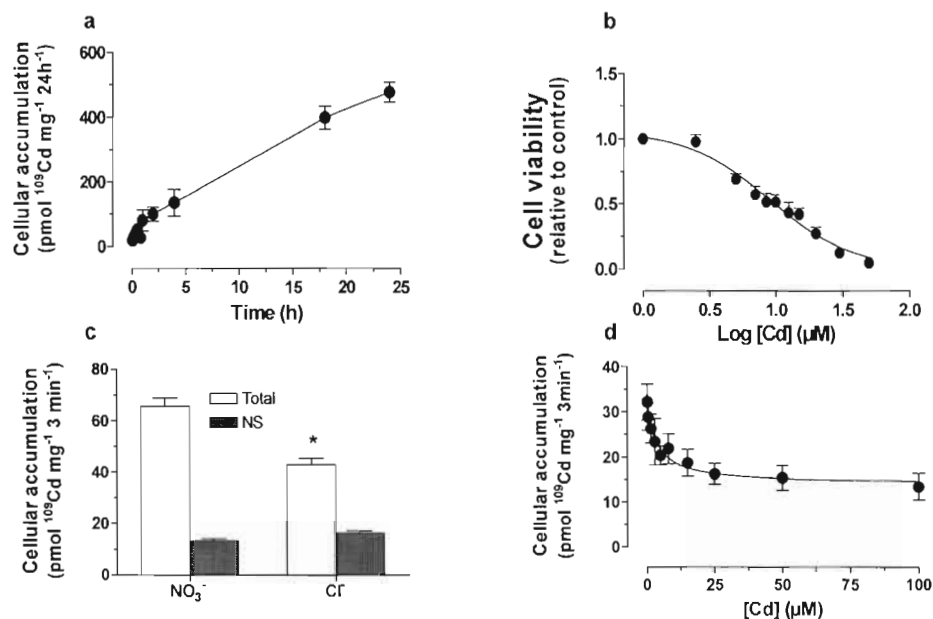


Fig. 1. Characterization of Cd accumulation and cytotoxicity. (a) Uptake time-course of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in DMEM-F/12. (b) Dose-response curve following a 24-h exposure to increasing Cd concentration in DMEM-F/12 (1 mM Ca and 0.8 mM Mg). (c) 3-min uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ in nitrate (NO_3^-) or chloride (Cl^-) media. Significant difference (* $p < 0.001$ versus nitrate conditions, Bonferoni). (d) 3-min uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ as a function of increasing concentrations of unlabeled Cd.

Figure 2. Martineau et al

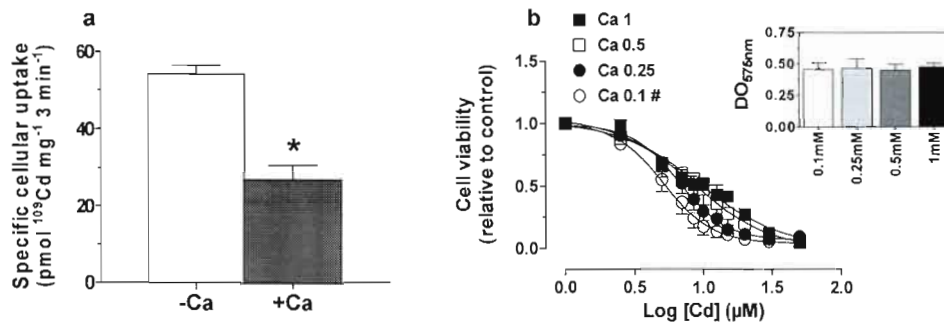


Fig. 2. Effect of calcium on Cd uptake and cytotoxicity. (a) 3-min uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ without (-) or with (+) 5 mM Ca in the transport media. Significant difference (* $p = 0.001$ versus control, 2-tailed unpaired t test). (b) Dose-response curves following a 24-h exposure to increasing Cd concentrations in DME containing 0.8 mM Mg with 1 mM (■), 0.5 mM (□), 0.25 mM (●) or 0.1 mM Ca (○). Significant difference (# $p = 0.0101$ versus 1 mM Ca, 2-way ANOVA). *Insets:* Culture conditions did not affect cell viability.

Figure 3. Martineau et al

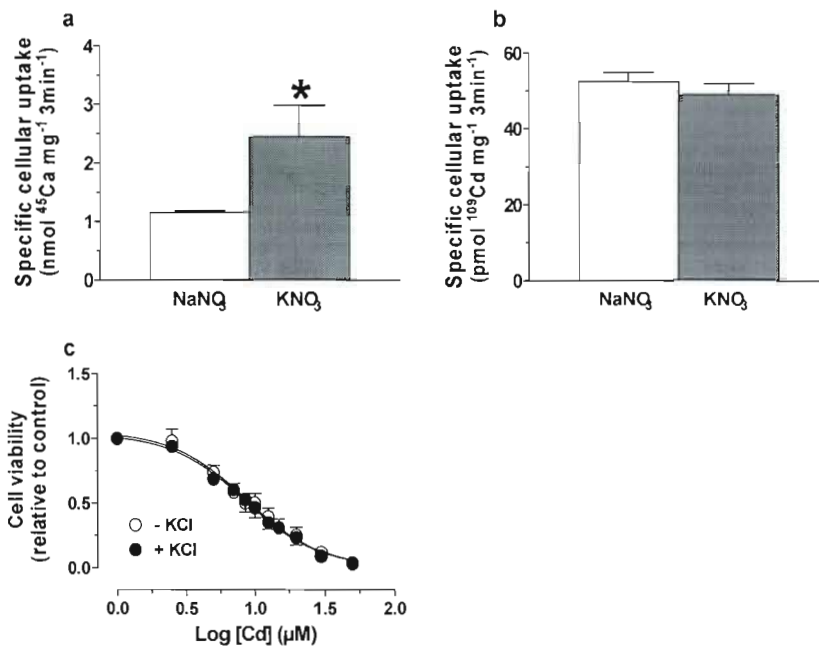


Fig. 3. Effect of depolarisation conditions on Cd uptake and cytotoxicity. (a) 3-min uptake of 0.5 mM ^{45}Ca under control (NaNO₃) or depolarisation (KNO₃) conditions. Significant difference (* $p = 0.0398$ versus NaNO₃, one-tailed t test). (b) 3-min uptake of 0.5 μM ^{109}Cd in control (NaNO₃) or depolarisation (KNO₃) media. (c) Dose-response curve following a 24-h exposure to increasing Cd concentrations with (+) or without (-) 50 mM KCl in the media.

Figure 4. Martineau et al

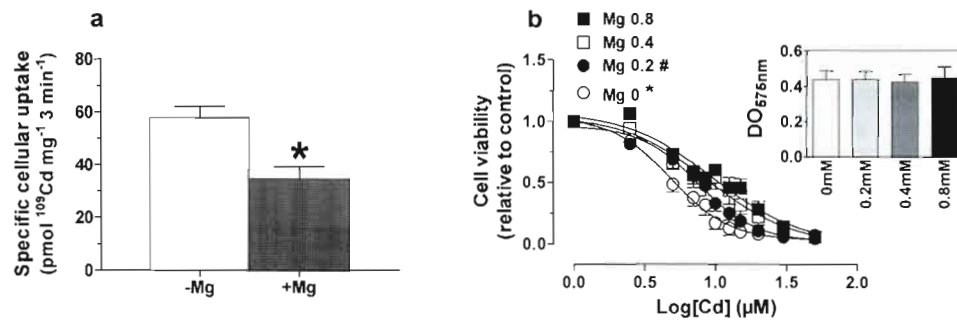


Fig. 4. Effect of magnesium on Cd cytotoxicity and uptake. (a) 3-min uptake of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd without (-) or with (+) 2.5 mM Mg in the transport media. Significant difference $p = 0.0129$, 2-tailed t test. (b) Dose-response curves following 24-h exposures to increasing Cd concentrations in DME containing 1 mM Ca with 0.8 mM (■), 0.4 mM (□), 0.2 mM (●) or without (○) Mg. Significant differences (* $p = 0.0003$; # $p = 0.0356$ versus 0.8 mM Mg, 2-way ANOVA). *Insets*: Treatments did not affect cell viability.

Figure 5. Martineau et al

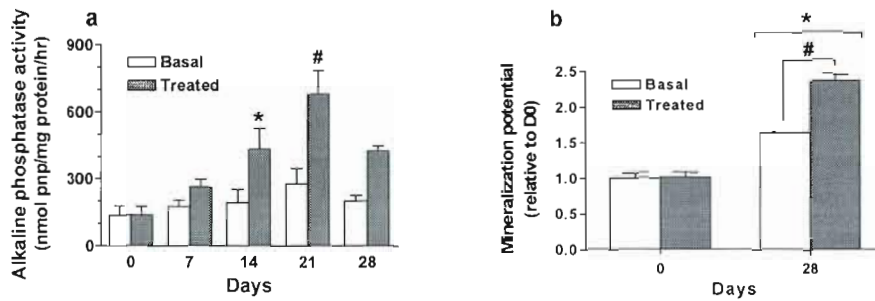


Fig. 5. Establishment of an *in vitro* osteoblastic differentiation model. (a) Alkaline phosphatase (ALP) activity as a function of days in culture in basal or differentiation (Treated) media. Significant differences (* $p < 0.05$, # $p < 0.001$ versus basal, Bonferoni). **(b)** Mineralization potential relative to control following a 28 days in culture in basal or differentiation (Treated) media. Significant differences (* $p < 0.0001$ versus day 0, # $p < 0.0005$ versus basal medium, unpaired t test).

Figure 6. Martineau et al

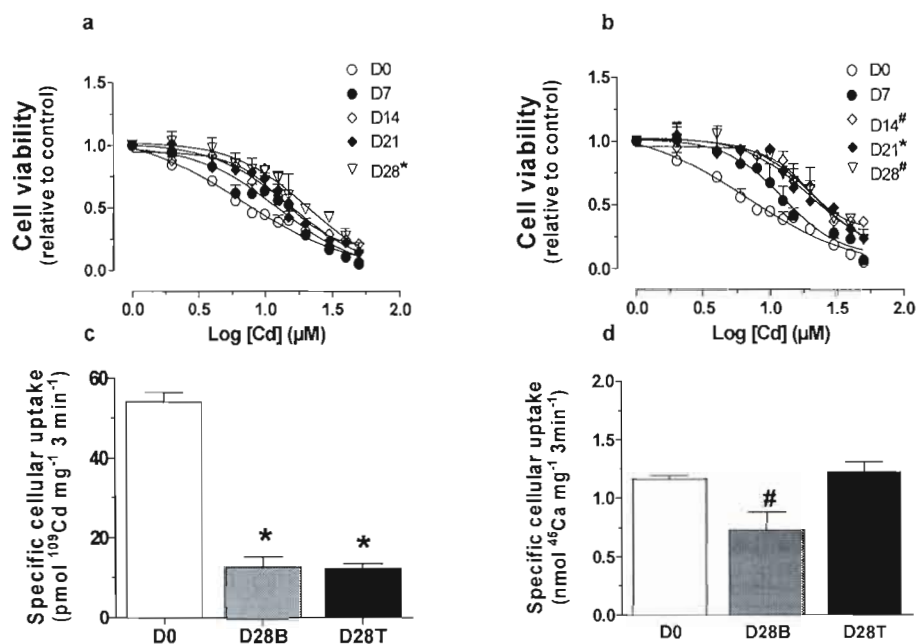


Fig. 6. Impact of *in vitro* differentiation treatment on Cd cytotoxicity and uptake. (a) Dose-response curves a following 24-h exposure to increasing Cd concentrations as a function of days in culture in MEM. Significant difference (* $p = 0.0009$ versus day 0 (D0), 2-way ANOVA). (b) Dose-response curves following a 24-h exposure to increasing Cd concentrations as a function of days in culture in AA and β -GP supplemented MEM. Significant difference (# $p = 0.0247$; * $p = 0.0159$ versus day 0 (D0), 2-way ANOVA). (c) 3-min uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ on day 0 or following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media. Significant difference (* $p < 0.01$ versus day 0 (D0), Dunnett). (d) 3-min uptake of $0.5 \text{ mM } ^{45}\text{Ca}$ on day 0 or following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media. Significant difference (# $p < 0.05$ versus day 0 (D0), Dunnett).

Figure 7. Martineau et al

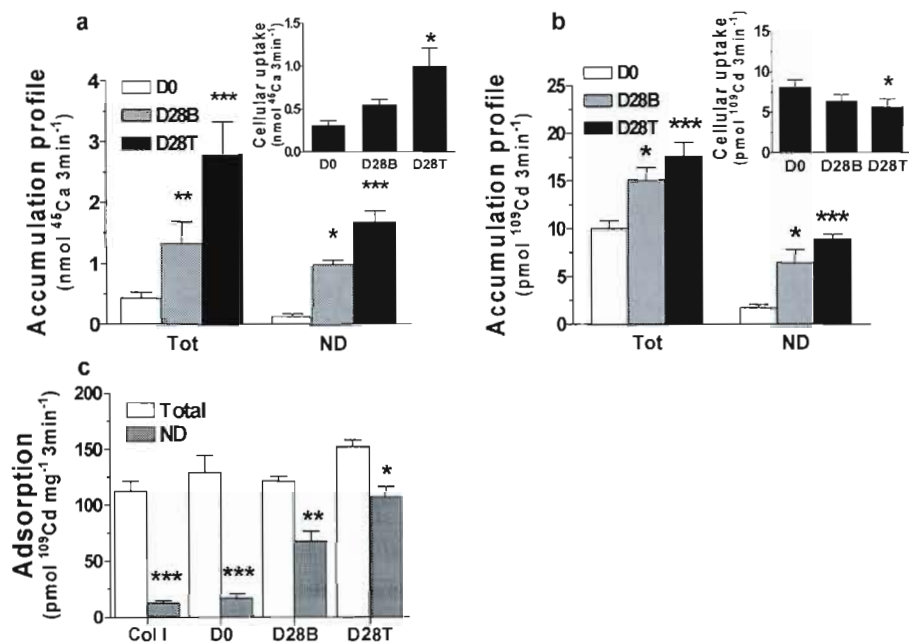


Fig. 7. Ca and Cd accumulation profiles in immature and differentiated cells. (a and b) Total (tot) and non displaceable (ND) 3-min accumulation of (a) 0.5 mM ⁴⁵Ca (*: $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus D0, Bonferoni) or (b) 0.5 μ M ¹⁰⁹Cd (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ versus D0, Bonferoni) on day 0 (D0) or following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media. *Insets:* specific cellular uptake capacity for (a) 0.5 mM ⁴⁵Ca (* $p < 0.05$ versus D0, Dunnett's) and (b) 0.5 μ M ¹⁰⁹Cd (* $p < 0.05$ versus D0, Dunnett) on day 0 (D0) or following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media. (c) Total (tot) and non displaceable (ND) 3-min accumulation of 0.5 μ M ¹⁰⁹Cd on Col I or cell-secreted ECM at day 0 (D0) or following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media. Significant difference (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ versus Total, Bonferoni).

Figure 8. Martineau et al

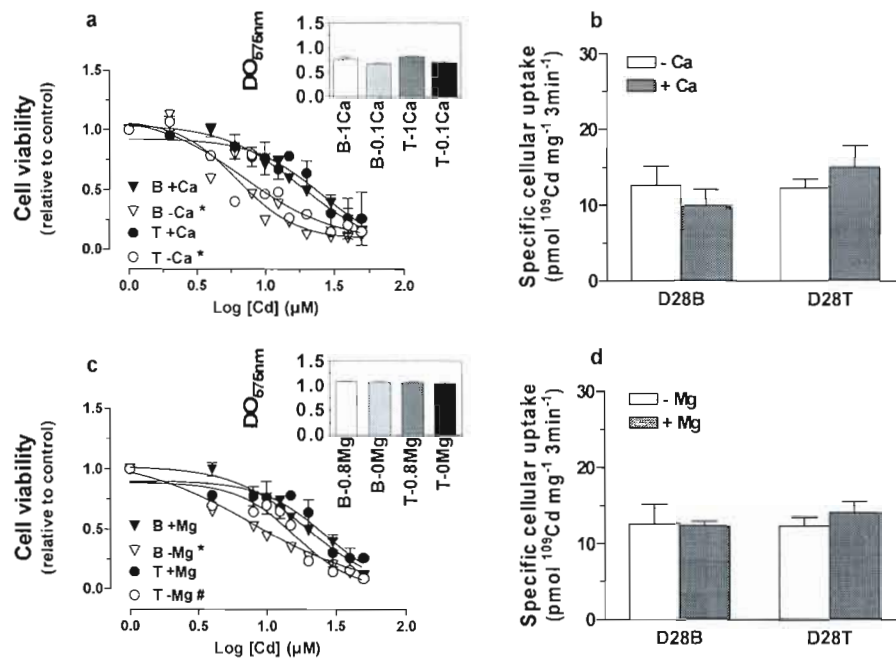


Fig. 8. Effect of Ca or Mg on Cd cytotoxicity and uptake in differentiated cells. (a and c) Dose-response curves following a 24-h exposure to increasing Cd concentrations in basal (B) or differentiation (T) media-treated cultures with (a) 1 mM (+) or 0.1 mM (-) Ca and with (c) 0.8 mM (+) or 0 mM (-) Mg. Significant difference (* $p < 0.0001$, # $p = 0.0084$ versus control (1 mM Ca, 0.8 mM Mg), 2-way ANOVA). *Insets:* Culture conditions did not significantly affect cell viability. (b and d) 3-min uptake of $0.5 \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ with (b) 5 mM Ca (+) or without (-) Ca and with (d) (+) 2.5 mM Mg or without (-) Mg in the transport media following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media.

Figure 9. Martineau et al

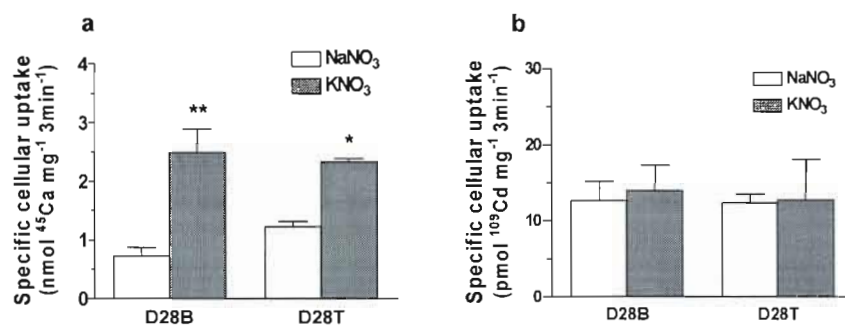


Fig. 9. Impact of VDCC activation on Cd uptake in differentiated cells. (a) 3-min uptake of 0.5 mM ⁴⁵Ca under control (NaNO₃) or depolarisation (KNO₃) conditions following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media. Significant difference (*p < 0.05, **p < 0.01 versus NaNO₃, Bonferoni). **(b)** 3-min uptake of 0.5 μM ¹⁰⁹Cd under control (NaNO₃) or depolarisation (KNO₃) conditions following 28 days in culture in basal (B) or differentiation (T) media.

CHAPITRE III.

DISCUSSION GÉNÉRALE

3.1 Impacts *in vitro* du Cd sur les cellules ostéoblastiques et implications possibles sur le métabolisme osseux

L'ensemble des données obtenues permet d'affirmer que les cellules ostéoblastiques sont effectivement capables d'accumuler le Cd et subséquemment, d'en subir les effets cytotoxiques. Tout d'abord, les lignées cellulaires étudiées affichent une sensibilité distincte au Cd ne pouvant être attribuée à des différences d'espèces puisque pour les deux lignées humaines, des concentrations provoquant 50% de létalité (CL_{50}) différentes ont été obtenues. La littérature fait état de la plus grande maturité des cellules U2 OS par rapport aux cellules MG 63 (Sorkin *et al* 2004), qui se traduit expérimentalement par une CL_{50} supérieure. Or, nos résultats font également état d'une plus grande sensibilité de la lignée murine MC3T3 comparativement aux lignées cellulaires humaines et suggèrent que cette différence n'est pas uniquement liée à l'espèce, puisque la différenciation *in vitro* des cellules l'abolit. Une différence de sensibilité au Cd en fonction du stade de différenciation est une nouveauté dans le domaine du métabolisme osseux; ce fait n'a jamais été rapporté auparavant. D'ailleurs, la différenciation *in vitro* des cellules MC3T3, se traduisant par une augmentation de la CL_{50} , démontre clairement la relation entre la sensibilité au Cd et la maturité ostéoblastique (voir Annexe B, figure 1). Il aurait été intéressant de reproduire un modèle similaire de différenciation avec des ostéoblastes humains en culture primaire, afin de

comparer directement l'effet de la différenciation des systèmes humains et murins sur la sensibilité au Cd.

Une plus grande sensibilité au Cd des cellules immatures signifie *in vivo* une réduction des précurseurs ostéoblastiques nécessaires à un remodelage osseux adéquat. En effet, l'altération de la survie des ostéoprogéniteurs compromet l'atteinte d'un nombre suffisant d'ostéoblastes, et donc une fonction ostéogénique adéquate permettant d'assurer le remplacement du tissu osseux dégradé par les OC. Ceci se traduirait par une formation osseuse insuffisante de certaines BMU et à long terme par une réduction de la masse osseuse générale menant ultimement à l'ostéoporose. De plus, ceci augmenterait la vulnérabilité des populations vieillissantes et dont la moelle osseuse comprend une plus faible proportion de précurseurs mésenchymaux. Alors, les effets combinés de toxicité du Cd sur les ostéoprogéniteurs et leur nombre diminuant avec l'âge pourraient donc constituer des facteurs de risque qui, s'additionnant, contribueraient à la forte propension des personnes âgées à développer l'ostéoporose.

Les corrélations entre la sensibilité au Cd et le potentiel d'accumulation des cellules ostéoblastiques sont paradoxales. Dans les cellules plus sensibles (MC3T3 non différenciées), le transport initial est plus rapide, tandis que le potentiel d'accumulation à l'équilibre sur 24-h est moindre; la relation inverse est observée dans les cellules les plus résistantes (U2 OS). Cependant, un transport initial plus rapide peut mener à une saturation du pouvoir de séquestration si celui-ci est plus faible (Liu *et al* 2004, Erfurt *et al* 2003, Habeebu *et al* 2000). La relation entre la sensibilité au Cd et le contenu cellulaire en MT ou en GSH n'a pas été explorée dans notre étude et cette hypothèse reste à vérifier. Une méthode intéressante, qui exploite la forte affinité du Cd pour la MT ainsi que sa stabilité à la chaleur, est d'ajouter du ^{109}Cd libre à un sumageant cellulaire dénaturé par la chaleur. Suite à une incubation de 10 min, un agent chélatant (par exemple l'hémoglobine, l'EDTA ou le TPEN) est ajouté afin d'éliminer le Cd^{2+} libre en excès. L'échantillon est ensuite chauffé, refroidit, centrifugé et transféré dans un tube à compteur gamma. La quantité de ^{109}Cd -MT est proportionnelle à la

radioactivité détectée au compteur gamma; les valeurs peuvent être exprimées par rapport au contenu total en protéines du surnageant non dénaturé (Liu *et al* 2004).

3.2 Adsorption du Cd sur l'ECM osseuse

Dans le second article concernant la sensibilité des MC3T3 au Cd en fonction de leur statut de différenciation, il est démontré que le Cd est à même de s'accumuler sur l'ECM sécrétée par ces cellules lors du traitement à l'AA et au G-2-P. D'abord, les résultats illustrent que « l'accumulation cellulaire » non déplaçable augmente plus que l'accumulation totale, ce qui résulte conséquemment en une proportion de transport cellulaire spécifique réduite. Cette hausse d'accumulation non déplaçable de Cd dans les cultures différenciées s'est avérée être de l'adsorption sur l'ECM osseuse, composée à plus de 90% de Col I. Cette diminution est également observée dans les cultures à long terme non traitées; ceci s'explique par le fait que les MC3T3 tendent à se différencier spontanément et sécrètent donc une quantité appréciable d'ECM. D'ailleurs, les essais d'adsorption sur le Col I montrent bien que c'est la principale composante interagissant avec le Cd. Il ne fait nul doute qu'en situation physiologique, le Cd ne s'accumulant pas dans les cellules s'adsorbe fortement à la matrice. Il aurait été intéressant d'effectuer une courbe de déplacement du Cd sur le Col I afin d'en évaluer l'affinité (K_d) et de la comparer à celle du Ca, ion dominant dans l'ECM osseuse.

La matrice extracellulaire est constamment renouvelée lors du remodelage osseux; sa dégradation libère plusieurs constituants dont le Ca, le Mg et le P (Manolagas 2000, Calvo *et al* 1996). Cependant, advenant l'accumulation de minéraux non essentiels, tel le Cd, ceux-ci seront également relargués ce qui les rend à nouveau disponibles pour altérer le métabolisme des cellules avoisinantes. Conséquemment, suite à une exposition au Cd, les OC dégradant l'ECM libèrent le Cd accumulé et exposent les cellules fonctionnant au sein des BMU permettant ainsi à l'ion d'interférer avec le métabolisme osseux. De plus, le microenvironnement hermétique des BMU pourrait mener à l'apparition d'une

très haute concentration locale de Cd, et ce malgré de faibles taux sanguins. On conçoit très bien qu'un tel scénario mènerait certainement à une importante cytotoxicité au niveau des OB, et donc à une pauvre formation osseuse. Il aurait été intéressant de faire des études sur co-cultures OC-OB sur un substrat de ^{109}Cd -Col I afin de déterminer le taux de relargage du Cd de l'ECM suite à la résorption. Cependant, de telles expériences pourraient constituer un projet à part entière et n'ont donc pas été tentées dans le cadre de ce mémoire.

L'impact du Cd s'accumulant dans l'ECM osseuse peut être encore plus large puisqu'il est démontré que celle-ci crée une surface régulatrice ne servant pas seulement à permettre l'organisation tissulaire de l'os, mais également à coordonner des interactions vitales entre les cellules osseuses (Stanford et Keller 1991). Notamment, la différenciation ostéoblastique est impossible sans l'action paracrine du Col I sur les précurseurs ostéoblastiques (Wenstrup *et al* 1996). Donc, en plus d'exercer une toxicité directe sur les cellules immatures de l'os, le Cd serait également apte à en empêcher la différenciation et la migration adéquate sur la matrice, menant donc à une structure osseuse déficiente et affaiblie. Une méthode simple pour observer le comportement des OB dans de telles conditions serait de mettre ces cellules en culture sur des pétris de ^{109}Cd -Col I et de mesurer divers paramètres ostéoblastiques, tels l'activité ALP, la minéralisation, l'OPG et le RANKL, ainsi que l'OCN. De plus, des mesures de marqueurs apoptotiques, tels que l'annexine V et l'activité de diverses caspases, pourraient être effectuées sur les OB sous différentes conditions de cultures (Coonse *et al* 2007).

3.3 Impact du Ca et du Mg sur la cytotoxicité du Cd dans les cellules ostéoblastiques

L'importance du Ca et du Mg dans le métabolisme osseux a été démontrée dans de multiples études physiologiques et épidémiologiques (Nieves 2005). Le Ca est essentiel au maintien d'un squelette en santé; toute carence en cet élément provoque des défauts de minéralisation et une augmentation de la résorption, pouvant mener à l'ostéomalacie ou l'ostéoporose. Ceci a été démontré chez des rats nourris avec une diète pauvre en Ca (Mocetti *et al* 2000). De plus, chez des

populations exposées au Cd, un lien a été établi entre les ostéopathies liées à ce toxique et un faible apport alimentaire en Ca (Noël *et al* 2004, Staessen *et al* 1999). Un parallèle semblable peut être fait avec le Mg; celui-ci est principalement stocké dans le squelette et l'hypomagnésie est associée à divers désordres osseux dont des défauts de minéralisation ainsi qu'une augmentation de la résorption et l'ostéoporose. Tout comme pour le Ca, une carence en Mg provoque l'ostéoporose chez les animaux de laboratoire (Stendig-Lindberg *et al* 2004); ce fait a également été rapporté dans certaines études épidémiologiques (Nieves 2005).

L'interférence du Ca et du Mg avec le transport et la cytotoxicité du Cd représente un indice supplémentaire sur les mécanismes impliqués dans l'accumulation cellulaire du Cd. Le cas du Mg est particulièrement intéressant puisque sa protection s'étend aux 3 lignées étudiées. L'impact différent et propre de ces 2 ions suggèrent que les mécanismes calciques et magnésiques impliqués sont distincts l'un de l'autre. Quoique ce fait demeure à démontrer en effectuant des essais de transport en présence des deux ions, ces indices fournissent une bonne piste pour de futures recherches. De plus, les résultats obtenus à l'aide du modèle *in vitro* de différenciation des cellules MC3T3 démontrent que ces mécanismes de transport du Cd inhibés par le Ca et le Mg ne sont pas effectifs à tous les stades de maturité puisque l'inhibition du transport initial par le Ca et le Mg est absente dans les cellules différenciées. Ces observations sont corroborées par des essais préliminaires démontrant la baisse d'expression de certains canaux membranaires, dont TRPM1, en fonction de la différenciation suggérant que ces canaux pourraient constituer une voie d'entrée du Cd dans les OB (voir Annexe B, figure 2). Ce canal est généralement associé à la prolifération cellulaire et à la progression des mélanomes bénins (Huang 2004, Miller *et al* 2004); la signification de sa baisse d'expression génique demeure sans interprétation claire. Cette observation demeure toutefois à confirmer.

Étant donné l'importance du Ca et du Mg dans le métabolisme osseux, leur effet protecteur sur les ostéoblastes en culture n'est pas surprenant.

Conséquemment, les syndromes associés à leur carence pourraient en réalité être en lien avec une exposition chronique à de faibles taux de Cd, demeurant indétectable chez les individus en santé. Ainsi lors d'une carence en Ca et/ou en Mg, la résorption est augmentée et peut mener à une libération accrue du Cd de la matrice osseuse, tel que suggéré par la propension du Cd à s'adsorber à l'ECM osseuse. Ce Cd nouvellement libéré serait à même d'affecter les ostéoprogéniteurs et les OB. De plus, nos résultats démontrent que la présence de Ca et de Mg dans le milieu extracellulaire réduit l'entrée de Cd dans les OB. Une carence de ces deux ions pourrait se traduire par une entrée accrue de Cd dans les cellules ostéoblastiques et une cytotoxicité augmentée. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par des études *in vivo* sur des rongeurs exposés au Cd et alimentés de diètes en teneurs variables en Ca et en Mg. L'impact de l'apport nutritionnel de ces ions sur l'incidence de l'ostéoporose pourrait être évalué selon des méthodes histomorphologiques (microtomographie virtuelle, histologie) ainsi que cliniques (taux sérique et urinaire de Ca, de Mg, de Cd et marqueurs de résorption et de formation osseuses). Encore une fois, ceci constitue un projet d'envergure qui n'a pu être exploré dans la présente étude.

3.4 Voies d'entrée du Cd dans les cellules ostéoblastiques

Les premiers essais démontrent clairement que les VDCC ne sont pas impliqués dans l'entrée de Cd dans les cellules ostéoblastiques, peu importe l'espèce ou le degré de maturité. Les canaux de la classe des TRPC ne semblent pas non plus participer de façon importante à ce phénomène, tel que démontré par le faible impact de la TG et du SKF 96365. Leur expression dans diverses lignées ostéoblastiques ont d'ailleurs été démontrées par des collègues du laboratoire de métabolisme osseux (voir Annexe B, Tableau I) (Abed et Moreau 2007, Labelle *et al.*, 2007). L'absence d'effet des modulateurs pharmacologiques choisis n'est donc pas due à l'absence de ces canaux. Par contre, des indices fonctionnels suggèrent que des canaux de la classe des TRPM sont importants dans le transport et la cytotoxicité du Cd dans les OB. Notamment, les résultats obtenus dans les cellules humaines avec le 2-APB, un modulateur reconnu des canaux TRPM6 et TRPM7

(Li *et al* 2006), indiquent que ces derniers sont des voies d'entrée importantes dans ces cellules.

Un autre fait saillant observé au cours de cette étude est l'expression des canaux TRPM et TRPV dans les 3 lignées ostéoblastiques. En particulier, les canaux TRPM6 et TRPM7 ont été détectés dans l'ensemble des cellules et ont été démontrés comme étant perméables au Cd (Li *et al* 2006, Monteilh-Zoller *et al* 2003). L'implication du canal TRPM1 dans le transport de Cd dans les cellules murines, qui ne l'expriment plus une fois différenciées (voir Annexe B, Figure 2), reste à démontrer et les propriétés de transport de ce canal doivent être définies (Clapham *et al* 2003). Des essais d'interférence par ARN ciblant TRPM1 et TRPM7 ont d'ailleurs été tentés dans les trois lignées, mais sans obtenir de succès. En effet, le silence génique de TRPM1 semble avoir un impact important sur la survie cellulaire, empêchant donc d'étudier son rôle dans le transport de Cd. Quant à TRPM7, l'inhibition de son expression n'a pu être observée; les séquences cibles et/ou les conditions de transfection sont donc à revoir.

Détail intéressant, le canal TRPV2 est exprimé dans les 3 lignées et sa présence pourrait expliquer les différences observées entre les cellules murines et humaines lorsque exposées au Cd en présence de 2-APB dont l'action stimulatrice, rappelons-le, semble être dépendante de l'espèce (Neeper *et al* 2007). En effet, l'absence de protection du 2-APB dans les cellules murines exposées au Cd pourrait s'expliquer par la modulation du canal TRPV2 dont l'activation pourrait masquer l'inhibition des TRPM. Cependant, faute de conditions connues activant sélectivement TRPV2, cette hypothèse n'a pu être vérifiée. Une expérience possible consisterait à estimer la cytotoxicité et l'accumulation cellulaire du Cd dans les MC3T3 en présence mixte de 2-APB et de SKF 96365 qui inhibe TRPV2 (Clapham *et al* 2003). Ce dernier modulateur pourrait donc potentiellement servir de « contrôle négatif » dans une étude sur le mécanisme d'activation de TRPV2 par le 2-APB. Cependant, l'effet conjugué de ces deux produits sur la survie cellulaire n'a pas été vérifié. De plus, la sensibilisation au Cd observée en présence de SKF 96365 suggère que ce

modulateur pourrait, en lui-même, avoir des effets encore non répertoriés. L'effet du 2-APB sur les cellules murines différenciées n'a pas été vérifié étant donné l'absence d'impact dans les cultures immatures ainsi que la perte d'inhibition par le Ca et le Mg au cours de la différenciation. Cependant, il n'est pas exclu que le 2-APB puisse moduler les canaux TRP dans les cellules murines différenciées.

La biologie actuelle n'a pas encore attribué de fonctions précises aux canaux de type TRP dans le métabolisme osseux ou l'étiologie de l'ostéoporose. La présence de TRPV2 dans les cellules ostéoblastiques pourrait être en lien avec ses fonctions osmorégulatrices (Huang 2004). Peu d'informations sont disponibles à ce sujet et cette relation demeure à démontrer. Les canaux de la classe des TRPM sont cependant un peu mieux caractérisés: le canal TRPM7 joue un rôle majeur dans le modelage osseux chez l'embryon (Elizondo *et al* 2005). De plus, des mutations dans le gène de TRPM6 sont associées à une hypomagnésémie familiale accompagnée d'une hypocalcémie secondaire (Chubanov *et al* 2004, Clapham *et al* 2003), deux facteurs qui augmentent les risques de développer l'ostéoporose. Ces canaux ne sont donc pas seulement importants pour la réabsorption rénale du Ca et du Mg, mais agissent aussi sur l'homéostasie ionique des cellules osseuses lors du modelage et du remodelage du squelette. Selon les résultats obtenus, les canaux TRPM6 et TRPM7 sont probablement impliqués dans l'entrée du Cd dans les ostéoblastes. Leur présence et leur fonction étant démontrées dans ce type cellulaire (Abed et Moreau 2007; voir Annexe B, Tableau II), le Cd entrant par ces canaux pourrait être un autre mécanisme causant l'ostéoporose. Ceci expliquerait comment des expositions chroniques à de faibles taux de Cd, n'occasionnant aucune néphrotoxicité, peuvent ainsi provoquer des pathologies osseuses selon un mécanisme direct.

3.5 Prévention et traitement de l'ostéoporose induite par le Cd

Le Cd étant un polluant d'importance grandissante dans les pays industrialisés, il est essentiel de se prémunir contre ses effets nocifs. Les bienfaits d'une saine alimentation, dont un apport adéquat en Ca et en Mg, sont sans

équivoque la méthode la plus simple pour prévenir l'ostéoporose induite par le Cd. Dans certains cas, l'apport de ces minéraux peut même, à long terme, permettre aux patients ostéoporotiques de retrouver une densité osseuse comparable à celle de sujets sains pour un même groupe d'âge (Stendig-Lindberg *et al* 2004, Heany 2000). Les avantages de cette solution sont, d'abord, le faible coût de ces suppléments alimentaires par rapport aux coûts engendrés par les soins palliatifs liés à cette maladie, ensuite, le peu d'effets secondaires liés à la consommation de ces suppléments, particulièrement lorsqu'ils sont en association avec des aliments.

Les résultats présentés dans les précédents articles suggèrent que le 2-APB pourrait également avoir des applications cliniques dans le traitement de l'ostéoporose induite par le Cd. Cependant, l'effet premier de cet agent pharmacologique s'applique aux canaux calciques et interfère donc avec le métabolisme du Ca. De plus, très peu d'études *in vivo* existent concernant ce modulateur de TRP. L'équipe de Nicoud et collègues (2007) a démontré que le 2-APB protège les rats contre les lésions hépatiques associées à l'ischémie/reperfusion, entre autre en diminuant l'entrée de Ca dans les hépatocytes. Cependant, cette étude ne fait nulle mention des impacts systémiques du 2-APB, ni des effets potentiels à long terme. La littérature est malheureusement très pauvre à ce sujet; le 2-APB est un agent pharmacologique relativement récent et la plupart des travaux portent sur ses effets cellulaires ou tissulaires. Ses effets sont d'ailleurs encore méconnus et semblent dépendant de la concentration utilisée (Bootman *et al* 2002); certaines disparités de résultats existent entre les diverses équipes. Par contre, la protection contre le Cd que ce composé apporte aux OB humains suggère des applications cliniques qui méritent d'être explorées. L'équipe de Dobrydneva (2006) a d'ailleurs réussi à générer divers analogues du 2-APB, dont certains ont des effets cellulaires variables. Il serait intéressant de vérifier la toxicité de ces composés, ainsi que leurs effets sur l'accumulation cellulaire et la cytotoxicité du Cd, sur divers types cellulaires afin d'en évaluer les impacts *in vivo* et les usages cliniques potentiels.

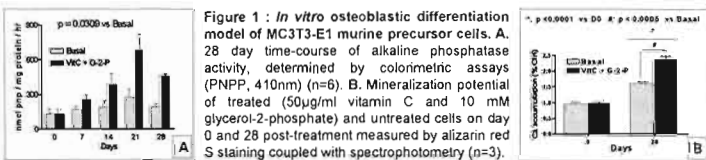
Conclusion

La somme des résultats obtenus dans cette étude a permis de générer de nombreuses hypothèses quant aux mécanismes d'accumulation cellulaire du Cd dans les cellules ostéoblastiques, et donc des mécanismes de toxicité directe dans l'étiologie de l'ostéoporose induite par le Cd. D'abord, les cellules ostéoblastiques immatures sont plus sensibles aux effets cytotoxiques du Cd que les cellules différenciées qui, possiblement, expriment moins les canaux membranaires susceptibles de transporter le Cd. De plus, l'entrée du Cd dans ces cellules est un processus spécifique effectué par un ou plusieurs transporteurs insensibles à la dépolarisation membranaire ou aux modulateurs sélectifs de TRPC, mais modulés par le Ca, le Mg et le 2-APB. Ces caractéristiques sont associées aux canaux TRPM6 et TRPM7, ainsi que TRPV2 dans le cas des cellules murines. L'usage de suppléments de Ca et de Mg dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose est bien documenté; cet effet protecteur était jusqu'à maintenant attribué à des mécanismes systémiques régulant l'absorption intestinale et l'excrétion rénale de ces cations, et aux impacts subséquents sur l'équilibre du remodelage osseux. Cependant, nos observations permettent de suggérer qu'une part des effets observés pourrait être liée à des mécanismes au niveau des cellules ostéoblastiques elles-mêmes. Peu d'études ont été faites sur le rôle des canaux de type TRP dans les cellules osseuses; l'effet protecteur du 2-APB dans les cellules humaines indique un rôle potentiellement important de certains de ces canaux dans le développement de l'ostéoporose induite par de faibles expositions au Cd. L'usage de 2-APB ou de ses analogues dans le traitement de l'ostéoporose n'a à ce jour jamais été testé. Une connaissance approfondie de ses propriétés pharmacologiques et physiologiques est nécessaire. Cependant, les observations faites sur des modèles *in vivo* murins ne sont peut-être pas représentatives des effets cliniques désirables chez les patients humains.

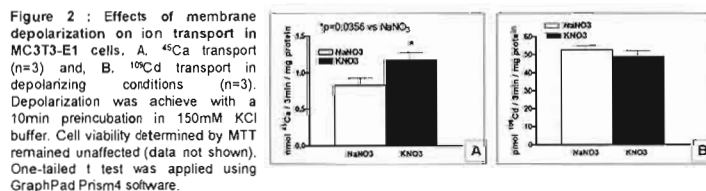
Cd is a divalent metal with a half-life of 15-30 years in the body, whose renal, hepatic and skeletal toxicity are well documented. A classic example is the Itai-itai disease, Japanese expression for «ouch-ouch», symptom of a massive Cd ingestion causing renal and hepatic lesions, as well as skeletal abnormalities such as susceptibility to fractures, osteoporosis and osteomalacia. The mechanisms of Cd toxicity on bones were long thought to be caused by the alteration of vitamin D activation along the kidney, thus indirectly causing bone disorders. Recent studies support the hypothesis that Cd has an effect on bone cells themselves, e.g. osteoblasts and osteoclasts, at exposure levels that do not affect kidneys. The skeleton is in constant remodeling, fruit of the equilibrium between bone resorption mediated by osteoclasts, and bone formation done by osteoblasts. Since Cd accumulates in bone tissue and is constantly released throughout the remodeling process, osteoblasts and their mesenchymal precursors within the bone marrow are potentially exposed to low doses of Cd over a long period of time. Murine preosteoblastic MC3T3 cells were used to determine the cytotoxicity of Cd in different culture conditions. The LC₅₀ of Cd on these cells in basal conditions was 9.88±0.54 μM. The presence of Ca in the medium diminished Cd toxicity while potassium-induced membrane depolarization did not affect the LC₅₀. Transport assays corroborated these findings, suggesting that Cd does not enter osteoblasts through voltage-dependent calcium channels. The expression of some voltage insensitive calcium and magnesium channels of the "Transient Receptor Potential" [TRP] class was observed in MC3T3 cells, a *g*-TRPM1, TRPM6, TRPM7, TRPV2 and TRPC4. Interestingly, the absence of extracellular magnesium increased the cytotoxicity of Cd. Further studies will explore the involvement of the latter channels in cellular Cd entry, as well as the influence of osteoblastic differentiation on the expression of TRP channels and Cd sensitivity. From a clinical point of view, the identification of Cd cellular entry pathways in osteoblastic cells could lead to a potential therapeutic target able to slow the evolution of such affections by minimizing Cd entry.

- Cd can affect bone in two ways : indirect toxicity, through vitamin D metabolism disruption (1), and direct toxicity whose mechanisms are not well understood (2)
- Direct toxicity of Cd on osteoblasts is potentially due to calcium and zinc mimetic properties of this ion (2, 3)
- Osteoblast metabolism varies throughout differentiation, adjusting to cellular needs and functions (4)
- Among the differences between immature and fully differentiated osteoblasts, alkaline phosphatase activity and mineralization potential are widely used markers (5)

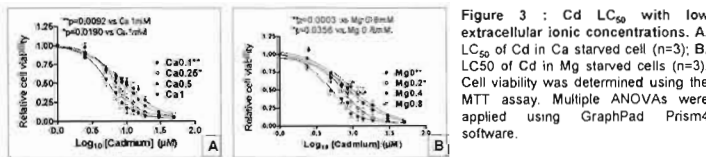
In vitro osteoblastic differentiation model from murine osteoblastic-like cell line MC3T3-E1



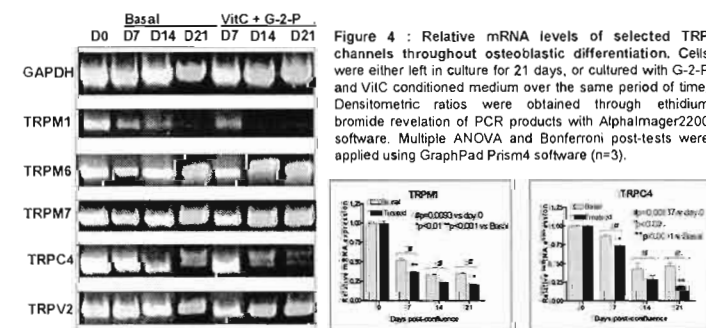
Effect of membrane depolarization on ⁴⁵Ca, ¹⁰⁹Cd transport and cell viability



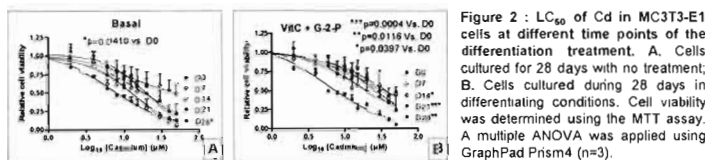
Effect of low extracellular Ca or Mg on Cd toxicity



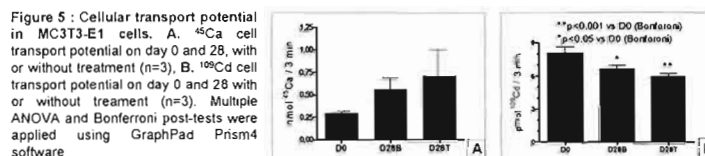
Expression of TRP channels in MC3T3-E1 cells throughout in vitro differentiation



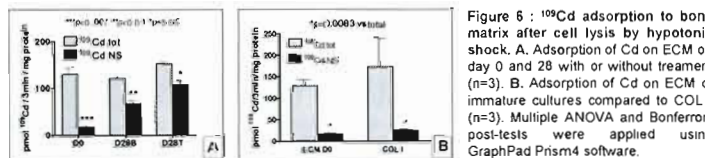
Variability of cadmium LC50 at different time points of the differentiation treatment



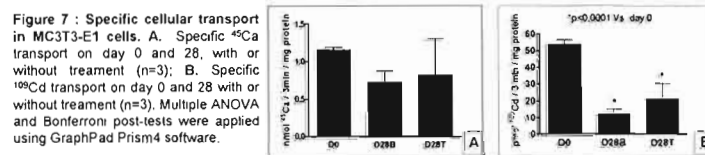
Cellular Ca and Cd transport potential in immature and fully differentiated osteoblastic cells



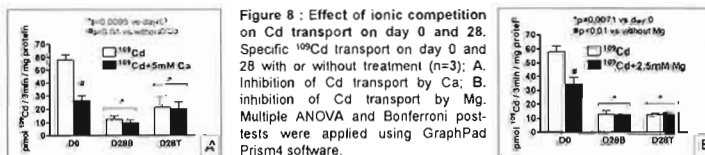
Cd adsorption to type I collagen and bone matrix of immature and differentiated cultures



Specific Ca and Cd transport in immature and differentiated MC3T3 cells



Ionic competition between Cd and Ca or Mg in immature and differentiated MC3T3 cells



- Cd does not enter murine osteoblasts through voltage-dependent calcium channels
- VitC and G-2-P treatment diminishes Cd toxicity and specific ¹⁰⁹Cd transport
- High extracellular Mg or Ca protects from Cd cytotoxicity and diminishes Cd transport
- Cd accumulates differentially in MC3T3-E1 osteoblast-like cells according to degree of maturity
- TRPM1 and TRPC4 relative mRNA expressions weaken in more mature cells
- Cd exhibits high affinity for COL I and ECM

- Further studies will try to determine Cd entry mechanisms into cells through a pharmacological approach : TRPC4 and TRPM1 blockers and activators
- These results will be compared to that of other cell models, namely primary osteoblasts isolated from rat and mouse bone marrow

•This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC)



1. CHALKLEY SR, Richmond J, Barltrop D, 1998, Occupational and Environmental Medicine 55:591-596
2. LONG GJ, 1997, Toxicology and Applied Toxicology 143:189-195
3. KING LM, Banks WA, George WJ, 1999, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 289:825-830
4. LIU F, Malaval F, Aubin JE, 2003, Journal of Cell Science 116:1787-1796
5. STAINS JP, Civitelli R, 2003, Genome Biology 4:222.1-222.4

Annexe B: Résultats supplémentaires

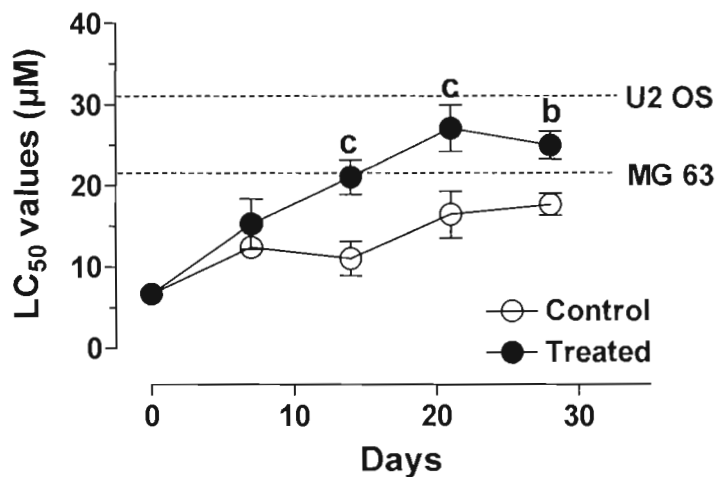


Fig.1: Dose-response curves of three osteoblast-like cell lines exposed to Cd and impact of differentiation treatment LC_{50} values of MC3T3 cells. Impact of differentiation treatment on MC3T3 cell line sensitivity to Cd relative to MG 63 and U2 OS cell lines. LC_{50} values for MG 63 (22.2 ± 2.4) and U2 OS (32.2 ± 1.8) cell lines are represented by dashed lines. Significant difference (b: $p < 0.01$, c: $p < 0.001$ versus basal conditions, Bonferoni's post test).

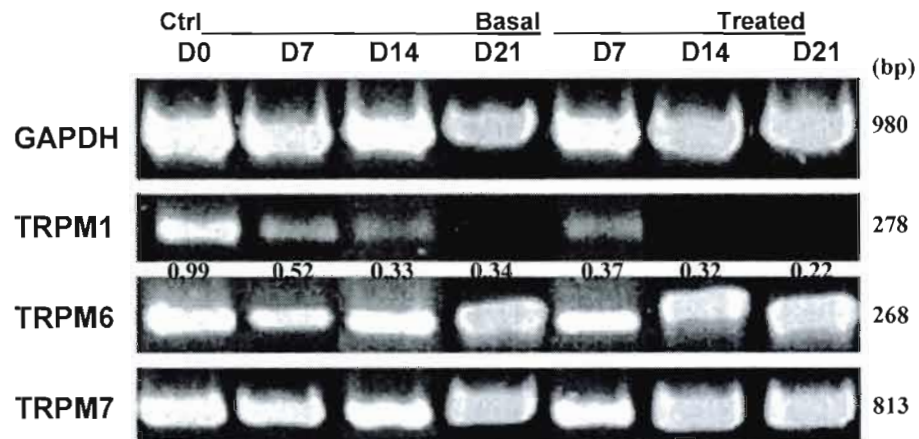


Fig.2: Impact of differentiation on TRPM channel gene expression (a) RT-PCR of TRPM1, TRPM6 and TRPM7 at different time-points of the differentiation treatment in MC3T3 cells. Numbers represent the densitometric ratio of each PCR product relative to GAPDH from the corresponding condition. The length of PCR products is indicated on the right hand side as base pairs (bp).

Tab.I: Gene expression of TRPC and TRPV channels in osteoblasts.
 Compilation of TRPC and TRPV channel expression in 3 osteoblast-like cell lines observed following RT-PCR reaction using specific primers. NA: non applicable (in humans, TRPC2 is a pseudogene).

Cells :	human		murin
TRPC	MG 63	U2 OS	MC3T3
1	+	+	-
2	NA	NA	+
3	+	+	-
4	+	-	+
5	-	-	-
6	+	+	+
7	-	-	+
TRPV2	+	+	+

Tab.II: Gene expression of TRPM channels in osteoblasts. Compilation of TRPM channel expression in 3 different osteoblast-like cell lines observed following RT-PCR reaction using specific primers.

Cells :	human		murin
TRPM	MG 63	U2 OS	MC3T3
1	-	-	+
2	-	-	-
3	+	+	-
4	+	+	+
5	-	-	-
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+

BIBLIOGRAPHIE

- Abed E, Moreau R (2005), Expression de canaux "melastatin related, transient receptor potential" (TRPM) dans les cellules ostéoblastiques, *Médecine/Sciences* 21: 8
- Abed E, Moreau R (2007), Importance of melastatin-like transient receptor potential 7 and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation, *Cell Prolif.* 40: 849-865
- Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D (2004), In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions, *J Cell Sci.* 117: 5655-5664
- Athanasou NA (1996), Current Concepts Review - Cellular Biology of Bone-Resorbing Cells, *J Bone Joint Surg Am* 78: 1096-1112
- Asmuss M, Mullenders LH, Hartwig A (2000), Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins, *Toxicol.Lett.* 112-113: 227-231
- Bannon DI, Abounader R, Lees PS, Bressler JP (2003), Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells, *Am.J Physiol Cell Physiol* 284: C44-C50
- Barry EL (2000), Expression of mRNAs for the alpha 1 subunit of voltage-gated calcium channels in human osteoblast-like cell lines and in normal human osteoblasts, *Calcif.Tissue Int* 66: 145-150
- Barry EL, Gesek FA, Froehner SC, Friedman PA (1995), Multiple calcium channel transcripts in rat osteosarcoma cells: selective activation of alpha 1D isoform by parathyroid hormone, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 10914-10918
- Bergeron PM, Jumarie C (2006), Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation, *Toxicology* 219: 156-166
- Bergh JJ, Xu Y, Farach-Carson MC (2004), Osteoprotegerin expression and secretion are regulated by calcium influx through the L-type voltage-sensitive calcium channel, *Endocrinology* 145: 426-436
- Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J (1977), Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63, *Antimicrob. Agents Chemother.* 12(1):11-15

- Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Peppiatt CM (2002), 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release, *FASEB J.* 16: 1145-1150
- Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM (1996), Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover, *Endocr.Rev.* 17: 333-368
- Canalis E (2003), Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis, *Curr.Opin.Rheumatol.* 15: 454-457
- Candelieri GA, Rao Y, Floh A, Sandler SD, Aubin JE (1999), cDNA fingerprinting of osteoprogenitor cells to isolate differentiation stage-specific genes, *Nucleic Acids Res.* 27: 1079-1083
- Chalkley SR, Richmond J, Barltrop D (1998), Measurement of vitamin D3 metabolites in smelter workers exposed to lead and cadmium, *Occup.Environ.Med.* 55: 446-452
- Chubanov V, Waldegger S, Schnitzler M, Vitzthum H, Sassen MC, Seyberth HW, Konrad M, Gudermann T (2004), Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 2894-2899
- Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D (2003), International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels, *Pharmacol.Rev.* 55: 591-596
- Coonse KG, Coonts AJ, Morrison EV, Heggland SJ (2007), Cadmium induces apoptosis in the human osteoblast-like cell line Saos-2, *J Toxicol.Environ.Health A* 70: 575-581
- Demiralp B, Chen HL, Koh AJ, Keller ET, McCauley LK (2002), Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos, *Endocrinology* 143: 4038-4047
- Dohi Y, Sugimoto K, Yoshikawa T, Ohgushi H, Katsuda T, Tabata S, Moriyama T (1993), Effect of cadmium on osteogenesis within diffusion chambers by bone marrow cells: biochemical evidence of decreased bone formation capacity, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 120: 274-280
- Dobrydneva Y, Abelt CJ, Dovel B, Thadigiri CM, Williams RL, Blackmore PF (2006), 2-Aminoethoxydiphenyl borate as a prototype drug for a group of structurally related calcium channel blockers in human platelets, *Mol Pharmacol* 69:247-256

- Elisma F, Jumarie C (2001), Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 285: 662-668
- Elizondo MR, Arduini BL, Paulsen J, MacDonald EL, Sabel JL, Henion PD, Cornell RA, Parichy DM (2005), Defective skeletogenesis with kidney stone formation in dwarf zebrafish mutant for *trpm7*, *Curr. Biol.* 15: 667-671
- Endo T, Kimura O, Sakata M (2002), Effects of P-glycoprotein inhibitors on cadmium accumulation in cultured renal epithelial cells, LLC-PK1, and OK, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185: 166-171
- Erfurt C, Roussa E, Thevenod F (2003), Apoptosis by Cd²⁺ or CdMT in proximal tubule cells: different uptake routes and permissive role of endo/lysosomal CdMT uptake, *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 285: C1367-C1376
- Foulkes EC (2000), Transport of toxic heavy metals across cell membranes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223: 234-240
- Franceschi RT (1999), The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment, *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 10: 40-57
- Funato N, Ohtani K, Ohyama K, Kuroda T, Nakamura M (2001), Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors, *Mol. Cell Biol.* 21: 7416-7428
- Ganss B, Jheon A (2004), Zinc finger transcription factors in skeletal development, *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 15: 282-297
- Habeebu SS, Liu J, Liu Y, Klaassen CD (2000), Metallothionein-null mice are more susceptible than wild-type mice to chronic CdCl₂-induced bone injury, *Toxicol. Sci.* 56: 211-219
- Heany RP (2000), Calcium, Dairy Products and Osteoporosis *Journal of the American College of Nutrition* 19(2): 83S-99S
- Heinegard D, Oldberg A (1989), Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules, *FASEB J* 3: 2042-2051
- Henson MC, Chedrese PJ (2004), Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction, *Exp. Biol. Med. (Maywood.)* 229: 383-392
- Hess DC, Hill WD, Carroll JE, Borlongan CV (2004), Do bone marrow cells generate neurons?, *Arch. Neurol.* 61: 483-485

- Hinkle PM, Kinsella PA, Osterhoudt KC (1987), Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels, *J Biol.Chem.* 262: 16333-16337
- Hinkle PM, Shanshala ED, Nelson EJ (1992), Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in cadmium uptake, *J Biol.Chem.* 267: 25553-25559
- Huang CL (2004), The transient receptor potential superfamily of ion channels, *J Am.Soc.Nephrol.* 15: 1690-1699
- Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF (2007), Cadmium-induced cancers in animals and in humans, *Int J Occup.Environ.Health* 13: 202-212
- Jadlowiec J, Koch H, Zhang X, Campbell PG, Seyedain M, Sfeir C (2004), Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway, *J Biol.Chem.* 279: 53323-53330
- Janssens K, Van Hul W (2002), Molecular genetics of too much bone, *Hum.Mol.Genet.* 11: 2385-2393
- Jarup L (2002), Cadmium overload and toxicity, *Nephrol.Dial.Transplant.* 17 Suppl 2: 35-39
- Jiang D, Franceschi RT, Boules H, Xiao G (2004), Parathyroid hormone induction of the osteocalcin gene. Requirement for an osteoblast-specific element 1 sequence in the promoter and involvement of multiple-signaling pathways, *J Biol.Chem.* 279: 5329-5337
- Joseph P, Muchnok TK, Klishis ML, Roberts JR, Antonini JM, Whong WZ, Ong TM (2001), Cadmium-Induced Cell Transformation and Tumorigenesis Are Associated with Transcriptional Activation of *c-fos*, *c-jun*, and *c-myc* Proto-Oncogenes: Role of Cellular Calcium and Reactive Oxygen Species, *Toxicological Sciences* 61: 295-303
- Katsuta O, Hiratsuka H, Matsumoto J, Iwata H, Toyota N, Tsuchitani M, Umemura T, Marumo F (1994), Cadmium-induced osteomalacic and osteopetrotic lesions in ovariectomized rats, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 126: 58-68
- Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS (2003), Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects, *J Nutr.* 133: 1477S-1480S
- Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G (2001), Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes, *J Biol.Chem.* 276: 7101-7107

- Kim J, Sharma RP (2004), Calcium-mediated activation of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) and apoptosis in response to cadmium in murine macrophages, *Toxicol.Sci.* 81: 518-527
- Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, Cho JY, Ryoo HM (2004), Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2, *J Biol.Chem.* 279: 50773-50780
- King LM, Banks WA, George WJ (1999), Differences in cadmium transport to the testis, epididymis, and brain in cadmium-sensitive and -resistant murine strains 129/J and A/J, *J Pharmacol.Exp.Ther.* 289: 825-830
- King LM, Banks WA, George WJ (2000), Differential zinc transport into testis and brain of cadmium-sensitive and -resistant murine strains, *J Androl* 21: 656-663
- Komarova SV, Ataulkhanov FI, Globus RK (2000), Bioenergetics and mitochondrial transmembrane potential during differentiation of cultured osteoblasts, *Am.J Physiol Cell Physiol* 279: C1220-C1229
- Kondo H, Nifuji A, Takeda S, Ezura Y, Rittling SR, Denhardt DT, Nakashima K, Karsenty G, Noda M (2005), Unloading induces osteoblastic cell suppression and osteoclastic cell activation to lead to bone loss via sympathetic nervous system, *J Biol.Chem.* 280: 30192-30200
- Labelle D, Jumarie C, Moreau R (2007), Capacitative calcium entry and proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells, *Cell Prolif.* 40: 866-884
- Le Mellay, V, Grosse B, Lieberherr M (1997), Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol, *J Biol.Chem.* 272: 11902-11907
- Lerner UH (2006), Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis, *J Dent.Res.* 85: 584-595
- Lévesque M, Martineau C, Jumarie C, Moreau R (2008), Characterisation of cadmium uptake and cytotoxicity in osteoblast-like MG 63 cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* doi: 10.1016/j.taap.2008.04.016
- Li M, Jiang J, Yue L (2006), Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7, *J Gen.Physiol* 127: 525-537
- Li X, Udagawa N, Itoh K, Suda K, Murase Y, Nishihara T, Suda T, Takahashi N (2002), p38 MAPK-mediated signals are required for inducing osteoclast differentiation but not for osteoclast function, *Endocrinology* 143: 3105-3113

- Liu AL, Zhang ZM, Zhu BF, Liao ZH, Liu Z (2004), Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation, *Cell Biol.Int* 28: 905-911
- Liu F, Malaval L, Aubin JE (2003), Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation, *J Cell Sci.* 116: 1787-1796
- Long GJ (1997), Cadmium perturbs calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells; a possible role for protein kinase C, *Toxicol.Lett.* 91: 91-97
- Manolagas SC (2000), Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis, *Endocr.Rev.* 21: 115-137
- Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J (2002), Osteopontin--a molecule for all seasons, *QJM.* 95: 3-13
- Mbalaviele G, Jaiswal N, Meng A, Cheng L, Van Den BC, Thiede M (1999), Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors, *Endocrinology* 140: 3736-3743
- Miller AJ, Du J, Rowan S, Hershey CL, Widlund HR, Fisher DE (2004), Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma, *Cancer Research* 64, 509-516
- Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001), Mesenchymal stem cells, *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 226: 507-520
- Minke B, Cook B (2002), TRP channel proteins and signal transduction, *Physiol Rev.* 82: 429-472
- Miyahara T, Tonoyama H, Watanabe M, Okajima A, Miyajima S, Sakuma T, Nemoto N, Takayama K (2001), Stimulative effect of cadmium on prostaglandin E2 production in primary mouse osteoblastic cells, *Calcif.Tissue Int* 68: 185-191
- Mocetti P, Ballanti P, Zalzal S, Silvestrini G, Bonucci E, Nanci A (2000), A histomorphometric, structural, and immunocytochemical study of the effects of diet-induced hypocalcemia on bone in growing rats, *J Histochem.Cytochem.* 48: 1059-1078

- Monteilh-Zoller MK, Hermosura MC, Nadler MJ, Scharenberg AM, Penner R, Fleig A (2003), TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions, *J Gen. Physiol* 121: 49-60
- Muller B, Axelsson MD, Ohlander B (2002), Adsorption of trace elements on pyrite surfaces in sulfidic mine tailings from Kristineberg (Sweden) a few years after remediation, *Sci. Total Environ.* 298: 1-16
- Neeper MP, Liu Y, Hutchinson TL, Wang Y, Flores CM, Qin N (2007), Activation properties of heterologously expressed mammalian TRPV2: evidence for species dependence, *J Biol. Chem.* 282: 15894-15902
- Nicoud IB, Knox CD, Jones CM, Anderson CD, Pierce JM, Belous AE, Earl TM, Chari RS (2007), 2-APB protects against liver ischemia-reperfusion injury by reducing cellular and mitochondrial calcium uptake, *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 293: G623-G630
- Nieves JW (2005), Osteoporosis: the role of micronutrients, *Am. J Clin. Nutr.* 81: 1232S-1239S
- Noël L, Guerin T, Kolf-Clauw M (2004), Subchronic dietary exposure of rats to cadmium alters the metabolism of metals essential to bone health, *Food Chem. Toxicol.* 42: 1203-1210
- Padinjat R, Andrews S (2004), TRP channels at a glance, *J Cell Sci.* 117: 5707-5709
- Pischon N, Darbois LM, Palamakumbura AH, Kessler E, Trackman PC (2004), Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor-alpha in osteoblasts, *J Biol. Chem.* 279: 30060-30065
- Pulido MD, Parrish AR (2003), Metal-induced apoptosis: mechanisms, *Mutat. Res.* 533: 227-241
- Qin C, Baba O, Butler WT (2004), Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis, *Crit Rev. Oral Biol. Med.* 15: 126-136
- Raisz LG (1999), Physiology and pathophysiology of bone remodeling, *Clin. Chem.* 45: 1353-1358
- Raisz LG (2005), Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, *J Clin. Invest* 115: 3318-3325
- Ralston SH, de Crombrughe B (2006), Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis, *Genes Dev.* 20: 2492-2506

- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, III (2002), Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton, *Endocr.Rev.* 23: 279-302
- Rosker C, Graziani A, Lukas M, Eder P, Zhu MX, Romanin C, Groschner K (2004), Ca(2+) signaling by TRPC3 involves Na(+) entry and local coupling to the Na(+)/Ca(2+) exchanger, *J Biol.Chem.* 279: 13696-13704
- Ross FP, Christiano AM (2006), Nothing but skin and bone, *J Clin.Invest* 116: 1140-1149
- Schlingmann KP, Gudermann T (2005), A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport, *J Physiol* 566: 301-308
- Shin JH, Kukita A, Ohki K, Katsuki T, Kohashi O (1995), In vitro differentiation of the murine macrophage cell line BDM-1 into osteoclast-like cells, *Endocrinology* 136: 4285-4292
- Sorkin AM, Dee KC, Knothe Tate ML (2004), "Culture shock" from the bone cell's perspective: emulating physiological conditions for mechanobiological investigations, *Am.J Physiol Cell Physiol* 287: C1527-C1536
- Sowa H, Kaji H, Hendy GN, Canaff L, Komori T, Sugimoto T, Chihara K (2004), Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2, *J Biol.Chem.* 279: 40267-40275
- Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J, Fagard R (1999), Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group, *Lancet* 353: 1140-1144
- Stanford CM, Keller JC (1991), The concept of osseointegration and bone matrix expression, *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 2: 83-101
- Stendig-Lindberg G, Koeller W, Bauer A, Rob PM (2004), Experimentally induced prolonged magnesium deficiency causes osteoporosis in the rat, *Eur.J Intern.Med.* 15: 97-107
- Thomas GP, Baker SU, Eisman JA, Gardiner EM (2001), Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts, *J Endocrinol.* 170: 451-460
- Toromanoff A, Ammann P, Mosekilde L, Thomsen JS, Riond JL (1997), Parathyroid hormone increases bone formation and improves mineral balance in vitamin D-deficient female rats, *Endocrinology* 138: 2449-2457

- Usai C, Barberis A, Moccagatta L, Marchetti C (1999), Pathways of cadmium influx in mammalian neurons, *J Neurochem.* 72: 2154-2161
- Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E (1994), Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin, *Blood* 84: 753-763
- Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT (1999), Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential, *J Bone Miner. Res.* 14: 893-903
- Weiner S, Traub W (1992), Bone structure: from angstroms to microns, *FASEB J* 6: 879-885
- Wenstrup RJ, Witte DP, Florer JB (1996), Abnormal differentiation in MC3T3-E1 preosteoblasts expressing a dominant-negative type I collagen mutation, *Connect. Tissue Res.* 35: 249-257
- Yamaguchi DT, Green J, Kleeman CR, Muallem S (1989), Characterization of volume-sensitive, calcium-permeating pathways in the osteosarcoma cell line UMR-106-01, *J Biol. Chem.* 264: 4383-4390
- Yamakage M, Namiki A (2002), Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review, *Can. J Anaesth.* 49: 151-164
- Yamauchi M, Yamaguchi T, Kaji H, Sugimoto T, Chihara K (2005), Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells, *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 288: E608-E616
- Yanagiya T, Imura N, Enomoto S, Kondo Y, Himeno S (2000), Suppression of a high-affinity transport system for manganese in cadmium-resistant metallothionein-null cells, *J Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 1080-1086
- Yao F, Schaffer PA (1995), An activity specified by the osteosarcoma line U2OS can substitute functionally for ICP0, a major regulatory protein of Herpes simplex virus type 1, *J Virology* 69(10): 6249-6258

Sites internet:

<http://pharyngula.org/images/bonefiles/bonestruct.jpg>

www.boneandcancer.org/research.htm

<http://chimie.ineris.fr/fr/lespdf/metodexpchron/cadmium.pdf>

<http://www.epa.gov/iris/subst/0141.htm>

<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>

www.biochem.ubc.ca