



HAL
open science

Homéostasie du pyrophosphate dans les maladies calcifiantes

Audrey Laurain

► **To cite this version:**

Audrey Laurain. Homéostasie du pyrophosphate dans les maladies calcifiantes. Médecine humaine et pathologie. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6005 . tel-03714967

HAL Id: tel-03714967

<https://theses.hal.science/tel-03714967v1>

Submitted on 6 Jul 2022

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

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

THESE DE DOCTORAT

Homéostasie du Pyrophosphate dans les maladies calcifiantes acquises chez l'Homme

Audrey LAURAIN

LP2M CNRS UMR 7073

Service de Néphrologie, dialyse et transplantation du CHU de Nice

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en Sciences de
la Vie et de la Santé,**
option recherches cliniques et
thérapeutiques d'Université Côte
d'Azur

Dirigée par Isabelle RUBERA, CRCN
et Guillaume FAVRE, PU-PH
Soutenue le : 31 mars 2022 à Nice

Devant le jury, composé de :

Justine BACCHETTA, PU-PH Université Lyon Est
Jean-Charles DUCLOS VALLEE PU-PH Université Paris-Sud
Hervé KEMPF CRCN INSERM, Université de Nancy
Georges LEFTHERIOTIS, PU-PH Université Côte d'Azur



Homéostasie du Pyrophosphate dans les maladies calcifiantes acquises chez l'Homme

Jury :

Président du jury :

Georges LEFTHERIOTIS, PU-PH, Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Justine BACCHETTA, PU-PH, Université Lyon Est

Jean-Charles DUCLOS VALLEE, PU-PH, Université Paris-Sud

Examineurs

Hervé KEMPF, CRCN INSERM, Université de Nancy

Invités

Vincent ESNAULT, PU-PH, Université Côte d'Azur

Résumé et mots clés

Homéostasie du pyrophosphate dans les maladies calcifiantes acquises chez l'homme

Thèse d'université présentée par le Dr Audrey Laurain
Sous la direction du Dr Isabelle Rubera et du Pr Guillaume Favre

Certaines maladies chroniques, notamment hépatiques ou rénales, sont associées à une forte prévalence de calcification artérielle dont les déterminants ne sont pas connus. Aux stades les plus évolués de ces maladies, caractérisées par une fibrose d'organe et une insuffisance fonctionnelle, la transplantation hépatique ou rénale est proposée.

Le pyrophosphate est un puissant inhibiteur physiologique circulant de la calcification. En pathologie, un déficit en pyrophosphate est associé aux calcifications artérielles au cours de maladies génétiques secondaires à l'inactivation des gènes codants pour ABCC6 (adénosine triphosphate ATP-binding cassette, sous-famille C, membre 6) ou ENPP-1 (ectonucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1). Ces deux protéines sont principalement exprimées dans le foie et elles synthétisent le pyrophosphate qui est éliminé intact par voie urinaire et par hydrolyse grâce aux phosphatases alcalines. L'influence de la transplantation d'organe sur l'homéostasie du pyrophosphate est inconnue.

Les objectifs de la thèse sont d'étudier les déterminants de la concentration plasmatique en pyrophosphate et des calcifications artérielles avant et après transplantation hépatique ou rénale.

Dans une première partie, une nouvelle méthode de dosage standardisée du pyrophosphate dans le plasma a été mise au point pour différents fluides biologiques (milieux de culture, plasma, urine, salive, liquide articulaire). Une demande de brevet européen a été déposée.

Dans une deuxième partie, des patients hémodialysés et transplantés rénaux ont été comparés entre eux et à des témoins. Les patients hémodialysés et les patients transplantés ont un déficit en pyrophosphate par rapport aux témoins. L'élimination urinaire de pyrophosphate est inchangée. L'activité plasmatique d'ENPP1 est identique entre les groupes mais l'activité plasmatique des phosphatases alcalines est négativement corrélée à la concentration plasmatique de pyrophosphate. Le déficit en pyrophosphate persiste chez les patients transplantés rénaux malgré une activité plasmatique des phosphatases alcalines normale à distance de la transplantation.

Dans une troisième partie, des patients présentant une fibrose hépatique et une insuffisance hépatocellulaire, d'étiologies variables, ont été comparés entre eux avant et 3 mois après transplantation hépatique. La concentration plasmatique de pyrophosphate est basse avant transplantation, d'autant plus que les scores cliniques de fibrose ou d'insuffisance hépatocellulaire sont élevés. L'élimination urinaire de pyrophosphate est inchangée. L'activité plasmatique des phosphatases alcalines est augmentée. L'expression hépatique des ARNms d'ABCC6 et d'ENPP1 est significativement abaissée par rapport à celle de témoins non cirrhotiques. Les scores radiologiques de calcifications artérielles coronaires ou aortiques sont positivement corrélés à la sévérité de la fibrose ou de l'insuffisance hépatocellulaire.

En conclusion, l'élévation de l'activité plasmatique des phosphatases alcalines avant transplantation hépatique ou rénale participe au déficit en pyrophosphate en augmentant son hydrolyse. La correction complète du déficit en pyrophosphate par la transplantation hépatique indique que le foie est la principale source de pyrophosphate. Le caractère incomplet de la correction du déficit en pyrophosphate par la transplantation rénale est évocateur d'un dialogue foie-rein. Les calcifications artérielles ne sont pas directement corrélées au pyrophosphate, suggérant l'intervention de d'autres agents qu'ils restent à caractériser.

Mots clés : Pyrophosphate, maladie rénale chronique, fibrose hépatique, cirrhose, ABCC6, phosphatase alcaline.

Abstract

Pyrophosphate homeostasis in acquired calcifying diseases in humans

University thesis presented by Dr Audrey Laurain

Under the supervision of Dr Isabelle Rubera and Prof Guillaume Favre

Some chronic diseases, notably liver or kidney diseases, are associated with a high prevalence of arterial calcification, the determinants of which are not known. In the most advanced stages of these diseases, characterized by organ fibrosis and then organ failure, liver or kidney transplantation is suggested.

Pyrophosphate is a potent circulating physiological inhibitor of calcification. In pathology, pyrophosphate deficiency is associated with arterial calcifications during genetic diseases due to mutations in the genes coding for ABCC6 (adenosine triphosphate ATP-binding cassette, subfamily C, member 6) or ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1). Both proteins are mainly expressed in the liver and are involved in pyrophosphate synthesis while it is eliminated by urinary and alkaline phosphatase hydrolysis. The influence of organ transplantation on pyrophosphate homeostasis is unknown.

The objectives of this thesis are to study the determinants of plasma pyrophosphate concentration and arterial calcifications before and after liver or kidney transplantation.

In the first part, a new standardized method for determining the concentration of inorganic pyrophosphate in different biological fluids (culture media, plasma, urine, saliva, joint fluid) was developed. A European patent application has been filed.

In the second part, haemodialysis and kidney transplant patients were compared to each other and to controls. Both haemodialysis and transplant patients have a pyrophosphate deficit compared to controls. Urinary pyrophosphate excretion is unchanged. Plasma ENPP1 activity is identical between groups but plasma alkaline phosphatase activity is negatively correlated with plasma pyrophosphate concentration. Pyrophosphate deficiency persists in renal transplant patients despite normal plasma alkaline phosphatase activity two years after transplantation.

In the third part, patients with hepatic fibrosis and hepatocellular insufficiency, of varying etiologies, were compared before and 3 months after liver transplantation. Plasma pyrophosphate concentration is low before transplantation, and negatively correlated with the clinical scores of fibrosis or hepatocellular insufficiencies are high. While urinary pyrophosphate elimination remains unchanged, plasma alkaline phosphatase activity is increased. Hepatic expression of ABCC6 and ENPP1 mRNA is significantly decreased in patients with chronic liver pathologies compared to non-cirrhotic controls. Radiological scores of coronary or aortic arterial calcifications are positively correlated with the severity of fibrosis or hepatocellular insufficiency.

In conclusion, the elevation of plasma alkaline phosphatase activity before liver or kidney transplantation contributes to pyrophosphate deficiency by increasing its hydrolysis. The complete correction of pyrophosphate deficiency by liver transplantation indicates that the liver is the main source of pyrophosphate. Incomplete correction of pyrophosphate deficiency by renal transplantation suggests a liver-kidney dialogue. Arterial calcifications are not directly correlated with pyrophosphate, suggesting the involvement of other agents that are yet to be determined.

Key words: Pyrophosphate, chronic kidney disease, hepatic fibrosis, cirrhosis, ABCC6, alkaline phosphatase.

Table des matières

Résumé.....	4
Abstract.....	5
Remerciements.....	7
Liste des abréviations.....	8
Liste des tables et Figures.....	9
I. Calcification ou minéralisation.....	11
A. Généralités.....	11
1. Tissu conjonctif et cellules de la matrice extracellulaire.....	11
2. Calcification normale.....	12
3. Calcification pathologique.....	14
4. Acteurs de la calcification.....	17
B. Calcifications artérielles.....	21
1. Types de calcifications artérielles.....	22
2. Mesure des calcifications artérielles.....	23
3. Conséquences des calcifications artérielles.....	26
C. Maladies calcifiantes.....	29
1. Maladies monogéniques.....	29
2. Maladie rénale chronique.....	32
3. Fibrose et/ou insuffisance hépatocellulaire.....	35
II. Pyrophosphate inorganique.....	41
A. Généralités.....	41
B. Homéostasie du Pyrophosphate inorganique.....	42
1. Production du pyrophosphate.....	42
2. Dégradation du pyrophosphate.....	46
C. Pyrophosphate et maladies calcifiantes.....	49
1. Maladies monogéniques calcifiantes.....	49
2. Maladies acquises calcifiantes.....	49
D. Voies possibles en thérapeutique.....	50
1. Administration exogène de Pyrophosphate.....	50
2. Administration de biphosphonates.....	52

3. Inhibiteurs des TNAP (iT NAP)	53
4. ENPP1 recombinant	54
III. OBJECTIFS DE LA THESE.....	55
IV. RESULTATS.....	57
A. Amélioration du dosage du Pyrophosphate	57
1. Historique du dosage.....	57
2. Matériels et méthodes.....	58
3. Principaux résultats, discussion et perspectives	58
B. Homéostasie du Pyrophosphate au cours de la maladie rénale chronique.....	60
1. Objectifs	60
2. Matériels et méthodes.....	60
3. Article.....	61
4. Principaux résultats, discussion et perspectives	70
C. Homéostasie du Pyrophosphate au cours de la fibrose et de l'insuffisance hépatique	74
1. Objectifs	74
2. Matériels et méthodes.....	74
3. Article.....	74
4. Principaux résultats, discussion et perspectives	102
V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	104
VI. Références	108
VII. Datas supplémentaire: revue.....	126

Remerciements

Liste des abréviations :

ACDC : Arterial calcification due to deficiency of CD73 : ecto-5'-nucleotidase (NT5E)

AGE : Advanced Glycation End Products

ANKH : ankylosis protein homolog

AMP : adnosine monophosphate

ATP : adenosine tri phosphate

BMP : Bone morphogenetic protein

BP : biphosphonate

Ca : Calcium

CALJA : calcification of joints and arteries

CHU : centre hospitalo universitaire

CML : cellule musculaire lisse

VSMC : cellule musculaire lisse artériel

DFG : débit de filtration glomérulaire

FRCV : Facteurs de risque cardiovasculaire

GACI : general artery calcification infantile

HTA : hypertension artérielle

HA : Hydroxyapatite

HPP : Hypophosphatasie

IL : Interleukine

KTLS : Keutel Syndrome

IHC : insuffisance hépatocellulaire

LDL : Low Density Lipoprotein

MEC : matrice extracellulaire

MGP : Matrix Gla protein

MMP : Matrix metalloproteinases

MRC : maladie rénale chronique

ODH : ostéodystrophie hépatique

ODR : ostéodystrophie rénale

OPG : ostéoprotégérine

OPN : ostéopontine

PXE : Pseudoxanthome élastique

Pi : Phosphate

PPi : Pyrophosphate

PP : pression pulsée

PAL : phosphatase alcaline

RANK/RANKL : Receptor activator of NF- κ B / ligand

ROS : reactive oxygen species

RUNX 2 : Runt-related transcription factor 2

TC : tissu conjonctif

TO : tissue osseux

TNAP : tissue non alkaline phosphatase

TNF : Tumor necrosis factor

TDM : tomodensitométrie

PTH : parathormone

SC : score calcique

SCC : score calcique coronaire

UDP : uradil di phosphate

VOP : vitesse de l'onde de pouls

VM : vésicule matricielle

Liste des tables et figures

Figures

Figure 1. Description des mécanismes impliqués dans la calcification artérielle (Adapté de Lee et al., 2020)

Figure 2. Les différents types de minéralisation chez l'Homme.

Figure 3. Description du score de Kauppila à partir de radiographie lombaire latérale.

Figure 4. Résumé de l'homéostasie phosphocalcique sous la dépendance de l'os, des reins et de l'intestin en physiologie et au cours de la maladie rénale.

Figure 5. Structure chimique du phosphate, pyrophosphate et des biphosphonates (Orriss et al., 2016)

Figure 6. Représentation schématique adaptée de Ziegler et al., 2018 des principaux acteurs impliqués dans la formation des calcifications ectopiques.

Tables

Tableau 1. Définitions des stades de maladie rénale chronique en fonction de l'altération du débit de filtration glomérulaire.

Tableau 2. Définition et calcul du score de CHILD-PUGH

I. Calcification ou minéralisation

A. Généralités

Le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite, constitués de phosphate et de calcium, sur une trame conjonctive constitue le processus de calcification ou de minéralisation. Normalement, ce processus concerne l'os, les dents et l'organe de l'équilibre (otolithes). Lors de certaines conditions pathologiques, les parois artérielles et les valves cardiaques peuvent également se calcifier caractérisant les calcifications ectopiques.

Le Pyrophosphate (PPi) est une molécule anti-calcifiante très puissante dont la baisse des concentrations plasmatiques est associée à l'augmentation des calcifications artérielles. Les connaissances actuelles concernant les molécules responsables de la production et de la dégradation du PPi sont suffisantes pour permettre d'étudier son homéostasie. Le foie est une des sources du PPi et son hydrolyse par les phosphatases alcalines non tissu-spécifiques (TNAP) est sa principale voie de dégradation.

Les maladies calcifiantes incluent les maladies comprenant une fibrose ou une insuffisance hépatique avec ou sans cholestase ainsi que la maladie rénale chronique à ses différents stades en rapport avec les anomalies du métabolisme minéral qui lui sont associées. Ce sont ces maladies calcifiantes dans lesquelles nous avons décidé d'étudier l'homéostasie du pyrophosphate.

1. Tissu conjonctif et cellules de la matrice extracellulaire

Le tissu conjonctif (TC) est le tissu le plus représenté dans l'organisme humain. Il est constitué de cellule, de fibre et de substance fondamentale amorphe qui composent la matrice extra cellulaire (MEC).

Deux types cellulaires sont retrouvés dans le tissu conjonctif: les cellules fixes comme les fibroblastes/cytes, chondroblastes/cytes, ostéoblastes/cytes et adipocytes et les cellules mobiles comme les histiocytes, mastocytes, et leucocytes. Toutes les cellules composant le tissu conjonctif dérivent du mésenchyme embryonnaire, cependant il persiste des cellules sous forme latente pouvant se différencier à l'âge adulte.

La matrice extra cellulaire est un des composants principaux du tissu conjonctif, et va déterminer la catégorie de celui-ci. La matrice extra cellulaire du tissu conjonctif est un ensemble de macromolécules et se compose de fibres de collagène, d'élastine et de réticuline, ainsi que de la substance fondamentale amorphe qui comprend les protéoglycanes (anciennement mucopolysaccharides) et les glycosaminoglycanes. La synthèse est issue des cellules qui la composent pour permettre ensuite leur « nid » et leur phénotype.

Les fibres de collagène sont les plus abondantes dans la matrice extra cellulaire, elles sont produites par les fibroblastes mais aussi par les chondroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML). Il existe plus de 28 types de collagènes dont les 3 principaux retrouvés chez l'homme dans la matrice extra cellulaire sont le type I, II, III.

Le tissu osseux (TO) est l'un des types de tissu de soutien appartenant à la grande catégorie des tissus conjonctifs. Le tissu osseux se différencie des autres par sa capacité à se minéraliser en formant des cristaux de phosphate de calcium ou hydroxyapatite (HA).

2. Calcification normale

L'os est considéré comme un tissu minéralisé : le tissu osseux est composé d'une matrice extra cellulaire constituée en majorité de collagène de type I, renforcée par des cristaux d'hydroxyapatite issus de la cristallisation de phosphate de calcium carbonaté qui renforce les cellules osseuses comme les ostéoblastes, ostéocytes et ostéoclastes pour participer au maintien du tissu osseux (Levasseur, 2011).

Le début de la minéralisation dépend de la calcification de la matrice osseuse produite par les ostéoblastes qui forment les vésicules prominéralisantes ou matricielles (VM) composées de phosphate (Pi), de calcium (Ca) et de phosphatases alcalines (PAL) constituant une niche pour la formation et le dépôt de cristaux d'HA.

Trois types cellulaires interviennent dans la qualité du tissu osseux : les ostéocytes en majorité, les ostéoblastes et les ostéoclastes.

L'ossification peut être de deux types en fonction de l'os concerné : une ossification membranaire dans les os plats ou os cortical, où les ostéoblastes proviennent directement des cellules mésenchymateuses, et une ossification endochondrale dans les os longs ou os trabéculaire, où les ostéoblastes envahissent le cartilage et le transforment en tissu osseux. Les fonctions de l'os sont de soutenir, protéger et maintenir l'homéostasie phosphocalcique et la régulation de l'équilibre acidobasique et elles dépendent de la qualité du tissu osseux (Guggenbuhl, 2013). Le processus d'ossification est dynamique et continu, en renouvellement constant et régulé par de nombreux inhibiteurs et activateurs contrôlant les interactions entre ostéoblastes et ostéoclastes composées de plusieurs phases reproductibles : 1/ une phase d'activation des ostéoclastes, 2/ une phase de résorption osseuse, 3/ et une phase d'activation des ostéoblastes et 4/ une phase de formation osseuse, avec dépôt de matrice osseuse et calcification.

Les ostéoblastes dérivent des cellules souches mésenchymateuses d'origine médullaire et sécrètent la matrice de l'os ostéoïde pour favoriser la formation osseuse (Marie, 2001). Ils se transforment ensuite en ostéocytes dans la matrice alors sécrétée associés à la modification de leurs fonctions. Une fois la matrice osseuse synthétisée, la plupart des cellules s'aplatissent et bordent la surface de l'os. Une partie des ostéoblastes entre en apoptose et les ostéoblastes restants inclus dans la matrice sécrétée se transforment en ostéocytes reliés entre eux par des extensions cytoplasmiques retrouvées dans les canalicules. Les ostéocytes matures se trouvent donc dans l'os minéralisé, et la structure des ostéocytes varie en fonction de leur ancienneté. Le remodelage secondaire et continu dépend principalement des ostéocytes de la matrice extra cellulaire avec un important réseau de communication intrinsèque de canalicules.

Les ostéoclastes sont de grandes cellules multinucléées d'origine hématopoïétique provenant de la lignée monocytaire et macrophagique. La différenciation de pré-monocytes en précurseurs ostéoclastiques se déroule dans la moelle osseuse, sous le contrôle de trois facteurs, M-CSF, Receptor Activator of Nuclear Factor K B (RANK), le ligand du récepteur RANK (RANKL) et son antagoniste, l'ostéoprotégérine (OPG) (Baron, 2001). Les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse tout au long de la surface osseuse en créant des lacunes de résorption et une alternance de phase de résorption et de migration. Les cellules bordantes sont retrouvées sur des surfaces osseuses quiescentes issues de la différenciation ostéoblastique, avec un rôle possible de maintien des concentrations de calcium pour

permettre l'homéostasie de la minéralisation (Houiller, 2008). Les ostéoclastes seraient les seules cellules capables de dégrader une matrice minéralisée.

La résorption et la formation osseuse dépendent de la reconnaissance de signaux par les ostéocytes en lien avec les contraintes mécaniques appliquées sur l'os. Ceci joue un rôle sur le métabolisme phosphocalcique (Bonewald, 2011). La parathormone (PTH) et le calcitriol modulent le remodelage osseux pour assurer l'homéostasie phospho-calcique (Goltzman et al., 2018). La résistance mécanique dépend de la densité de minéralisation osseuse mais aussi du collagène I et de la structure de l'os caractérisant la « qualité » de l'os (Zaidi, 2007).

La densité minérale osseuse (DMO) augmente pendant l'enfance et l'adolescence jusqu'au pic de masse osseuse à la fin de la croissance dépendant de facteurs génétiques, mécaniques, nutritionnels et hormonaux. Au décours de la croissance intervient la phase de perte osseuse / déminéralisation, initialement surtout trabéculaire jusqu'à la perte osseuse liée à une activation ostéoclastique et une diminution des fonctions ostéoblastiques (Riggs et al., 2008).

En physiologie, la formation est parfaitement contrebalancée par la résorption, ce qui assure le renouvellement osseux. La perte osseuse apparaît lors d'un déséquilibre comme celui observé au cours de la ménopause où la résorption augmente, ou bien lors du vieillissement avec une diminution de l'ostéoformation. En pathologie, l'ostéoporose est caractérisée par une augmentation de la résorption osseuse et une diminution de la formation osseuse à l'origine d'une perte de la masse osseuse, de l'augmentation du risque de fracture (Cummings et al., 1993) et parallèlement l'évolution de calcification artérielle.

3. Calcification pathologique

Le phénomène de calcification pathologique dépend d'un processus d'ostéogénèse et de la formation de cristaux d'hydroxyapatite sur des sites habituellement non concernés par la calcification. Les mécanismes impliqués dans l'apparition des calcifications artérielles sont multiples et comprennent plusieurs étapes résumées dans la figure ci-dessous adaptée du travail de Lee (Lee et al., 2020).

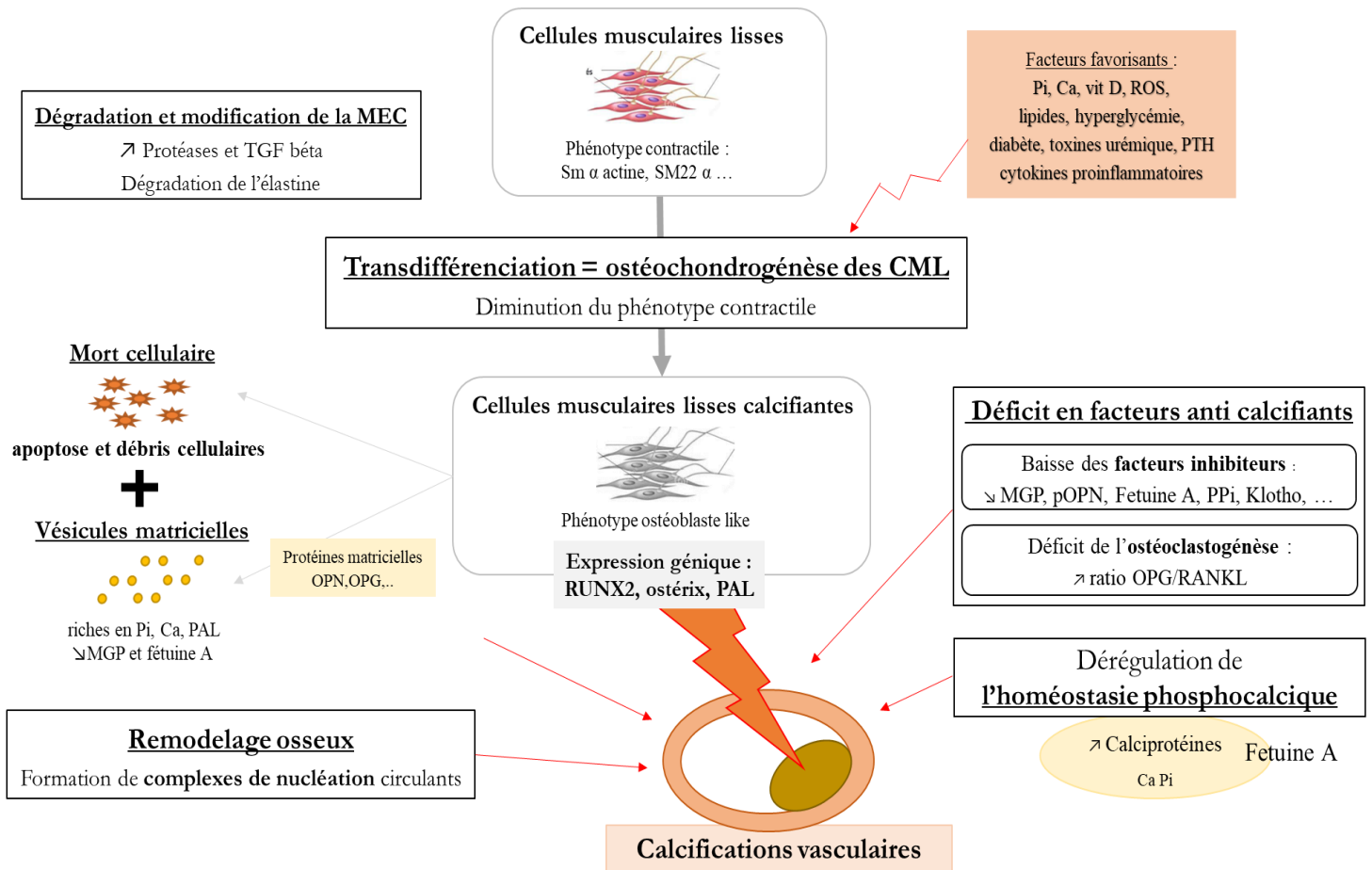


Figure 1. Description des mécanismes impliqués dans la calcification artérielle (Adapté de Lee et al., 2020)

Le processus de calcification pathologique est induit par un défaut de la balance anti calcifiante provenant de la baisse des inhibiteurs de la minéralisation normalement exprimés de manière constitutive. Différents facteurs évoluent en parallèle tels que l'inflammation, l'hypoxie, l'hyperglycémie, la dyslipidémie et aggravent le processus induisant la transdifférenciation ostéogénique des cellules musculaires lisses artérielles (VSMC) (Fadini et al., 2012).

La cellule souche mésenchymateuse est le précurseur commun des VSMC et des ostéoblastes expliquant la facilité de la transdifférenciation rapide de ces cellules en fonction des stimulations extrinsèques. Les VSMC ont pour rôle de réguler le tonus artériel, et de pouvoir se différencier, perdre

leur capacité de contractilité et s'orienter vers un phénotype proche de l'ostéoblaste, du chondrocyte ou de l'adipocyte capables de produire de la matrice extra cellulaire (Lau, 2011).

Les changements phénotypiques des VSMC sont une étape essentielle dans la voie de la calcification pathologique. Ces VSMC diminuent leur production de gènes spécifiques des muscles lisses, tels que l' α -actine et le SM22 α et augmentent leur production de marqueurs d'ostéochondrogenèse comme RUNX2 (=Cbaf1) ; osterix, ostéopontine (OPN), ostéocalcine et les PAL. RUNX2 est un facteur de transcription indispensable impliqué dans la différenciation classique des ostéoblastes, et devient un facteur déterminant de la transdifférenciation des VSMC. L'absence de ce facteur empêche la transdifférenciation des VSMC et l'initiation du processus de minéralisation pathologique (Sun et al., 2012).

Les VSMC sécrètent des protéines matricielles et sont à l'origine de la sécrétion de vésicules matricielles riches en Pi, Ca et PAL issues de leur membrane plasmique pour servir de point de nucléation des cristaux d'hydroxyapatite (Reynolds et al., 2004). Certaines VSMC sont réduites en débris cellulaires ou corps apoptotiques par nécrose ou apoptose stimulée par le receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) (Panizo et al., 2009) qui vont aussi servir de site de nucléation.

L'anomalie des concentrations de Pi, de calcium ou des deux favorisée par un remodelage osseux pathologique sont à l'origine de la formation de cristaux d'hydroxyapatite puis de la formation de complexe de nucléation favorisant la minéralisation ectopique. Parallèlement il existe une augmentation de la production de protéases et métalloprotéinases qui dégradent la matrice protéique extracellulaire enrichie en collagène et en élastine, favorisant la minéralisation de la matrice extra cellulaire et du collagène (Pai and Giachelli, 2010).

Il est suggéré que d'autres cellules sont impliquées dans l'apparition des calcifications ectopiques, notamment les péricytes qui pourraient se différencier en ostéoblastes (Farrington-Rock et al., 2004).

Une fois le processus artériel pro calcifiant enclenché il est entretenu rapidement par la réponse inflammatoire des macrophages et leur apoptose induite par les cristaux d'HA à l'origine de la formation de nouvelles niches pour le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite (Byon et al., 2011).

L'inflammation joue un rôle central dans l'athérogenèse, avec une boucle de régulation où l'inflammation stimule la calcification et la calcification amplifie la réponse inflammatoire avec la production de cytokines induites par les cristaux d'hydroxyapatite (Nadra et al., 2005).

La calcification artérielle contiguë peut être considérée comme un mécanisme de défense de la paroi artérielle pour protéger le corps du vaisseau (Shanahan, 2007). La progression des calcifications peut ensuite prendre des proportions pathologiques selon l'équilibre entre les facteurs pro et anticalcifians.

4. Acteurs de la calcification

La calcification est un processus actif, finement régulé et complexe témoignant du déséquilibre entre les facteurs pro et anticalcifians.

En physiologie, les vésicules matricielles formées ne minéralisent pas car elles comportent des facteurs inhibiteurs de la calcification comme la matrix Gla protein (MGP) ou la fétuine A (Reynolds et al., 2005). Cependant, l'exposition à de fortes concentrations en calcium ou la baisse des facteurs anti calcifians peut être à l'origine de l'apparition de vésicule contenant de l'hydroxyapatite (Reynolds et al., 2004).

Les cristaux d'hydroxyapatite augmentent de volume grâce à la disparition d'un agent anticalcifiant, le pyrophosphate inorganique hydrolysé par les PAL à l'intérieur des VM.

Nous ne précisons pas l'ensemble des facteurs impliqués mais seulement les principaux de manière non exhaustive.

a) Agents pro-calcifians

(1) *Le phosphate inorganique (Pi)*

Le Pi se répartit majoritairement dans l'os (90% sous forme de cristaux d'HA), puis dans le milieu intracellulaire (9%) et le milieu extracellulaire (1%). L'homéostasie du phosphate inorganique dépend de l'absorption digestive (parallèle aux apports protidiques), de l'élimination rénale sous l'action de la PTH, du fibroblast growth factor 23 (FGF23) et d'autres phosphatonines ainsi que du turnover osseux. La concentration de Pi augmente suite à un défaut de son élimination rénale dans la maladie rénale chronique

(MRC) (Hou et al., 2018). Le Pi est un déterminant principal de la calcification. De plus, la phosphatémie dans sa fourchette de normalité est positivement corrélée à la mortalité globale et cardiovasculaire dans la population générale (Bai et al., 2016). Les calcifications coronaires chez les patients en hémodialyse sont associées aux taux circulants de Pi et au risque d'infarctus du myocarde et à la mortalité (Kestenbaum et al., 2005; Utsunomiya, 1996).

Le Pi induit la calcification aussi bien *in vivo* que *in vitro*. *In vitro* l'augmentation de la concentration de Pi sur des VSMC en culture dans des milieux procalcifiants favorise l'expression de protéines ostéochondrogéniques (Bone morphogenetic protein 2 (BMP2), RUNX2, PAL et OPN) et diminue l'expression des marqueurs du phénotype contractile et la production d'inhibiteur de la calcification (Blaser and Aikawa, 2018; Roy and Nishimoto, 2002; Scatena et al., 2007). En effet, on observe des dépôts de phosphate de calcium proportionnels à la concentration de Pi dans le milieu de culture des VSMC (Jono, *circ res*, 2000). Il existe une corrélation positive entre la quantité de Pi, les marqueurs de formation osseuse et les phénomènes de transdifférenciation ostéochondrogénique (Giachelli, 2009; Shobeiri et al., 2014).

(2) *Le calcium (Ca)*

Le calcium (Ca^{2+}) est essentiellement présent sous forme de cristaux d'hydroxyapatite dans l'os (99,9%), puis dans le milieu extracellulaire (0,01%) sous forme ionisée et active (45%), ou inactive liée aux protéines (45%) et aux petits anions (10%). La régulation du métabolisme calcique dépend des concentrations en vitamine D, calcitriol, calcitonine et PTH.

Le calcium est capable d'initier le processus de nucléation en provoquant l'apoptose des VSMC à l'origine de débris formant les sites de la calcification. De plus le calcium diminue les quantités de la matrix Gla protein (MGP), protéine anti-calcifiante, et de métalloprotéinases (en particulier MMP2) dans les vésicules matricielles compétentes et favorise la minéralisation (Kapustin et al., 2011). Cependant le calcium seul n'intervient pas dans la transdifférenciation ostéochondrogénique des VSMC contrairement au Pi.

(3) *Le produit phosphocalcique*

L'augmentation du produit phosphocalcique favorise la calcification. Chacun de ses composants, soit le calcium et le P_i , sont des agents procalcifiants dont la liaison favorise la formation de complexes minéraux insolubles à l'origine de la minéralisation dans les tissus adéquats (os et dent). L'absence de minéralisation dans les autres tissus contenant du calcium ou du P_i témoigne de la fine régulation de ce processus (Pasch et al., 2012)..

(4) *La parathormone (PTH)*

La PTH est une hormone constituée de 84 acides aminés est synthétisée par les glandes parathyroïdiennes sous forme de préprohormone puis après clivage sous forme de prohormone avant la forme active. La production de PTH dépend directement des concentrations en calcium extracellulaire détectées par le Calcium Sensing receptor (CaSR). La baisse de la calcémie stimule le CaSR. La PTH est une hormone hypercalcémiante et hypophosphatémiante. Dans l'anse de Henle, la réabsorption du calcium dépend du gradient électrique trans-épithélial secondaire à l'activité du cotransporteur Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ (NKCC2). Le transport net d'un ion sodium et de deux ions chlorures vers le cytoplasme génère une électropositivité du côté luminal (le potassium étant recyclé) ce qui permet le transfert paracellulaire de calcium. La PTH stimule l'activité de NKCC2 via l'AMPc intracellulaire et ainsi la réabsorption de calcium tandis que la fixation du calcium à son récepteur membranaire basolatéral (CaSR) inhibe le cotransporteur NKCC2, et diminue la réabsorption de calcium. En aval, le couplage entre le canal calcique (TRPV5) luminal et l'échangeur Na/Ca basolatéral favorise la réabsorption de calcium sous l'effet de la PTH, le calcium étant transporté d'un pôle à l'autre de la cellule par fixation à la calmoduline cytoplasmique.

La PTH diminue le nombre de transporteur Na/P_i inhibant ainsi la réabsorption rénale de P_i (Forster et al., 2006). La PTH stimule aussi la production de 1-alpha hydroxylase dans le tube proximal rénal à l'origine d'une augmentation de 1,25-dihydro-calciférol, ce qui favorise l'absorption intestinale de calcium (figure 4). Elle possède aussi une action sur l'os via son récepteur exprimé sur les ostéoblastes et les monocytes précurseurs des ostéoclastes et participe à la régulation du remodelage osseux. Elle stimule l'ostéolyse et donc la résorption osseuse et la libération de calcium et de P_i plasmatique. Au total, l'ensemble de ces mécanismes indique que le maintien d'une calcémie ionisée constante dépend à la fois de

la mobilisation du calcium osseux et de l'élimination urinaire du calcium. Une baisse de la calcémie augmente le relargage osseux de calcium et diminue son élimination rénale, tandis qu'une élévation de la calcémie produit l'effet inverse.

(5) *Le Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23)*

Le Fibroblast Growth Factor 23 ou FGF23, est une hormone peptidique sécrétée par les ostéocytes et par les ostéoblastes (Lieben and Carmeliet, 2013). Le FGF23 agit par liaison à son récepteur en présence de la protéine Klotho et il est inactivé par clivage. Seule la forme intacte est active. Le FGF23 contribue à l'homéostasie phosphocalcique en stimulant l'élimination rénale de P_i , en inhibant la 1 alpha hydroxylase rénale et en stimulant sa dégradation et en freinant la production de PTH (figure 4) (Nakatani et al., 2009). La concentration sanguine de FGF23 est positivement corrélée à la morbi-mortalité cardiovasculaire dans la population générale (Parker et al., 2010) et chez les personnes atteintes de MRC (Seiler et al., 2010).

b) **Agents anti-calcifiants**

La régulation de la calcification est aussi sous la dépendance des inhibiteurs de la calcification avec des facteurs circulants et locaux. Parmi eux, le pyrophosphate inorganique (PPi), (chapitre détaillé plus loin dans le manuscrit), la Fétuine A, la matrix Gla protéine (MGP).

(1) *Le fétuine A*

La fétuine A (ou alpha2-HS-glycoprotéine) est une glycoprotéine circulante synthétisée par le foie. Elle est capable de se lier aux complexes Ca- P_i limitant la croissance des cristaux d'hydroxyapatite (Cai et al., 2015). Elle inhibe aussi l'apoptose des VSMC (Herrmann et al., 2012).

Une faible concentration en fétuine est associée à une augmentation de la calcification et de la mortalité cardio artérielle (Matsui et al., 2009). Un déficit en fétuine a par ailleurs été décrit au cours de la MRC et chez les patients à risque d'évènement cardiovasculaires, associant une corrélation négative entre les concentrations de Fétuine A et les calcifications valvulaires cardiaques et abdominales (Bostom et al., 2018; Carracedo and Bäck, 2018; Ketteler et al., 2003). Les souris dont le gène codant pour la fétuineA a

été invalidé développent une calcification sévère dans divers organes quand elles sont nourries avec un régime riche en calcium, phosphate et vitamine D (Schafer et al., 2003).

(2) *La Matrix GLA protein (MGP)*

La MGP est une protéine exprimée dans de nombreux types cellulaires dont les VSMC et les chondrocytes où elle a une fonction locale anti-calcifiante (Nigwekar et al., 2017). Ses effets sur la calcification dépendent de la carboxylation de ses résidus d'acide glutamique par des gamma carboxylase vitamine K dépendantes. La MGP une fois carboxylée se lie aux cristaux d'HA pour prévenir leur croissance (Roy and Nishimoto, 2002), et pourrait se lier à BMP-2 et bloquer les effets ostéoinducteurs des VSMC (Zebboudj et al., 2002, 2003).

Une mutation inactivatrice de la MGP est responsable chez l'homme du syndrome de KEUTEL, maladie génétique rare, autosomique récessive, dont les conséquences sont majeures dont une calcification diffuse des cartilages (Cancela et al., 2021) (voir plus loin). Les souris déficientes pour le gène de la MGP développent des calcifications artérielles de l'aorte et des calcifications cartilagineuses, notamment du cartilage de croissance, conduisant à une petite taille, une fragilité osseuse et des fractures (Leroux-Berger et al., 2011). Ces souris meurent rapidement de ruptures artérielles favorisées par les calcifications (Luo et al., 1997).

B. Calcifications artérielles

Les calcifications pathologiques sont localisées dans les tissus normalement non calcifiés (Johnson et al., 2006). En ce qui concerne les artères, elles sont localisées dans l'intima, dans la média, ou les deux. Les calcifications pathologiques concernent aussi les valves cardiaques. Le principal facteur de risque de développer des calcifications vasculaires dans la population générale est l'âge. Elles peuvent être le fruit d'une maladie génétique avec calcifications ectopiques mais elles sont le plus souvent favorisées par des situations pathologiques acquises comme la MRC, le diabète, l'ostéoporose ou l'athérosclérose et vont aggraver le pronostic cardiovasculaire (Rennenberg et al., 2009).

1. Types de calcifications artérielles

a) Calcification de l'intima = calcification athérosclérotique

Les calcifications de l'intima sont les calcifications artérielles qui se développent sur les plaques d'athérome. L'athérome résulte de l'accumulation de lipides, avec un infiltrat inflammatoire sous endothélial, et l'invasion de macrophage favorisant la migration et la prolifération de CMVL de la média vers l'intima. Le tout est associé à un dysfonctionnement des protéines de la matrice extra cellulaire en lien avec l'inflammation locale (Doherty et al., 2003). Ces calcifications touchent principalement les artères de moyen et gros calibre. Elles résultent de la transformation ostéogénique de CMLV par des facteurs proinflammatoires (cytokines, LDL oxydés, inflammation de bas grade de l'obésité ou du diabète) liés à la dyslipidémie elle-même et dont intensité détermine la propagation des calcifications (Pohle et al., 2001). La plaque d'athérosclérose favorise la nécrose et l'inflammation locale responsable d'une lésion de l'intima (Doherty et al., 2003).

b) Calcification de la média = médiacalcosé

Les calcifications artérielles de la média sont préférentiellement situées le long de la lame élastique et se développent à partir de la production de vésicule matricielle par les VSMC, comme dans la minéralisation osseuse (Schurgers et al., 2018). La média est majoritairement composée de VSMC et d'élastine, et lors de la calcification il existe une transdifférenciation des VSMC du fait de la présence de BMP2, MSX2 et de PAL (Iyemere et al., 2006). Les calcifications artérielles de la média sont à l'origine d'une perte d'élasticité des vaisseaux due à l'augmentation de la dégradation de l'élastine et d'une rigidité artérielle. La rigidité artérielle se traduit par une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls (VOP) et a pour conséquence fonctionnelle une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS) responsable d'une hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) (Dao et al., 2005).

c) Calcifications valvulaires cardiaques

Il semblerait que les calcifications valvulaires soient aussi liées à un processus actif de différenciation des CVML responsable de la sécrétion de protéines impliquées dans la minéralisation osseuse. Les processus impliqués ne sont pas clairement définis (Ketteler et al., 2003; Luo et al., 1997; Vattikuti and Towler, 2004). Les facteurs favorisant la calcification valvulaire dépendent des contraintes locales, inflammatoires, métaboliques et d'une prédisposition génétique (LaHaye et al., 2014; O'Brien, 2006), bien que le principal facteur de risque soit la dégénérescence liée à l'âge (Ren et al., 2019). Les calcifications valvulaires sont associées à un plus haut risque de mortalité chez les patients âgés atteints d'insuffisance cardiaque congestive et/ou chez les patients atteints de MRC (O'Brien, 2006).

d) Calciphylaxie = artériolopathie urémique calcifiante

La calciphylaxie ou artériolopathie urémique calcifiante concerne la peau et aboutit à l'hypoperfusion locale puis à la nécrose (Essary and Wick, 2000; McMullen et al., 2019). Les mécanismes de développement sont mal connus ; les facteurs associés sont l'insuffisance rénale, le diabète, le sexe féminin, l'obésité ou le traitement par la Warfarine (anti vitamine K). (Hafner et al., 1995; Nigwekar et al., 2018).

2. Mesure des calcifications artérielles

Les calcifications artérielles sont un reflet du risque cardiovasculaire indépendant des facteurs de risques cardiovasculaires (FRCV) de Framingham. Il est donc important de pouvoir mesurer le score calcique. Les calcifications artérielles peuvent se traduire fonctionnellement par une augmentation de la rigidité artérielle responsable d'une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls, d'une augmentation de la pression pulsée et d'une l'hypertrophie du ventricule gauche (Boutouyrie and Laurent, 2004).

La mesure est possible avec une radiographie standard permettant de déterminer le score de Kauppila ou une tomodynamométrie selon la méthode d'Agastson.

a) Radiographie standard lombaire

La radiographie, d'utilisation universelle, permet de localiser les calcifications le long de l'arbre artériel, sans pour autant préciser le type. Certains auteurs proposent que la médiocalcose soit plutôt observée sous forme de lésions continues, alors que la calcification de l'intima donnerait plutôt des lésions en petites plaques.

Le score de Kauppila se caractérise à partir de cliché radiographique avec une acquisition lombaire latérale de l'aorte abdominale (Kauppila et al., 1997). Le score de Kauppila est une méthode de mesure semi quantitative établie en 1997 par suite de la comparaison avec d'autres scores et l'analyse de la localisation de la sévérité et de la progression des calcifications aortiques lombaires radios opaques sur une population de patients participant à l'étude cardiaque de Framingham. La sévérité des calcifications de l'aorte antérieure et postérieure à la radiographie a été gradée sur une échelle de 0 à 3 pour chaque segment lombaire ((0 : absent ; 1 : petit ; 2 : modéré ; 3 : grand), et selon des scores composites : (1) score des segments affectés (plage de 0 à 4) ; (2) score des segments affectés antérieurs et postérieurs (plage de 0 à 8) ; et (3) score de gravité antéro-postérieur (plage de 0 à 24).(Wilson et al., 2001).

La radiographie abdominale latérale est utile non seulement pour semi-quantifier un score de risque aortique tel que celui de Kauppila mais aussi pour détecter des fractures vertébrales passées inaperçues, pouvant influencer la prise en charge thérapeutique en cas d'ostéoporose associée à la MRC.

Dans la cadre des études dépendant de la cohorte Framingham Heart il a été démontré une association forte et indépendante entre les calcifications coronaires et aortiques détectées par radiographie lombaire latérale et la mortalité cardiovasculaire plus particulièrement chez les patients atteints de coronaropathie(Levitzky et al., 2008; Wilson et al., 2001).

GRADING



- 0: no calcific deposits in front of the vertebra
- 1: small scattered calcific deposits filling less than 1/3 of the longitudinal wall of the aorta
- 2: 1/3 – 2/3 of the wall calcified
- 3: 2/3 or more of the wall calcified

Level	Affected segment	Scores for individual segments		Composite score (AAC)
		Posterior Wall Range 0-3	Anterior Wall Range 0-3	Anterior-Posterior severity Range 0-6
L1	1	1	0	1
L2	1	2	1	3
L3	1	3	2	5
L4	1	3	3	6
Total	4	9	6	15
Maximum	4	12	12	24

GRADING



- 0: no calcific deposits in front of the vertebra
- 1: small scattered calcific deposits filling less than 1/3 of the longitudinal wall of the aorta
- 2: 1/3 – 2/3 of the wall calcified
- 3: 2/3 or more of the wall calcified

Level	Affected segment	Scores for individual segments		Composite score (AAC)
		Posterior Wall Range 0-3	Anterior Wall Range 0-3	Anterior-Posterior severity Range 0-6
L1	1	1	0	1
L2	1	2	1	3
L3	1	3	2	5
L4	1	3	3	6
Total	4	9	6	15
Maximum	4	12	12	24

Figure 3. Description du score de Kauppila à partir de radiographie lombaire latérale.

b) Tomodensitométrie

Une autre méthode de mesure dépend de l'utilisation de la tomodensitométrie pour l'analyse des calcifications artérielles coronaires (coroscaner) ou aortiques. C'est la méthode de référence pour la mesure des calcifications artérielles et de leur progression. Cependant la tomodensitométrie ne permet pas de différencier les calcifications de l'intima ou de la média. L'utilisation d'un logiciel (par exemple 4DM de General Electric) permet d'identifier 3 pixels contigus sur des coupes de 3 mm d'épaisseur pour définir un point dont la densité en Unité Hounsfield (UH) est quantifiée et gradée selon une échelle de 1 à 4. Le 1 correspond à une densité Hounsfield allant de 130 à 199, le 2 correspond va de 200 à 299, le 3 va de 300 à

399 et le 4 est supérieur ou égal à 400. Les points qui correspondent aux trajets artériels sont ensuite sélectionnés manuellement. Le logiciel indique alors le produit du nombre de points par le chiffre de 1 à 4 et c'est la somme de ces produits qui constitue le score calcique pour chaque artère. Le score calcique coronaire est le plus étudié (Shaw et al., 2003) et il est couramment utilisé pour l'évaluation du risque de cardiopathie ischémique (Greenland et al., 2010) ou du risque de mortalité toutes causes confondues (Matsushita et al., 2015; Shaw et al., 2003). La progression du score calcique coronaire dépend de sa valeur, des facteurs de risque cardiovasculaire associés et notamment de l'équilibre glycémique chez les patients diabétiques de type 2 (Anand et al., 2007).

Les calcifications de l'aorte se mesurent aussi selon Agatston en tenant compte de la taille des individus ou de la longueur de l'aorte (Wilson et al., 2001). Les données disponibles sont peu nombreuses. D'après une méta-analyse l'augmentation du risque d'évènement coronarien et cérébroartériel ainsi que les décès de cause cardiovasculaire augmentent proportionnellement au score de calcification aortique (Bastos Gonçalves et al., 2012). Un autre site de mesure que nous ne développerons pas ici est le score calcique infra poplité ou SCIP, qui exclut la région aorto-iliaque et fémorale et permet de mesurer la calcification des artères jambières. Le SCIP est fortement associé à l'importance et au risque de péjoration de la symptomatologie ischémique de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI) et semble mieux prédire le risque d'amputation que les FRCV traditionnels (Guzman et al., 2008).

3. Conséquences des calcifications artérielles

La rigidité artérielle accélère l'onde de pouls et a des conséquences cardiaques défavorables. La rigidité de l'aorte évaluée par la VOP est un marqueur de mortalité totale et cardiovasculaire et il permet de préciser le risque de survenue d'accidents artériels (Vlachopoulos et al., 2010). En 2010, l'étude réalisée par l'équipe de Temmar sur des modèles murins, a mis en évidence une altération précoce de la rigidité aortique au cours de la MRC, par mesure de l'onde de pouls et évaluation du score calcique, sans modifications des parois aortiques ou apparition de calcifications valvulaires (Temmar et al., 2010)

a) Aspects fonctionnels

L'onde de pouls provient de l'impact du sang sur la paroi de la crosse aortique au début de la systole. Elle chemine dans la paroi artérielle d'autant plus vite que celle-ci est rigide (O'Rourke et al., 2004). Elle se mesure avec un capteur à pince placé sur un doigt et un orteil en position couchée et au repos (popmètre), ou avec une sonde doppler placée au niveau du cou, en synchronisant avec la réalisation concomitante de l'ECG (Sphygmocor). La mesure prend quelques minutes et les résultats s'expriment en mètre/seconde.

L'augmentation de la VOP est linéaire avec l'âge, elle peut être mesurée sur différents segments artériels (artère brachiale, artère fémorale, aorte thoraco-abdominale). Chez les patients atteints de calcifications artérielles en hémodialyse chronique, l'accélération de l'onde de pouls de l'aorte est associée à une surmortalité cardiovasculaire, et chez les patients hypertendus la VOP carotido-fémorale est associée à la mortalité par accidents vasculaires cérébraux ((Laurent et al., 2003). En revanche, l'accélération de l'onde de pouls sur les artères brachiales ou fémorales n'est pas associée à une surmortalité (London et al., 2001). La VOP est positivement associée à l'étendue des calcifications artérielles coronaires, aortiques et valvulaires (Haydar et al., 2004; Raggi et al., 2007). La VOP est corrélée positivement à l'âge, à la pression artérielle systolique, la pression pulsée, l'HVG, et aux maladies coronaires (Lim et al., 2004).

La pression pulsée est la différence entre la pression systolique et la pression diastolique. Elle correspond à une perte de compliance artérielle dont la conséquence est une augmentation du travail cardiaque. L'hypertrophie des cardiomyocytes compense la perte de compliance artérielle, puis l'inadéquation entre les besoins en oxygène du myocarde et la perfusion coronaire aboutit à la fibrose myocardique et à l'insuffisance cardiaque (Blacher et al., 1999; London et al., 2003).

L'augmentation de la pression pulsée est corrélée à la mortalité globale et à la mortalité cardiovasculaire en cas d'HTA essentielle (Benetos et al., 1998). Les calcifications de la valve aortique sont associées à un rétrécissement valvulaire pouvant être à l'origine d'un remodelage du ventricule gauche, et celles de la valve mitrale pourraient participer à la sténose et/ou l'insuffisance mitrale pourvoyeuses d'arythmie cardiaque et d'évènements thromboemboliques. Les calcifications coronaires participeraient à l'instabilité des plaques d'athérome, ce qui expliquerait leur corrélation à la mortalité cardiovasculaire après ajustement

au FR standards avec un risque relatif de 12,5 si le score calcique coronaire selon Agatston est supérieur à 1000 (Budoff et al., 2007).

b) Aspect épidémiologique

Quel que soit le type de calcification, les études ont mis en évidence que la présence de calcifications et leur sévérité étaient un marqueur de maladie cardiovasculaire avec des conséquences défavorables (Bellasi and Raggi, 2012; Goodman et al., 2000; Vliegenthart et al., 2005). Le score calcique coronaire est un outil prédictif bien reconnu permettant l'évaluation du risque cardiovasculaire dans les populations à risque comme chez les individus atteints de maladie rénale ou de diabète (Greenland et al., 2010). Si le lien entre calcification artérielle et mortalité est établi, il n'est pas démontré que la diminution des calcifications artérielles diminue la morbimortalité cardiovasculaire.

Plusieurs études réalisées chez des patients atteints de maladie rénale ont pour objectif de déterminer l'influence du contrôle de la phosphatémie sur le risque cardiovasculaire et les conséquences sur la calcification. Le Pi est un important régulateur et inducteur de la calcification et est un facteur de risque indépendant de mortalité cardiovasculaire (Kestenbaum et al., 2005). L'étude ADVANCE a étudié la progression des calcifications artérielles et l'effet du Cinacalcet (antagoniste du CaSR protecteur des calcifications) introduit lors d'une hyperparathyroïdie secondaire chez des patients hémodialysés. Les résultats confirment l'atténuation de la progression des calcifications coronaires et artériels après contrôle du Pi et de la PTH, cependant sans bénéfice sur la morbimortalité cardiovasculaire (Raggi et al., 2011). Les chélateurs calciques du Pi ont longtemps été considérés comme des facteurs aggravant les calcifications artérielles et la morbimortalité dans le MRC (Tonelli et al., 2010). Les dernière métaanalyses sont en faveur d'un bénéfice des chélateurs non calcique avec une baisse significative du risque de mortalité toute cause confondue (Jamal et al., 2013).

C. Maladies calcifiantes

Des maladies génétiques rares et acquises se caractérisent par l'apparition de calcification du tissu conjonctif avec des phénotypes variables en fonction de la mutation concernée (Zhu et al., 2012).

1. Maladies monogéniques

a) Le Pseudoxanthome élastique

Le pseudoxanthome élastique (PXE, OMIM 264800) est une maladie rare caractérisée par des calcifications ectopiques des tissus conjonctifs affectant principalement les yeux, la peau, les reins et le système artériel (Le Saux et al., 2000a; Letavernier et al., 2018a). Les atteintes organiques sont multiples et de sévérité variable avec des lésions cutanées, une rétinopathie pouvant conduire à une cécité bilatérale. L'apparition des calcifications artérielles est à l'origine d'une artériopathie périphérique le plus souvent (claudication intermittente des membres inférieurs), et s'associe à une rigidité artérielle et une hypertension artérielle (Borst et al., 2019). Plus rarement le phénotype se caractérise par des infarctus du myocarde et des accidents artériels cérébraux.

Le PXE est une maladie héréditaire dont la fréquence est de 1 :50 000, autosomique récessive, due à une mutation du gène codant pour la protéine ABCC6. Il existe actuellement plus de 200 mutations identifiées d'ABCC6 responsables de la maladie.

ABCC6 est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des ABC transporteur (ATP Binding Cassette) exprimée sur le côté basolatéral des hépatocytes et des cellules rénales tubulaires proximales. Par conséquent, la maladie PXE est considérée comme un trouble métabolique, résultant d'un déficit en facteur anti-calcifiant circulant, libéré par les hépatocytes. En 2014, il a été rapporté que la concentration plasmatique de PPi est réduite dans le PXE pouvant expliquer la propension des tissus artériels à se calcifier (Jansen et al., 2014).

b) Calcifications artérielles généralisées infantiles (CAGI)

Les CAGI ou GACI (OMIM 208000) se caractérise par un tableau précoce in utero et post natal de calcification médiale diffuse. Les calcifications concernent principalement la média et les artères de moyen calibre, associées avec une prolifération intimale responsable à plus long terme de l'apparition d'une sténose artérielle et d'un dysfonctionnement hémodynamique (Rutsch et al., 2003).

La maladie est due à la mutation du gène codant pour l'ectonucléotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 (ENPP1) sur un mode de transmission autosomique récessif (Nitschke et al., 2012). Il existe plus de 40 mutations identifiées, et selon la variabilité et la sévérité de l'atteinte il peut exister une mortalité précoce dans les 6 mois de vie, même lorsque le génotype semble similaire au stade initial (Rutsch et al., 2008).

c) Syndrome héréditaire de calcification artérielle et articulaire

La maladie de la calcification artérielle et tendineuse de l'adulte (CALJA, OMIM 211800) se caractérise par l'apparition de calcifications artérielles massives principalement au niveau des artères des membres inférieurs et au niveau périarticulaire des extrémités : pieds et mains, à l'origine d'une ischémie et d'une artérite distale.

Cette maladie aussi nommée ACDC (calcification due to deficiency of CD73) est due à une mutation du gène codant pour la protéine NT5E (5'ectonucléotidase) ou CD73 normalement responsable de l'hydrolyse de l'adénosine monophosphate en adénosine et Pi (St Hilaire et al., 2011). La perte d'activité de NT5E est à l'origine d'une augmentation de l'activité des TNAP et donc de la dégradation du PPi et de l'augmentation locale des concentrations en Pi favorisant le phénotype procalcifiant.

Le phénotype de ces 3 maladies résulte de différentes mutations dont la résultante est une baisse de PPi circulant à l'origine de l'apparition de calcification ectopique qui seront détaillés plus loin dans le chapitre.

d) Le syndrome de Keutel

Le syndrome de Keutel est une maladie particulièrement rare, autosomique récessive, avec une mutation inactivatrice du gène codant pour la MGP, dont l'expression phénotypique a lieu dès l'enfance. Ces patients présentent des calcifications laryngées, trachéobronchiales, auriculaires, nasales et du cartilage interosseux, avec une hypoplasie faciale ainsi que des calcifications pulmonaires, coronaires, hépatiques, rénales, méningées ou cérébrales dont les conséquences sont variables (Cancela et al., 2021).

Le rôle principal décrit de la MGP est d'inhiber la minéralisation avec une expression prédominante dans les VSMC et les chondrocytes (Luo et al., 1997). Le phénotype est semblable pour les souris MGP $-/-$ qui présente des calcifications multiples des cartilages, extensives, jusqu'à la dissection aortique pour des calcifications artérielles expansives (Luo et al., 1997).

2. Maladie rénale chronique

a) Définition de la maladie rénale chronique

La maladie rénale chronique (MRC) se définit par des signes de souffrance rénale et/ou une diminution du débit de filtration glomérulaire en-dessous de 60 ml/min/1,73 m² (tableau).

Stade	Débit de filtration glomérulaire (mL/mn/1,73m ²)	Définitions
1	≥ 90	Maladie rénale chronique* avec DFG normal ou augmenté
2	Entre 60 et 89	MRC* avec DFG légèrement diminué
3A	Entre 45 et 59	Insuffisance rénale chronique modérée
3B	Entre 30 et 44	
4	Entre 15 et 29	Insuffisance rénale chronique sévère
5	Inférieur à 15	Insuffisance rénale chronique terminale

**Avec marqueurs d'atteinte rénale : albuminurie, hématurie, leucocyturie, ou anomalies morphologiques ou histologiques, ou marqueurs de dysfonction tubulaire, persistant plus de 3 mois et à 2 ou 3 examens consécutifs.*

Tableau 1. Définitions des stades de maladie rénale chronique en fonction de l'altération du débit de filtration glomérulaire

Ce concept a été proposé car les complications dépendent plus du stade de la MRC que de la cause de la néphropathie. Les complications de la MRC sont la perturbation du métabolisme phosphocalcique, la dérégulation de l'équilibre acido-basique avec apparition d'une acidose métabolique et une hypertension artérielle. L'accumulation de toxines urémiques et la dysfonction endothéliale (London et al., 2001) en sont à l'origine.

La MRC est associée à une augmentation du risque de morbi-mortalité cardiovasculaire (Carney, 2020). La Société européenne de cardiologie et la Société européenne d'athérosclérose (ESC/EAS) ont récemment considéré la MRC modérée et sévère dans la catégorie des facteurs de risque cardiovasculaire à haut et très haut risque (Mach et al., 2020). Dans le monde 500 millions de personnes seraient atteintes de MRC (Mills et al., 2015), avec des proportions qui varient en fonction des pays (Brück et al., 2016) et une incertitude liée au caractère asymptomatique de la maladie.

b) Ostéodystrophie rénale

L'ostéodystrophie rénale est une constellation d'anomalies du squelette, d'anomalies biologiques et de calcifications artérielles qui surviennent simultanément mais dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas clairement établis (Moe et al., 2006). Les premières ne feront pas l'objet de développement ici.

(1) Anomalies biologiques

La réduction néphronique de la MRC aboutit à l'hyperphosphatémie par incapacité rénale à éliminer les phosphates inorganiques et à l'hypocalcémie par défaut de production rénale de vitamine D active. Chacune de ces anomalies stimule la production de PTH et favorise l'hyperparathyroïdie. Le FGF23 augmente avec les stades de la MRC et de manière exponentielle aux stades les plus évolués de la MRC mais ne suffit pas à contrôler l'hyperparathyroïdie car les glandes parathyroïdes résistent à son action freinatrice (Lanske and Razzaque, 2014). La stimulation durable des glandes parathyroïdes aboutit à leur hyperplasie et à l'autonomisation de la sécrétion de PTH (Brown et al., 1989). Les phosphatases alcalines non tissu-spécifique augmentent chez les patients dialysés, en particulier l'isoforme osseuse (ostase). L'augmentation des ostases est stimulée en présence d'une inflammation fréquemment retrouvée lors de la MRC (Damera et al., 2011).

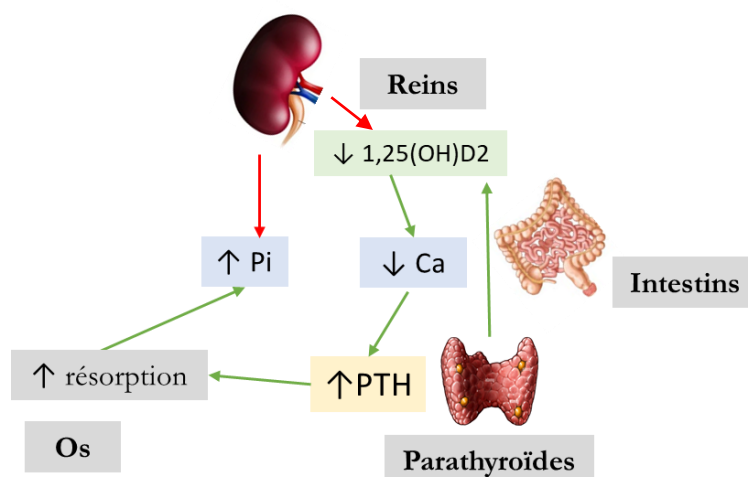


Figure 4. Résumé de l'homéostasie phosphocalcique sous la dépendance de l'os, des reins et de l'intestin en physiologie et au cours de la maladie rénale.

(2) Calcifications artérielles de la maladie rénale

Les calcifications artérielles se développent de manière asymptomatique, surviennent à tous les stades de la MRC et sont plus abondantes aux stades avancés de la MRC et chez les personnes en dialyse chronique (Budoff et al., 2011; Górriz et al., 2015; Kestenbaum et al., 2009; Román-García et al., 2011). La prévalence des calcifications coronaires va de 28 à 93% chez les patients au stade de pré-dialyse (Wang et al., 2019). Le score d'Agatston coronaire est supérieur à 400 chez 25% des patients au stade 2 de la MRC, chez 40% des patients au stade 3-4 et chez 66% des patients en hémodialyse chronique (Chiu et al., 2010; Russo et al., 2007) alors qu'elles ne concernent que 13% des personnes sans MRC, critères démographiques égaux par ailleurs (Braun et al., 1996; Goodman et al., 2000; Honkanen et al., 2008; Raggi et al., 2011). De manière générale, les calcifications artérielles de la MRC sont associées avec une prolifération intimale (Ejerblad et al., 1979) et la transdifférenciation des VSMC favorisée par l'environnement de la MRC. Un niveau inflammatoire de bas grade (Shao et al., 2010) est systématiquement retrouvé lors de la MRC terminale, avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires circulantes telles que le Tumor Necrosis Factor (TNF). De plus, l'élastine est une protéine abondante artérielle notamment au niveau aortique, et sa dégradation est favorisée par les toxines urémiques de la MRC. L'ajout d'alfa élastine *in vitro* augmente la calcification des VSMC dans des milieux riches en Pi (Hosaka et al., 2009), alors que les souris sous régime riche en Pi avec une élastine dégradée induite par la MRC ne développent pas de calcifications de la média (Pai et al., 2011). La dégradation de l'élastine est responsable d'une augmentation de TGF B impliquée dans la différenciation ostéoblastique favorisant les calcifications des VSMC (Pai and Giachelli, 2010) et le déficit en élastine va favoriser la rigidité artérielle accélérée au cours de la MRC induisant la perte de ses propriétés hémodynamiques (Gauthier-Bastien et al., 2014).

Les études chez le transplanté rénal réalisées par Barenbrock et al., mettent en évidence une relation entre l'élévation des concentrations plasmatiques en PTH et la perte de l'élasticité de l'artère carotide commune (Barenbrock et al., 1998). De même qu'il existe une corrélation négative entre le score calcique et les niveaux plasmatiques de PTH. Les calcifications artérielles progressent de 6 à 2% par an

contre 22 à 31% par an chez les personnes transplantées rénales par rapport aux personnes en hémodialyse chronique (Mazzaferro et al., 2009).

3. Fibrose et/ou insuffisance hépatocellulaire

a) Caractérisation de la fibrose hépatique

La fibrose hépatique se caractérise par une accumulation hépatique des principaux composants de la matrice extra cellulaire qui représente en physiologie moins de 3% du poids du foie, secondaire à des agressions multiples et répétées responsables de lésions hépatiques dont les étiologies sont variables. A l'état physiologique, la production (fibrogenèse) et la dégradation (fibrolyse) de la matrice extra cellulaire sont équilibrées. Cependant, lors d'agressions chroniques, la fibrogenèse l'emporte sur la dégradation, aboutissant au développement d'une fibrose extensive. L'évolution de cette fibrose est la progression vers la perte de l'architecture hépatique jusqu'à la perte de la fonction hépatique responsable de l'insuffisance hépatocellulaire (IHC). L'évolution terminale de ces modifications architecturales est la cirrhose. La fibrose est généralement due à des atteintes chroniques mais peut être réversible si la cause de la fibrose est réversible. La fibrose peut évoluer vers la cirrhose hépatique en réponse aux lésions hépatiques répétées et persistantes.

La cirrhose est une cause majeure de morbidité dans le monde. Elle correspond au stade terminal de la fibrose hépatique à l'origine de la décompensation hépatique et de l'insuffisance hépatocellulaire nécessitant une transplantation hépatique. La vitesse de progression de la fibrose vers la cirrhose et l'insuffisance hépatocellulaire est variable selon les individus mais est responsable de nombreuses complications. Au cours de la cirrhose vont apparaître : une hyperplasie hépatocellulaire à l'origine de la formation de nodules de régénération et une angiogenèse artérielle exacerbée entourant le nodule et reliant l'artère hépatique et la veine porte aux veinules sus hépatique restaurant l'hémodynamique. L'hyperplasie va être stimulée par les cytokines et les facteurs de croissance hépatique, comme l'insuline et le glucagon favorisant le développement de ces nodules. Les connexions artérielles ainsi créées fonctionnent à faible et insuffisant débit et vont être à l'origine d'une hyperpression veineuse dans le système porte favorisant l'hypertension portale aggravée par la compression des veinules

hépatiques extrinsèque par les nodules de régénération. La cirrhose peut alors se compliquer d'hypertension portale, d'insuffisance hépatocellulaire, d'ascite, de rupture de varice œsophagienne ou d'encéphalopathie hépatique.

b) Evaluation du degré de fibrose

La fibrose peut indirectement être mesurée à l'aide de marqueurs (Fibrotest, ELF, Fibrometre), et des scores de fibrose pour permettre de distinguer les différents stades (NAFLD Fibrosis Score, BARD, FIB-4). Certains de ces scores sont utilisés comme facteur pronostique de la mortalité globale et cardiovasculaire (Wong et al., 2010).

La biopsie hépatique n'est pas toujours réalisable du fait des risques non négligeables de complication, mais elle reste l'élément de choix et le gold standard pour le diagnostic et la stadification de la fibrose.

Les scores de fibrose le plus souvent utilisés sont : le score APRI, Fib4 et FLI.

(1) Le score APRI

Le score APRI dépend des transaminases ASAT exprimé en nombre de fois la normale divisée par le taux de plaquettes en $10^9/L$. c. Ce score doit être utilisé en condition pathologique précise, principalement chez les patients atteints d'hépatite C pour ne pas manquer de sensibilité du fait des variations visibles dans de nombreuses pathologies chroniques du foie.

(2) Le score Fib 4

Le score Fib 4 est un biomarqueur du risque de fibrose sévère (F3 ou F4) basé sur un algorithme qui se calcule de la manière suivante : $(Age \times ASAT) / (Plaquette \times \sqrt{ALAT})$ (Sterling et al., 2006). Le score Fib4 permet un dépistage de la fibrose en l'absence de cause connue de cytolyse ou de thrombopénie. Si le patient est âgé de plus de 70ans ce score ne peut être utilisé et il est considéré pathologique en cas de $Fib4 > 2,67$.

c) Insuffisance hépatique

La gravité de l'insuffisance hépatique s'apprécie selon différents scores pouvant dépendre de l'étiologie de l'atteinte hépatique initiale.

Les principaux scores utilisés sont : la classification de Child-Turcotte-Pugh ou le score de Meld.

(1) Le score de CHILD-PUGH

Le score de CHILD-Pugh se caractérise à partir de données cliniques ET biologiques pour classer la gravité de l'insuffisance hépatique et le pronostic global. Il va de 5 à 15 le stade le plus sévère.

Cependant la subjectivité des données cliniques interfère avec l'interprétation du Child comme l'encéphalopathie ou l'ascite (cf tableau).

	1 point	2 points	3 points
Encéphalopathie	Absente	Confusion	Coma
Ascite	Absente	Minime	Importante
Bilirubine totale (µmol/l)	< 35	35 à 50	> 50
Albumine (g/l)	> 35	28 à 35	< 28
Taux de prothrombine (%)	> 50	40 à 50	< 40

La gravité est croissante avec la valeur du score : entre 5 et 6 points (classe A) ; entre 7 et 9 points (classe B) ; entre 10 et 15 points (classe C).
En cas de cirrhose compensée, la plupart des malades sont en classe A. La cirrhose décompensée correspond à une classe B ou C. Ce score ne prend pas en compte certaines complications de la cirrhose telles l'hémorragie digestive ou le carcinome hépatocellulaire.

Tableau 2. Définition et calcul du score de CHILD-PLUGH

(2) Le score de MELD

Le score de MELD est le plus souvent utilisé pour catégoriser la gravité de l'insuffisance hépatique au stade terminal quelle que soit la cause afin de classer les candidats selon leur risque de mortalité (Kamath et al., 2007). Plusieurs variantes du score de MELD existent pour définir la mortalité globale ou la possibilité d'intégrer l'imagerie en cas de carcinome hépatocellulaire (CHC). Le score de MELD est défini à partir d'un calcul dépendant d'une transformation logarithmique à partir de 3 valeurs

biologiques : bilirubine totale, créatininémie, INR, selon la formule : $MELD = 3,8 \times \log(\text{bilirubine totale en mg/dl}) + 11,2 \times \log(\text{INR}) + 9,6 \times \log(\text{créatinine en mg/dl}) + 6,4$. A noter qu'il existe une version dédiée pour l'allocation des greffes en transplantation hépatique qui pondère le score en cas de dialyse.

Il est possible d'utiliser des calculateurs en ligne, le résultat est rendu sous forme de valeur continue avec les valeurs les plus hautes associées à une plus grande sévérité de l'insuffisance hépatique.

Le score de MELD a d'abord été dédié aux patients ayant bénéficiés de la pose d'un TIPS afin de prédire la survie, puis il a été validé pour prédire le risque de mortalité à 3 mois des patients atteints d'insuffisance hépatique chronique (Kamath et al., 2001), et il permet maintenant d'identifier les patients pouvant être éligibles à une transplantation hépatique lorsque le score de MELD est supérieur à 15 (Merion et al., 2005). Le score de MELD peut être utilisé pour prédire la mortalité à court et moyen terme (3 à 12 mois) dans de nombreuses situations cliniques quelle que soit l'atteinte hépatique.

La différence entre le score de MELD et le score de CHILD est la prise en compte de la fonction rénale qui est un facteur pronostique prépondérant chez les patients atteints de cirrhose (Cholongitas et al., 2005). De plus, le score de MELD correspond à un score progressif permettant de donner des résultats plus discriminants, cependant à l'inverse du score de CHILD il ne prend pas en compte les complications de la cirrhose hépatique notamment l'hypertension portale qui influence le risque de mortalité.

Le score de CHILD-PUGH est actuellement le plus utilisé du fait de sa facilité d'utilisation, il permet l'évaluation du pronostic global et chirurgical en cas d'atteinte hépatique. Cependant il manque de détermination du fait de la subjectivité des signes cliniques rendant l'utilisation du MELD plus fiable notamment dans l'évaluation de la progression de l'insuffisance hépatique et son pronostic à plus long terme.

d) Calcification artérielle et fibrose hépatique

Les calcifications coronaires sont décrites chez les patients atteints de NAFLD (non alcoholic fibrosis liver disease) avec fibrose hépatique et chez les patients transplantés hépatiques.

Les patients présentant une NASH (Non Alcoholic SteatoHepatitis) développent des calcifications coronaires et sont à haut risque cardiovasculaire (Mellinger et al., 2015; Stepanova and Younossi, 2012). La NAFLD est considérée comme un facteur de risque indépendant de maladie coronarienne avec une atteinte athéromateuse plus sévère (Lonardo et al., 2016; Targher et al., 2016). Les maladies cardiovasculaires restent la principale cause de décès des patients atteints de NAFLD avec une fibrose hépatique sévère (Ekstedt et al., 2015; Ong et al., 2008) et le stade de fibrose semble être le principal déterminant de la mortalité cardiovasculaire (Ekstedt et al., 2015; Ong et al., 2008).

Le score calcique est utile pour classer le risque cardiovasculaire et améliore la discrimination et la reclassification des maladies cardiovasculaires (Detrano et al., 2008; Taylor et al., 2005). Les études visant à étudier le lien entre les calcifications artérielles et la stéatose hépatique sont encore peu nombreuses et les résultats variables. En effet, certaines études, notamment sur des populations asiatiques, ont mis en évidence une association entre une stéatose hépatique caractérisée par échographie abdominale et l'apparition de calcifications coronaires (Kim et al., 2012; Sung et al., 2012) alors que cette association n'est pas retrouvée par l'équipe de McKimmie chez les patients atteints de stéatose (McKimmie et al., 2008). Cependant quand l'association existe il semblerait qu'elle soit indépendante des FRCV traditionnels (Chen et al., 2021; Jaruvongvanich et al., 2016).

Des mesures telles que le score calcique coronaire, l'épaisseur intima média, et la VOP carotido fémorale représentent et améliorent la détection de l'athérosclérose et témoignent du risque cardiovasculaire chez les patients atteints de NAFLD. Les marqueurs non invasifs de fibrose, décrits précédemment, sont associés avec les scores calciques coronaires, excepté pour le score APRI et des valeurs de score calcique coronaire [0-100] (Song et al., 2019), concordant avec des méta analyses précédentes présentées en 2015 (You et al., 2015).

Que ce soit dans la maladie rénale ou dans la NAFLD, la calcification artérielle est associée à l'inflammation systémique et la baisse du DFG est un facteur prédictif d'élévation du score coronaire en cas de fibrose hépatique (Byrne and Targher, 2015; Hwang et al., 2016). Peu d'étude ont pour objectif d'évaluer le score calcique au décours de la transplantation hépatique. Cependant la mesure d'un score calcique coronaire en pré transplantation hépatique permettrait d'évaluer les risques d'évènements coronaires dans l'année suivant la transplantation (Zorzi et al., 2021).

II. Pyrophosphate inorganique

A. Généralités

Le Pyrophosphate (PPi) $P_2O_7^{4-}$ est à l'origine issu du réchauffement de Pi (Pyro = Fire du grec), il se caractérise par la liaison de 2 Pi liés par un atome d'oxygène (liaison P-O-P hydrolysable) (Figure 5).



Les biphosphonates (BP) sont des analogues synthétiques du PPi présentant deux groupes Pi liés par un atome de carbone (liaison P-C-P résistante à une hydrolyse).

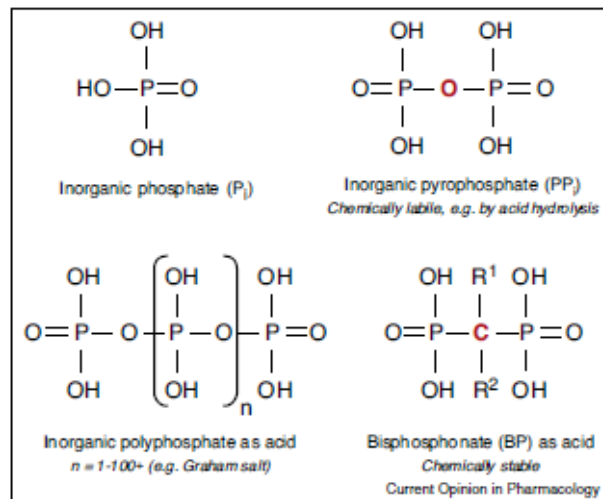


Figure 5. Structure chimique du phosphate, du pyrophosphate et des biphosphonates (Orriss et al., 2016)

De manière plus générale, les polyphosphates et pyrophosphates sont des agents pouvant se lier, aux ions métalliques par exemple, et sont utilisés depuis longtemps pour prévenir la calcification. En effet, le Calgon dans les années 1930 est composé de polyphosphate de sodium et est utilisé comme anti calcaire dans la lessive. Les pyrophosphates et polyphosphates sont aussi utilisés comme additifs dans le dentifrice pour prévenir la formation de tartre dentaire ou comme additif alimentaire en tant que régulateur d'acidité, humectants ou encore stabilisants sous forme E452 dans l'alimentation et E450 pour le PPi plus précisément.

Le PPi peut provenir de plus de 200 réactions enzymatiques et son hydrolyse joue un rôle primordial dans des réactions biochimiques fondamentales. La biologie et la biochimie du PPi dans la nature ont fait l'objet d'un examen approfondi et complet dans une monographie publiée par Heinonen en 2001.

Les concentrations plasmatiques de PPi sont difficiles à quantifier mais de l'ordre du micro molaire soit 1000 fois moins que le Pi. Le PPi est physiologiquement retrouvé dans les tissus minéralisés à des concentrations qui représentent environ 0,5% du contenu en Pi (Wuthier et al., 1972).

Les premières études, dans les années 1960, menées par Fleisch, Russel et al. ont permis de révéler le rôle du PPi dans la biominéralisation (Fleisch and Bisaz, 1962a, 1962c, 1962b). Ces études prouvent la capacité du PPi à inhiber la cristallisation du Ca et du Pi et la formation d'HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$) (Fleisch and Neuman, 1961). Le PPi est capable de se lier à la surface des cristaux d'HA déjà formés et de bloquer leur capacité à agir comme nucléateur pour la minéralisation limitant ainsi la croissance des cristaux (Fleisch et al., 1966). Le PPi joue aussi un rôle dans la différenciation ostéoblastique (Pujari-Palmer et al., 2016) et la chondrogénèse (Johnson et al., 2006), ainsi qu'il va être capable de réguler l'expression de nombreux gènes comme : l'OPN impliquée dans les processus de minéralisation précédemment décrit (Harmey et al., 2004) ou les PAL (Addison et al., 2007).

B. Homéostasie du Pyrophosphate inorganique

L'équilibre entre sa production et sa dégradation détermine la concentration plasmatique de PPi.

1. Production du pyrophosphate

La production du PPi dépend de la disponibilité des acteurs du système purinergique, à commencer par les concentrations circulantes de nucléotides (tels que ATP et UTP) en partie dépendante de la fonction des transporteurs ABCC6 et ANK puis des systèmes enzymatiques de dégradation nucléotidique comme ENPP1 et CD73. Les protéines ABCC6 et ANK participent à la libération d'ATP en provenance du milieu cellulaire vers le milieu extracellulaire (Jansen et al., 2014; Szeri et al., 2020). L'ectonucléotidase ENPP1 est ensuite capable d'hydrolyser l'ATP en AMP et PPi. L'AMP est hydrolysé par le CD73 en adénosine et Pi. Au décours, l'adénosine après fixation à son récepteur inhibe la transcription du gène ALPL codant pour les TNAP capables de dégrader le PPi en 2 Pi. (figure 6)

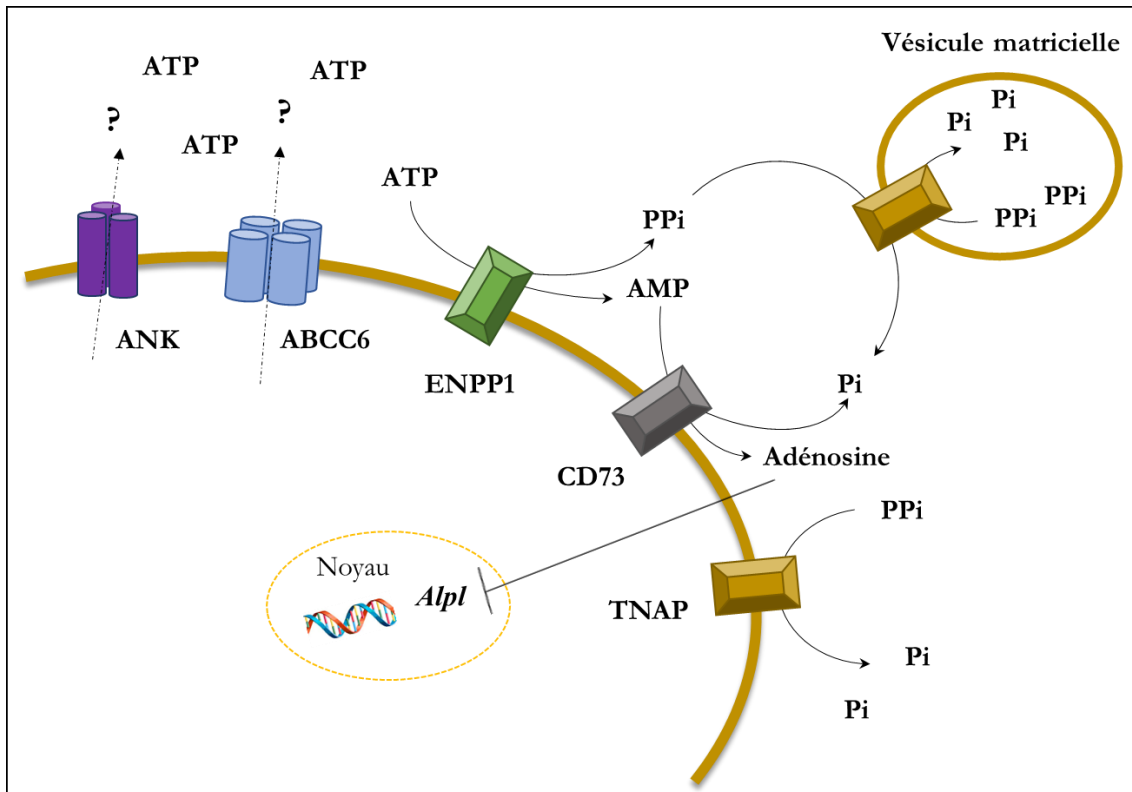


Figure 6. Représentation schématique adaptée de Ziegler et al., 2018 des principaux acteurs impliqués dans la formation des calcifications ectopiques.

a) ENPP1

L'ENPP1 est l'ectoenzyme la plus importante dans la génération du PPi à partir de l'hydrolyse de nucléotides extra cellulaires, et sa mutation est responsable du syndrome GACI (Rutsch et al., 2021). La famille des nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (NPP), incluant ENPP1, comprend sept enzymes identifiées à ce jour (Zimmermann et al., 2012) avec des fonctions variables en fonction des substrats ou de la localisation tissulaire. Leur rôle commun est d'hydrolyser les diesters de l'acide phosphorique en phosphomonoesters mais ils interviennent dans divers processus, en l'occurrence la minéralisation osseuse mais aussi la signalisation par l'insuline et les nucléotides et la différenciation cellulaire (Roberts et al., 2019). Les NPP sont principalement retrouvés à la surface des ostéoblastes et des chondrocytes ainsi que sur la membrane des vésicules matricielles.

Les patients CAGI (GACI) ont concentrations plasmatique en PPi très basses (Rutsch et al., 2001). Des modèles murins de GACI, mutants naturels de *Enpp1* présentent des calcifications ligamentaires et intra articulaires (Hajjawi et al., 2014). De plus, ces souris possèdent des concentrations

abaissées de PPi plasmatique avec une altération de l'ostéominéralisation, une réduction de la trame et de la résistance osseuse (Anderson et al., 2005). Le croisement de souris GACI (Enpp1^{as}) avec des souris surexprimant ENPP1 empêche l'apparition des calcifications ectopiques et permet de restaurer des concentrations plasmatiques en PPi préalablement abaissée de 70% par rapport aux souris WT. De plus, la surexpression d'ENPP1 sur des modèles de souris Abcc6^{-/-} permet d'améliorer le degré de calcification (qui persiste), avec une restauration partielle des concentration plasmatiques en PPi (Zhao et al., 2017). De plus, l'inhibition de TNAP est capable de contrôler la calcification ectopique induite par une mutation inactivatrice d'ENPP1 sur des modèles murins génétiquement modifiés (Hessle et al., 2002). Les modèles de thérapie génétique semblent intéressants dans la prise en charge des mutations inactivatrice d'ENPP1 (Albright et al., 2015).

b) ABCC6

Le transporteur ABCC6 (ATP Binding Cassette), est principalement exprimé au niveau de pôle basolatéral de la membrane hépatocytaire et de manière moins importante du côté basolatéral des cellules tubulaires proximales rénales (Kool et al., 1999; Le Saux et al., 2000b).

Le PXE est dû une mutation inactivatrice d'ABCC6 mais ne se caractérise pas par des calcifications hépatiques, suggérant un rôle d'un ou plusieurs agents anti calcifiants de la circulation systémique (Jiang et al., 2010; Le Saux et al., 2006). Le substrat d'ABCC6 est encore indéterminé ; les hypothèses initiales ont concerné différents agents anti calcifiants comme la vitamine K (Brampton et al., 2011), la Fétuine A (Hendig et al., 2006) et la MGP (Vanakker et al., 2010). C'est en 2014 que Jansen a montré que la surexpression d'un transporteur ABCC6 fonctionnel au niveau cellulaire était liée à une augmentation d'ATP et de PPi dans le milieu extracellulaire et que les patients PXE présentaient des niveaux de PPi plasmatiques plus bas que des sujets sains (Jansen et al., 2014). Plus récemment, l'équipe d'Emmanuel LeTavernier a identifié une augmentation de la prévalence des lithiases rénales chez les patients PXE, avec une calcification massive de la papille rénale (Letavernier et al., 2018a). Les souris Abcc6^{-/-} présentent une réduction de 60 % des concentrations plasmatiques de PPi et développent des calcifications ectopiques (Jansen et al., 2013; Le Saux et al., 2000c). De façon intéressante, la surexpression du transgène ABCC6 humain fonctionnel dans le foie de souris Abcc6 KO restaure les concentrations en

PPi plasmatiques entraînant une réduction importante des calcifications ectopiques (Letavernier et al., 2018b; Pomozi et al., 2017a). Les souris *ABCC6* KO ont des concentrations plasmatiques en PPi diminuées à la sortie du foie et du rein par rapport aux souris WT et les concentrations d'efflux du rein équivalent à 1/10^e des celles du foie, en faveur du rôle prépondérant du foie dans l'homéostasie du PPi au cours du PXE (Li et al., 2017).

Le transporteur *ABCC6*, en participant à l'homéostasie des nucléotides extracellulaires, constitue un élément clé modulant le taux plasmatique de PPi, plaçant *ABCC6* comme un acteur prépondérant dans la régulation de la calcification du TC (revue cosignée, Favre et al., 2017).

c) ANK

La protéine ANKH (ankylose progressive ou ANKH) est issue du gène *ANKH* mis en évidence dans les années 2000 (Nürnberg et al., 2001).

Une mutation activatrice de *ANKH* est responsable d'arthropathie familiale à dépôt de cristaux de pyrophosphate de calcium. Pour des raisons complexes ces calcifications n'ont pas lieu dans les tissus non cartilagineux. Le phénotype est variable, souvent associé à des arthrites aiguës et chroniques. La dysplasie cranio métaphysaire (DCM) est une maladie qui semble dépendre d'une mutation inactivatrice de *ANK* et se caractérise par une croissance excessive et une sclérose des os de la face ainsi qu'une désorganisation architecturale avec élargissement métaphysaire des os longs (Nürnberg et al., 2001).

La protéine transmembranaire ANK a été initialement décrite comme possible transporteur de PPi du milieu intra vers l'extra cellulaire (Ho et al., 2000). Cependant, une étude récente montre que ANK joue un rôle principalement dans la libération de nucléotides triphosphates et de citrates dans le milieu extra cellulaire (Szeri et al., 2020).

Au total de nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle du PPi avec une capacité d'autorégulation. Par exemple, le PPi exogène entraîne la baisse de l'expression d'ENPP1 et ANK dans les ostéoblastes (Harmey et al., 2004), et les nucléotides comme l'ATP et l'UTP inhibent l'expression d'ENPP1 (Orriss et al., 2007).

2. Dégradation du pyrophosphate

a) Phosphatases alcalines (PAL)

Les PAL ont pour principal rôle d'hydrolyser et déphosphoryler les molécules contenant du P_i comme les nucléotides, les phosphoprotéines, les polysaccharides et les alcaloïdes. L'activité des PAL est dépendant du pH, elle est généralement mesurée à pH alcalin mais l'activité à pH physiologique est différente avec une affinité pour le PP_i bien plus importante pouvant permettre son hydrolyse (Zimmermann et al., 2012). Les PAL permettent donc l'hydrolyse d'esters de monophosphate à pH élevée = 8 (Moss, 1986), elles sont ancrées à la membrane via une GPI et sont libérées dans le milieu extracellulaire après clivage par des phospholipases.

Il existe 4 types de PAL humaine : la non tissu specific alkaline phosphatase (TNAP/ALPL), intestinale (IALP), placentaire (PLALP) et des cellules germinales (GCALP). Leur localisation est variable en fonction du type de PAL mais le plus souvent nous pouvons les retrouver au niveau de zone d'échange comme la bordure en brosses des entérocytes responsable de l'hydrolyse digestive des polyphosphates, sur l'endothélium, au niveau de la bordure en brosse des tubules rénaux proximaux (Hoshi et al., 1997; Nouwen and De Broe, 1994) ou l'épithélium biliaire.

Le rôle des TNAP est important aussi bien au niveau local qu'au niveau systémique, l'activité des PAL circulantes est un facteur indépendant de mortalité dans la population générale et chez les patients atteints d'un syndrome métabolique (Abramowitz et al., 2010; Krishnamurthy et al., 2011; Tonelli et al., 2009). Les TNAP seraient les seules PAL impliquées dans la minéralisation (Millán, 2013). Elles sont exprimées dans différents tissus et notamment au niveau des membranes cellulaires des chondrocytes hypertrophiques, des ostéoblastes et des odontoblastes. Un des rôle des TNAP est d'hydrolyser le PP_i en P_i pour participer à la formation de cristaux d'HA (Orimo, 2010) pendant le processus de minéralisation, démontré dans les années 1960, avec la formation de cristaux d'HA dans les VM issue de la membrane plasmique et riches en PAL (Anderson et al., 1997).

L'expression de TNAP au niveau hépatique et rénale est bien connue cependant leurs fonctions ne sont pas formellement établies. Au niveau hépatique la localisation de TNAP est située au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes et au niveau apicale du cytoplasme des épithélium du canal biliaire (Hoshi et al., 1997; Suzuki et al., 2006). La libération des TNAP au niveau plasmatique augmente lors d'une cholangite témoignant d'un rôle dans l'excrétion biliaire (Alvaro et al., 2000) avec un rôle de déphosphorylation de l'ATP à la surface des cholangiocytes pour la régulation de la bile. Sur des modèles de rats rendus urémiques par néphrectomie 5/6 et régime riche en Pi, l'augmentation de l'expression de TNAP au niveau aortique a été mise en évidence avant l'initiation de la calcification artérielle et la baisse des concentrations plasmatiques en PPi en faveur du rôle prépondérant de TNAP dans le processus de calcification artérielle (Goettsch et al., 2020; Hortells et al., 2017).

L'hypophosphatasie est une maladie rare caractérisée par une déminéralisation osseuse du fait d'un excès de PPi plasmatique induit par la baisse de son hydrolyse due à une mutation inactivatrice des TNAP (Liedtke et al., 2020). Des modèles de souris KO pour TNAP ont été développés comme modèle mimant l'hypophosphatasie. L'inactivation de TNAP est responsable d'un défaut du métabolisme en phosphoéтанолamine, et d'anomalie de la minéralisation squelettique. Les ostéoblastes des souris *Tnap*^{-/-} se différencient normalement mais ne peuvent pas initier la minéralisation *in vitro* (Johnson et al., 2000). Le croisement des souris présentant une inactivation du gène *Alpl* avec des souris *Ank*^{-/-} permet de corriger le déficit plasmatique en PPi et améliorer la minéralisation, témoignant d'une cible intéressante dans le cadre de l'hypophosphatasie et d'un crosstalk entre ANK et TNAP pour l'équilibre du PPi circulant (Harmey et al., 2004).

Le processus de bio minéralisation nécessite un contact entre les TNAP et le collagène qui n'existe pas dans les tissus riches en PAL comme le foie, l'intestin ou le placenta expliquant pourquoi les tissus mous riches en PAL ne minéralisent pas (Murshed et al., 2005).

Au cours de l'ostéodystrophie rénale, du rachitisme ou de l'ostéomalacie le processus de minéralisation est inefficace et ces troubles se caractérisent par des anomalies phosphocalciques associées à une augmentation de l'activité des PAL circulante et osseuse exceptée pour l'hypophosphatasie. Lors de la MRC, il existe une modification de l'activité des PAL et l'augmentation de cette activité est associée à la

survenue d'évènement cardiovasculaire, comme dans la population générale (Beddhu et al., 2009; Kunutsor et al., 2014). L'activité des PAL totales mesurée en routine dans le plasma reflète la production des ostases et d'autres isoformes des TNAP permettant d'apprécier le microenvironnement local de la minéralisation (Haarhaus et al., 2017). Le PPi est hydrolysé par les PAL et l'augmentation de l'activité des PAL enzymatique dans des aortes *in vitro* favorise l'apparition de calcifications artérielles (Lomashvili et al., 2004).

Les TNAP sont donc des enzymes clés des concentrations locales et plasmatiques de PPi ainsi que du degré de calcification. Il est important de distinguer les TNAP artériels/tissulaires et circulantes. La forme tissulaire correspond à une localisation de l'ectoenzyme à la surface tissulaire tandis que la forme circulante provient de l'apoptose des ostéoblastes et témoigne alors du renouvellement osseux. La corrélation entre les taux circulants de TNAP, de ses isoformes et des concentrations en PPi en pathologie mériterait d'être exploré. La surexpression de TNAP dans des VSMC va être à l'origine d'une calcification artérielle par baisse de PPi dans le milieu plasmatique (Savinov et al., 2015). Mais les TNAP sont aussi capable de dégrader l'ATP et l'AMP bien que l'activité soit inférieure à celle d'ENPP1 ou de CD73, témoignant de boucle de régulation entre les enzymes du système purinergique (Jackson et al., 2014).

b) CD73

Le CD73, ou ecto-5'-nucleotidase (NT5E) est une enzyme capable d'hydrolyser l'AMP en adénosine, adénosine capable d'inhiber l'expression des TNAP (Jin et al., 2016). La découverte de la mutation inactivatrice de *CD73* a été décrite pour la première fois par St Hilaire en 2011 (St Hilaire et al., 2011). La perte de fonction de CD73 est à l'origine d'une diminution d'adénosine circulante et d'une augmentation de l'activité des TNAP (Jin et al., 2016). L'augmentation de l'activité des TNAP va aussi être associée à la diminution du PPi dans le milieu extracellulaire. L'étidronate, un analogue stable du PPi, permet de prévenir les calcifications artérielles sur des modèles murins de souris *CD73*^{-/-} (Jin et al., 2016).

C. Pyrophosphate et maladies calcifiantes

1. Maladies monogéniques calcifiantes

Le déficit en PPi plasmatique chez l'homme est associé au développement de calcification dans deux maladies monogéniques : le PXE et les CAGI (GACI) (Jansen et al., 2013; Rutsch et al., 2003). En revanche, une ou plusieurs mutations de perte de fonction dans le gène codant pour TNAP entraînent des concentrations plasmatiques élevés en PPi, à l'origine d'une hypophosphatasie (HPP), un rachitisme ou une chondrocalcinose (Whyte, 2017). Les patients atteints d'ACDC ont une diminution des concentrations plasmatiques en adénosine et une augmentation de l'activité des TNAP (Jin et al., 2016) qui favoriserait alors la dégradation du PPi en Pi (Fausther et al., 2014; Markello et al., 2011).

2. Maladies acquises calcifiantes

Les concentrations plasmatiques en PPi sont aussi abaissées dans certaines maladies acquises et notamment la MRC au stade de la dialyse. En effet que ce soit chez des patients en dialyse péritonéale ou en hémodialyse, les concentrations plasmatiques en PPi sont abaissés d'environ 30% par rapport à une population de témoin (Lomashvili et al., 2005). Le PPi est éliminé par la technique de dialyse, mais il existe probablement une diminution de la production ou une augmentation du métabolisme extrarénal du PPi au cours de la MRC (Russell et al., 1969). De la même façon deux équipes ont dosé les concentrations plasmatiques en PPi avant et après dialyse, permettant de montrer l'absence d'efficacité de la dialyse sur l'évolution de ses concentrations à moyen terme et une baisse des concentrations en post dialyse immédiate de l'ordre de 30% qui n'est pas seulement expliquée par la clairance intra dialytique de l'ordre de 36% (Azpiazu et al., 2018; Lomashvili et al., 2005). L'explication semble être liée à l'augmentation de l'activité des TNAP plasmatiques pendant la dialyse, induite par la clairance dialytique du Pi qui lève l'inhibition des TNAP par le Pi. L'administration de Levamisole (inhibiteur pharmacologique des TNAP) permet de restaurer les concentrations plasmatiques en PPi au cours de la dialyse (Azpiazu et al., 2018). Ces résultats sont en faveur d'un rôle prépondérant de l'hydrolyse du PPi par les TNAP au cours de la MRC nécessitant le recours à la dialyse. Par analogie à la quantité de PPi éliminée pendant la dialyse la

clairance dialytique est assez semblable à la clairance rénale observé par Russel en 1976 (Russell et al., 1976).

Une seule étude réalisée par Lau en 2014 a étudié l'expression d'ABCC6 au cours de la MRC, et a reporté une baisse de l'expression protéique d'ABCC6 dans les reins et dans les foies de rats rendus urémiques par néphrectomie 5/6eme mais sans dosage de PPi plasmatique associé (Lau et al., 2014).

D. Voies possibles en thérapeutique

Des concentrations plasmatiques abaissées en PPi semblent être un élément central des maladies calcifiantes. Augmenter les concentrations en PPi est une approche thérapeutique instinctive pour limiter l'apparition ou l'évolution des calcifications ectopiques dans ces maladies. L'objectif étant de se rapprocher au maximum des concentrations en PPi physiologiques attendues pour des patients de même âge, même sexe et même FRCV.

L'administration de PPi exogène prévient l'apparition de calcifications artérielles sur des modèles animaux avec des modèles génétiques de maladies procalcifiantes ou de MRC induite ; sans inhibition de la minéralisation osseuse (O'Neill et al., 2011; Riser et al., 2011). Le fait que l'os ne soit pas touché est probablement expliqué par les hautes concentrations de TNAP dans ces tissus capables de dégrader le PPi.

Nous décrivons ci-dessous les principales possibilités de modifier les concentrations plasmatiques de PPi en lien avec les mécanismes connus précédemment décrits intervenant dans l'homéostasie du PPi et l'influence de la variation de concentration en PPi sur les calcifications ectopiques.

1. Administration exogène de Pyrophosphate

L'approche la plus évidente et la plus directe pour corriger le déficit plasmatique en PPi est l'apport exogène de PPi. Différentes voies d'administration du PPi ont été testées, telle que la voie sous

cutanée sur des modèles murins, cependant celle-ci favorise l'apparition au point d'injection de nodules puis de nécrose cutanée limitant son utilisation en pratique clinique actuellement (O'Neill et al., 2011).

L'administration de PPI intrapéritonéale chez des rats rendus urémiques ne modifie pas l'apparition de calcification artérielle mais les concentrations en calcium au sein des calcifications de l'aorte sont diminuées de 70 % (O'Neill et al., 2011). Cette même voie d'administration a été testée dans l'étude de Riser permettant de confirmer l'inhibition de la formation des calcifications de la média par l'apport de PPI intra péritonéal, sans influencer les lésions athérosclérotiques induites par un déficit en apolipoprotéine E (Riser et al., 2011). Cependant l'effet sur la minéralisation n'a pas été étudié. L'administration de PPI intra péritonéale prévient efficacement le développement de la calcification sur un modèle murin de PXE (Pomozi et al., 2017b). Cette voie intrapéritonéale semble être intéressante pour les patients en dialyse péritonéale.

On a longtemps considéré que le PPI était dégradé par les PAL intestinale et ne pouvait être absorbé per os, mais de récentes publications montrent que le PPI est biodisponible par voie orale chez l'homme, bien que faiblement (0,1%), permettant une augmentation de la concentration plasmatique en PPI et une efficacité contre la minéralisation (Dedinszki et al., 2017). En effet, sur des modèles murins de PXE et de GACI, l'administration orale de PPI ajouté dans l'eau de boisson ou la nourriture atténuée, sans complètement corriger, le phénotype de calcification ectopique (Dedinszki et al., 2017; Pomozi et al., 2017b, 2019). La biodisponibilité du PPI reste faible après administration per os et fait encore l'objet d'étude pour comprendre la cinétique et le rôle de l'hydrolyse digestive des PAL.

L'intérêt de déterminer les mécanismes de l'homéostasie du PPI est primordial pour envisager les différentes cibles d'exploration et de traitement en pathologie (Shimada et al., 2021). Nous savons que le PPI est un additif alimentaire E450 utilisé depuis de nombreuses années sans effet secondaire majeur rapporté, il est donc intéressant de pouvoir répondre à la question de l'administration exogène de PPI dont le coût serait faible, et dont la principale limite à son utilisation serait sa dégradation par les TNAP en Pi, agent pro calcifiant majeur.

2. Administration de biphosphonates

Les biphosphonates sont des analogues stables du PPI. Le mécanisme de liaison des biphosphonates aux minéraux osseux qui permet d'inhiber la formation et la propagation des cristaux d'hydroxyapatite est mis en évidence depuis de nombreuses années (Jung et al., 1973).

Les principaux modes d'action des biphosphates varient en fonction du type de biphosphate, mais restent de manière générale : l'inhibition des dépôts de cristaux d'hydroxyapatite limitant leur croissance et l'inhibition de l'activité ostéoclastique principalement dans le cadre de l'ostéoporose, de la maladie osseuse métastatique ou de la maladie de Paget (Drake et al., 2008; Russell, 2011).

Différentes études ont permis de mettre en lumière le rôle protecteur des biphosphonates contre les calcifications artérielles dans des modèles expérimentaux de calcifications artérielles d'origine génétique du fait des similitudes structurales entre le PPI et les biphosphonates. L'étidronate et l'alendronate ont montré leur efficacité sur la diminution des calcifications ectopiques des tissus mous et l'amélioration de l'architecture osseuse de modèles murins GACI permettant secondairement leur utilisation chez les patients atteints de GACI dont les résultats sont variables (Rutsch et al., 2008). L'équipe de Li a travaillé sur des modèles murins *Abcc6* $-/-$ en mettant préalablement en évidence le rôle bénéfique de certains biphosphonates pour la prévention des calcifications ectopiques sans réduction de celles déjà présentes associée à une amélioration de la minéralisation osseuse (Li et al., 2015, 2018). Une étude clinique néerlandaise a récemment montré l'efficacité de l'étidronate pour réduire la calcification artérielle et la néovascularisation sub-rétinienne chez les patients atteints PXE (Kranenburg et al., 2018).

Les effets secondaires de l'administration des biphosphonates sont non négligeables, bien que rares, avec l'ostéonécrose de la mâchoire et les fractures fémorales atypiques. Les biphosphonates sont responsables de modification néfaste de la microarchitecture osseuse. De plus, ils sont contre indiqués dans l'insuffisance rénale d'autant plus chez les patients hémodialysés ; les plus concernés par l'ostéodystrophie rénale.

3. Inhibiteurs des TNAP (iTNAp)

Une autre stratégie thérapeutique est de cibler la voie de dégradation du PPI notamment les inhibiteurs de TNAP (iTNAp). Deux approches sont en cours de développement pour l'inhibition de TNAP : la baisse de l'expression ou la baisse de l'activité.

L'administration d'iTNAP *in vitro*, comme le Levamisol, sur des VSMC en culture, a permis de confirmer le lien entre les calcifications de la MRC, l'augmentation de l'activité des TNAP (Lomashvili et al., 2008) et la diminution des concentrations locales en PPI (Narisawa et al., 2007). Les cellules *Abcc6*^{-/-} ont une expression et une activité accrues des TNAP *in vitro*, et l'administration d'un iTNAp sélectif dans le milieu extra cellulaire a empêché la calcification de ces cellules *Abcc6*^{-/-}. *In vivo*, l'ingestat de iTNAp a atténué la progression de la calcification chez les souris *Abcc6*^{-/-}, sans régression de celles pré existantes mais sans effets délétères sur les os en association à d'autres stratégies de traitement proposées (Ziegler et al., 2017). Cependant les iTNAp sont non sélectifs, et TNAP est exprimé dans de nombreux tissus notamment le foie, l'intestin, et les os.

La découverte d'un inhibiteur de TNAP industriel 5-((5-chloro-2-methoxyphenyl) sulfonamido) nicotinamide (SBI-425) (Pinkerton et al., 2018) disponible sous forme orale, a permis de tester son efficacité en prévention de la calcification ectopique sur des modèles murins PXE ou MRC induite avec un phénotype présentant une hyperparathyroïdie secondaire et une ostéodystrophie rénale (Pinkerton et al., 2018). Le traitement par SBI-425 permet de réduire la mortalité précoce sans altération de la fonction rénale sur des modèles murins. Il permet une baisse des calcifications aortiques sans effet sur les calcifications coronaires, possiblement liée à la faible diffusion dans ces tissus avec un rôle qui semble prédominant sur la médiacalcose (Tani et al., 2020). La médiacalcose étant la forme prédominante de calcification artérielle au cours de la MRC, des études sont en cours pour déterminer le rôle de ces iTNAp sur l'athérosclérose.

4. ENPP1 recombinant

L'administration d'ENPP1 recombinant enzymatique permet de prévenir l'apparition des calcifications sur des fibroblastes en culture et des modèles murins déficient pour ENPP1 (Albright et al., 2015; Nitschke et al., 2018). Des études sont en cours pour déterminer leur potentiel d'utilisation en pratique clinique sur des phénotypes tels que les enfants CAGI. En effet, l'administration d'ENPP1 recombinant sur des souris *Enpp1^{asi}* permet de réduire la propension des calcifications et d'augmenter les concentrations en PPi plasmatique. L'ENPP1 recombinant pourrait aussi être une option intéressante pour le PXE, en effet, les souris *Abcc6^{-/-}* ont des niveaux d'expression d'ENPP1 abaissés dans le foie et les reins comparés aux souris sauvages (Pomozi et al, 2017).

III. OBJECTIFS DE LA THESE

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition des calcifications artérielles et le retentissement sur la morbidité cardiovasculaire restent un enjeu de santé publique. En effet, la principale cause de mortalité chez les patients atteints de maladie procalcifiante, génétique ou acquise, est liée aux complications cardiovasculaires. Cependant le lien direct entre les calcifications et la maladie cardiovasculaire n'est pas clair. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, l'apparition des calcifications est dépendante d'un équilibre bien régulé entre les facteurs pro et anti calcifiants.

Le Pyrophosphate (PPi) est un agent anticalcifiant découvert dans les années 1960, dont le rôle principal est d'inhiber la formation et la croissance de cristaux d'hydroxyapatite. Les concentrations en PPi sont diminuées dans le plasma des patients atteints de PXE, maladie génétique calcifiante due à l'inactivation du transporteur ABCC6 (Jansen et al., 2013). Une telle diminution est retrouvée dans le plasma de souris ou de rat dont le gène *Abcc6* a été invalidé, avec des animaux présentant des calcifications des artères et des vibrisses (Li et al., 2017; Pomozi et al., 2017b). De plus, la surexpression de transgène ABCC6 humain fonctionnel dans le foie de souris *Abcc6*^{-/-} rétablit transitoirement les concentrations en PPi plasmatique et diminue la calcification (Pomozi et al., 2017a). Des expériences de perfusion d'organe chez la souris montrent que le foie de souris sauvage produit de grandes quantités de PPi contrairement au foie sans ABCC6 fonctionnel (Jansen et al., 2014). Ces mêmes expériences réalisées chez le rat sauvage montrent que les concentrations en PPi dans les perfusats de foie étaient 10 fois plus élevées que dans les perfusats de rein (Li et al., 2017). Le PXE est donc une maladie métabolique d'origine hépatique avec des manifestations systémiques.

Les objectifs de ma thèse étaient d'étudier les concentrations plasmatiques en PPi et les calcifications artérielles au cours de deux maladies calcifiantes acquises, la maladie rénale chronique, la fibrose et l'insuffisance hépatique qui touchent respectivement les reins ou le foie, organes exprimant majoritairement ABCC6, protéine ayant une contribution directe et significative sur les concentrations plasmatiques en PPi. Nous avons voulu déterminer si la transplantation rénale ou hépatique influençait ces deux paramètres.

Dans la première partie de la thèse : Notre objectif était de standardiser le dosage du pyrophosphate dans le plasma et différents fluides biologiques (milieux de culture, plasma, urine, salive, liquide articulaire) afin de permettre l'extension de son utilisation en clinique.

Dans la deuxième partie de la thèse, le but a été d'étudier l'influence de la maladie rénale et de la transplantation rénale sur les concentrations plasmatiques en PPi et de déterminer quels sont les acteurs impliqués dans l'homéostasie du PPi au cours de la maladie rénale. Nous avons mené une étude clinique incluant des patients insuffisants rénaux au stade de l'hémodialyse, des patients transplantés rénaux et des individus témoins et nous avons mesuré les concentrations plasmatiques en PPi, l'activité des PAL et d'ENPP1 et l'excrétion urinaire de PPi. Nous avons déterminé les scores calciques aortiques par mesure scanographique de manière rétrospective chez les patients hémodialysés en attente de transplantation rénale comparés à un groupe d'individu témoins.

L'objectif de la troisième partie de la thèse est de décrire pour la première fois l'homéostasie du PPi et des calcifications artérielles lors de la fibrose ou de l'insuffisance hépatique et après transplantation hépatique, ainsi de déterminer les différents acteurs impliqués dans les variations de concentration en PPi. Nous avons inclus et suivi de manière longitudinale des patients en attente de transplantation hépatique et jusqu'à 3 mois après la transplantation hépatique afin de (i) calculer les scores de fibrose et de cirrhose hépatique au moment de l'inclusion, (ii) réaliser un dosage des concentrations plasmatiques et urinaires en PPi à l'inclusion et après la transplantation hépatique, (iii) déterminer les différents composés circulants impliqués dans l'homéostasie du PPi : les PAL, les ostases, l'activité ENPP1, l'excrétion urinaire de PPi, (iv) mesurer un score calcique aortique et coronaire au cours du suivi, (v) prélever une biopsie de foie explanté au moment de la transplantation pour déterminer l'expression des molécules impliquées

dans l'homéostasie du PPi : ANK, ABCC6, ENPP1, NT5E, TNAP en les comparant à l'expression obtenue sur des biopsies hépatiques chez des patients atteints d'obésité sans NAFLD.

IV. RESULTATS

A. Amélioration du dosage du Pyrophosphate

1. Historique du dosage

A l'initiation de ma thèse, plusieurs techniques de dosage du PPi étaient utilisées et cela rendait impossible d'identifier une valeur de référence et une norme de concentration en PPi. En effet, la mesure des concentrations en PPi dans les fluides biologiques (plasma, urine, liquide synovial, milieu de culture) est effectuée depuis plus de 50 ans en utilisant différentes techniques : radioactivité, tests colorimétriques ou enzymatiques et détection chromatographique. Le PPi a dans un premier temps été mesuré selon la méthode de Fiske et Subbarow (Fiske et Subbarow, 1925 J. Biol. Chem. 66, 375-400) par l'hydrolyse acide du PPi en Pi et sa quantification ultérieure. Mais cette méthode était fortement limitée par la mesure de PPi aux faibles concentrations et les interactions avec la présence endogène de Pi, limitant son utilisation en pratique. Au décours, l'utilisation de pyrophosphate radiomarqué au ^{32}P a permis de mesurer, sur une population d'individus sains, une concentration plasmatique de PPi allant de 1,2 à 5,6 μM avec une moyenne de $3,50 \pm 0,11 \mu\text{M}$ (Russell et al., 1971). Selon la méthode de Silcox et Marty, basée sur une quantification spectrométrique par la mesure du phosphomolybdate réduit par la pyrophosphatase de levure après élimination du Pi et des protéines des échantillons, les valeurs moyennes de PPi sont de $1,80 \pm 0,06 \mu\text{M}$ dans les plasmas de personnes indemnes de toute pathologie (allant de 0,16 à 3,4 μM) (Silcox and McCarty, 1973). En utilisant une méthode enzymatique avec de l'UDPG-pyrophosphorylase couplée à une mesure fluorométrique du NADG néoformé, les concentrations de PPi sont plus élevées soit en moyenne $2,72 \pm 0,14 \mu\text{M}$ (Lust and Seegmiller, 1976). C'est en 1979 que l'équipe de Ryan et al. publie une étude clef après avoir passé en revue la concentration plasmatique de PPi de plusieurs études (Ryan et al., 1979). Ils sont arrivés à la conclusion de l'existence probable d'une ou plusieurs variables dans le plasma interférant avec le dosage du PPi car la moyenne des concentrations en PPi variait d'un minimum de 1,8 μM à un maximum de 3,5 μM . Plus tard, Lomashvili et al. ont décrit une méthode utilisant le ^{14}C UDP

glucose à partir de la méthode de Lust et Seegmiller modifiée et ont rapporté un niveau plasmatique moyen de 3,0 μM de PPi chez des sujets normaux (Lomashvili et al., 2005). Prosdocimo et al ont utilisé une méthode enzymatique basée sur la conversion du PPi en ATP, puis par le dosage de l'ATP néo-formé par la technique luciférine/ luciférase (Prosdocimo et al., 2009). Plus récemment, en utilisant cette méthode, deux études réalisées chez des volontaires hommes sains ont montré une concentration moyenne en PPi de l'ordre de 1 μM (Jansen et al., 2014, Dedinszki et al., 2017).

De ce fait la première partie de la thèse a consisté à standardiser la méthode de dosage permettant de déterminer les concentrations en PPi dans différents fluides biologiques pour une utilisation en routine, facilement transférable en clinique.

2. Matériels et méthodes

Une demande de brevet a été déposée le 09/09/2021 E P21306235.9 « *Method for determining the concentration of inorganic Pyrophosphate* ». Pour des raisons de confidentialité, aucune précision sur la notion de standardisation ne sera donnée dans ce manuscrit.

3. Principaux résultats, discussion et perspectives

La mise au point de notre méthode de dosage du PPi a permis la réalisation de nos études cliniques selon notre valeur de référence. La standardisation du dosage de PPi dans notre laboratoire nous permet de développer de nombreuses collaborations pour mieux comprendre l'homéostasie du PPi en physiologie et dans différentes pathologies, notamment avec le dosage du PPi urinaire dans le cadre de la néphrocalcinose et de la lithiase, ou le dosage du PPi dans le liquide synovial lors de la chondrocalcinose, ou encore, le dosage du PPi plasmatique lors de calcifications artérielles.

Le dosage du PPi nous permettra d'évaluer si les concentrations plasmatiques en PPi sont un biomarqueur des calcifications artérielles et d'envisager le développement de traitements préventifs ou curatifs lors de maladies liées à sa dérégulation. Actuellement un PHRC national « Etude PROPHECI » porté par le Professeur Leftheriotis au CHU de Nice est en cours. Cette étude clinique longitudinale réalisée en collaboration avec le Pr Ludovic Martin (CHU Angers, cohorte PXE) vise à évaluer la pharmacodynamie et la pharmacocinétique de l'administration exogène de PPi per os et la modification sur les concentrations

plasmatiques et urinaires en PPI associée aux conséquences sur les calcifications ectopiques chez des patients souffrants de PXE. Le contrôle des concentrations plasmatiques en PPI pourrait être envisagé dans d'autres pathologies au phénotype calcifiant dont les concentrations en PPI sont modifiées.

B. Homéostasie du Pyrophosphate au cours de la maladie rénale chronique

1. Objectifs

Les complications observées au cours de la maladie rénale chronique telles que l'augmentation des calcifications artérielles, et les anomalies du remodelage osseux sont proportionnelles à l'altération de la fonction rénale.

Notre objectif est de déterminer si les concentrations plasmatiques en PPI sont modifiées au cours de la maladie rénale et dépendent de l'activité plasmatique des PAL et/ou de l'élimination urinaire de PPI. L'augmentation de l'activité des PAL caractérise les anomalies du remodelage osseux et de l'ostéodystrophie rénale, fréquente chez les patients traités par la dialyse chronique et les patients transplantés.

2. Matériels et méthodes

Nous avons comparé avec une étude pilote des patients atteints de maladies rénales au stade de la dialyse ou de la transplantation rénale, à des personnes indemnes de maladie rénale.

Les dosages de PPI ont été réalisés selon la méthode décrite précédemment qui fait l'objet d'une demande de brevet, et les variables biologiques ont été comparées entre les groupes avec notamment : le Pi, le calcium, l'activité des PAL totales et le dosage des ostases, la PTH et le dosage urinaire de PPI et ont été recueillis dans le même temps après une période de jeun de plus de 8h.

La mesure de l'activité d'ENPP1 circulante a été permise grâce à la collaboration avec l'équipe de Frank Rutsch en Allemagne.

Les scanners abdominopelviens disponibles ont permis de déterminer un score calcique aortique selon la méthode d'Agatston, exprimée en score calcique/cm², rapporté à la surface du segment de l'aorte abdominale entre l'artère rénale droite et l'aorte abdominale distale.

3. Article

Cette étude a été financée par appel d'offre interne au CHU de Nice (PIPAL - 2018-A00140-55) et une bourse de la Société Française de Médecine Artérielle (SFMV 2017).

Les résultats ont fait l'objet d'une publication ci-dessous dans Frontiers en 2021 où je suis la première auteure.



Alkaline Phosphatases Account for Low Plasma Levels of Inorganic Pyrophosphate in Chronic Kidney Disease

OPEN ACCESS

Audrey Laurain^{1,2,3}, Isabelle Rubera², Christophe Duranton², Frank Rutsch⁴, Yvonne Nitschke⁴, Elodie Ray⁵, Sandor Vido³, Antoine Sicard^{1,3}, Georges Lefthérotis^{1,2,5} and Guillaume Favre^{1,2,3*}

Edited by:

Herve Kempf, UMR 7365 Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMOPA), France

Reviewed by:

David Magne, Université de Lyon, France

Said Kamel, INSERM U1088

Mécanismes Physiopathologiques et Conséquences des Calcifications Cardiovasculaires: Rôle des Remodelages Cardiovasculaires et Osseux, France

*Correspondence: Guillaume Favre
favre.g@chu-nice.fr

Specialty section: This article was submitted to Molecular Medicine, a section of the journal *Frontiers in Cell and Developmental Biology*

Received: 24 July 2020

Accepted: 16 November 2020

Published: 03 December 2020

Citation: Laurain A, Rubera I, Duranton C, Rutsch F, Nitschke Y, Ray E, Vido S, Sicard A, Lefthérotis G and Favre G (2020) Alkaline Phosphatases Account for Low Plasma Levels of Inorganic Pyrophosphate in Chronic Kidney Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:586831.
doi:10.3389/fcell.2020.586831

¹ Faculty of Medicine, Côte d'Azur University, Nice, France, ² UMR 7073, Laboratory of Physiology and Molecular Medicine (LP2M), Centre National de la Recherche Scientifique, Nice, France, ³ Nephrology Department, University Hospital, Nice, France, ⁴ Department of General Pediatrics, Muenster University Children's Hospital, Muenster, Germany, ⁵ Department of Vascular Medicine and Surgery, University Hospital, Nice, France

Introduction: Patients on dialysis and kidney transplant recipients (KTR) present the syndrome of mineral and bone disorders (MBD), which share common traits with monogenic calcifying diseases related to disturbances of the purinergic system. Low plasma levels of inorganic pyrophosphate (PP_i) and ectopic vascular calcifications belong to these two conditions. This suggests that the purinergic system may be altered in chronic kidney disease with MBD. Therefore, we perform a transversal pilot study in order to compare the determinants of PP_i homeostasis and the plasma levels of PP_i in patients on dialysis, in KTR and in healthy people.

Patients and Methods: We included 10 controls, 10 patients on maintenance dialysis, 10 early KTR 3 ± 1 months after transplantation and nine late KTR 24 ± 3 months after transplantation. We measured aortic calcifications, plasma and urine levels of PP_i,

the renal fractional excretion of PP_i (FePP_i), nucleoside triphosphate hydrolase (NPP) and ALP activities in plasma. Correlations and comparisons were assessed with non-parametric tests.

Results: Low PP_i was found in patients on dialysis [1.11 (0.88–1.35), *p* = 0.004], in early KTR [0.91 (0.66–0.98), *p* = 0.0003] and in late KTR [1.16 (1.07–1.45), *p* = 0.02] compared to controls [1.66 (1.31–1.72) μmol/L]. Arterial calcifications were higher in patients on dialysis than in controls [9 (1–75) vs. 399 (25–526) calcium score/cm², *p* < 0.05]. ALP activity was augmented in patients on dialysis [113 (74–160), *p* = 0.01] and in early KTR [120 (84–142), *p* = 0.002] compared to controls [64 (56–70) UI/L]. The activity of NPP and FePP_i were not different between groups. ALP activity was negatively correlated with PP_i (*r* = -0.49, *p* = 0.001).

Discussion: Patients on dialysis and KTR have low plasma levels of PP_i, which are partly related to high ALP activity, but neither to low NPP activity, nor to increased renal excretion of PP_i. Further work is necessary to explore comprehensively the purinergic system in chronic kidney disease.

Keywords: alkaline phosphatase activity, hemodialysis, kidney transplant, pyrophosphate, purinergic mechanisms, mineral and bone disorder (CKD-MBD)

INTRODUCTION

Patients with chronic kidney disease (CKD) and those receiving renal replacement therapy exhibit various traits of the syndrome of mineral and bone disorders (MBD) during their lifetime (Ketteler et al.,2017). This syndrome is characterized by ectopic calcifications located in the intimal or medial arterial layers (Vervloet and Cozzolino,2017) increasing the risk of cardiovascular-related events and mortality (Chiu et al.,2010). It is also characterized by low plasma levels of calcium, high plasma levels of inorganic phosphates (P_i) and of parathyroid hormone (PTH), and by an increased alkaline phosphatase (ALP) plasma activity (Stevens et al.,2006). Bone turn-over ranges from high to low (Kurz et al.,1994) in relation to decreased bone mineral density observed in approximately 50% of patients, resulting in a higher risk of bone fracture (Miller et al.,2005). Any combination of the aforementioned abnormalities depends on the course and management of the renal disease (Miller et al.,2005;Stevens et al., 2006;Mazzaferro et al.,2009;Chiu et al.,2010;Wolf et al.,2016). Here, we consider inorganic pyrophosphate (PP_i) in patients with end stage CKD on renal replacement therapies as a new player in the syndrome of MBD. Indeed, PP_i is one of the main circulating endogenous calcification inhibitors (Back et al.,2018). Micromoles of PP_i appear sufficient to inhibit the deposition of hydroxyapatite crystal on collagen activating sites in the presence of millimoles of Ca and P_i (Fleisch et al.,1966). In patients on maintenance dialysis [PP_i]_{pl} is low for unknown reasons (Lomashvili et al.,2005;O'Neill et al.,2010). Since PP_i is hydrolyzed by ALP, this might be due to high ALP, because a 30% decrease of [PP_i]_{pl} is observed at the end of the dialysis session in conjunction with significantly increased plasma ALP activity (Azpiazu et al.,2018) and because high plasma ALP activity belongs to the syndrome of MBD in end stage CKD (Kurz et al.,1994;Wallace et al.,1996;Wolf et al.,2016; Haarhaus et al.,2017;Ketteler et al.,2017;Bover et al.,2018).

Inorganic pyrophosphate is a key compound in the purinergic system. Actually, PP_i homeostasis has been shown to primarily depend on adenosine triphosphate (ATP) metabolism. Levels of extracellular PP_i are partly regulated by the ATP-binding cassette transporter, subfamily C, member 6 (ABCC6) (Le Saux et al., 2000) and by ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) (Rutsch et al.,2003). The liver is the main source of ABCC6-mediated and ENPP1-mediated extracellular PP_i (Jansen et al.,2014). Another source of PP_i is the secretion from its intracellular pool into the extracellular fluid by inorganic pyrophosphate transport regulator (ANKH) (Netter et al.,2004; Mitton-Fitzgerald et al.,2016). The influence of the diet on plasma PP_i levels is very limited (Dedinszki et al.,2017;

Pomozi et al.,2017). Finally, circulating PP_i is hydrolyzed by ALP and eliminated in urine (Letavernier et al.,2019).

A disruption in the balance between PP_i production and degradation results in disturbed mineralization process and low [PP_i]_{pl} in human with disorders of the purinergic system (Fish et al.,2013) and very likely in CKD. Therefore, we explored the relationship between [PP_i]_{pl} and the main compounds of the purinergic system in patients with CKD and MBD.

PATIENTS AND METHODS

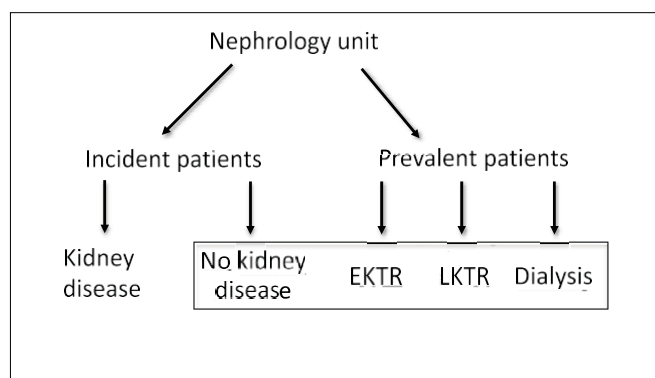
Patient Recruitment

For this cross-sectional pilot study, we included patients with well-defined phenotypes and controls (**Figure 1**). We selected 10 controls with no renal impairment, i.e., eGFR > 60 ml/min/1.73 m², no albuminuria, normal red and white urinary cell counts and normal renal ultrasonography. We selected patients on maintenance therapy for end-stage chronic kidney disease: 10 patients on maintenance hemodialysis (HD) and on a waiting list for KT; 10 KT recipients at \geq 1 months post-transplantation or early KTR (EKTR); nine KT recipients at \geq 3 months post-transplantation or late KTR (LKTR). All patients and controls gave informed consent for the study and underwent routine medical examination and fasting blood and urine analysis. Computer tomogram (CT) scans were collected when available but were not performed for the purpose of the study. The study was approved by the institutional Ethics Committee.

Biochemical and Hormonal Assays

PP_i

Pyrophosphate was measured in plasma and urine using an enzyme assay. Patient blood samples were collected in the



morning after an overnight fasting period (venous puncture) directly in a tube containing citrate, theophyllin, adenosine and dypiridamole (CTAD). Plasmas were ultra-filtrated at 4°C using centriscart filtration units (300 KDa cut-off, Sartorius) according to Tolouian et al. (2012). Urine samples were collected in the morning concomitantly to the blood samples. PP_i quantifications were performed using a modified method based on the enzyme assay described by Jansen et al. (2014).

Briefly, this method is based on the conversion of PP_i into ATP with ATP sulfurylase (Perkin Elmer, Boston MA, United States) and ATP concentrations are measured using a luminescent ATP detection kit (ATPlite[®], PerkinElmer). The values were corrected using the basal ATP levels measured in each sample. Dosage accuracy was 10% with 0.12 μmol/L absolute uncertainty.

Nucleoside Triphosphate Hydrolase (NPP) Activity

Enzyme activity was measured in heparinized plasma, buffered 1:2 in 0.2 M Tris, 1.6 mM MgCl₂, pH 8.1 by a previously described colorimetric assay using the synthetic substrate p-nitrophenylthymidine 5'-monophosphate (PNTM) (Rutsch et al., 2003). Protein concentration was determined using Pierce[™] BCA[™] Protein-Assay (Thermo Fisher Scientific). NPP activity was defined as 1 μmol substrate hydrolyzed per μg protein per hour.

Serum creatinine was assessed with Jaffe's kinetic methods (IDMS standardized), serum calcium was measured by absorption spectrophotometry, serum Pi was measured with UV methods on Cobas 8000 (RocheDiagnostics, Mannheim, Germany). 25-hydroxy vitamin D (25-OH vit D) was assessed by immunologic luminescence (Diasorin[®], Fallugia, Italy). Plasma ALP activity was assessed by absorbance at 450 nm of paranitrophenol at alkaline pH. Bone ALP isoform was measured using an ¹²⁵I-labeled sandwich radioimmunoassay (Immunotech, Beckman-Coulter Society, Marseille, France). Bio-intact parathyroid hormone (PTH) was measured by luminescence immunoassay (Advia Centaur Intact PTH, Siemens healthcare, Tarrytown, United States). Osteocalcin was assessed by immunoassay (ECLIA, RocheDiagnostics, Mannheim, Germany) and luminescence was determined with an automated device (Liaison XL, Diasorin[®], Fallugia, Italy).

Measurement of Arterial Calcification

Arterial calcification was measured on CT scans. Data were reconstructed with Aquarius[®] software (Tera Recon, San Mateo, CA, United States) to obtain 3-mm-thick consecutive slices. Calcification was measured with the open source Horos Software 2.0 between the right renal artery and the distal abdominal aorta according to the method described by Agatston et al. (1990).

Arterial surface was computed from the length (L) and the mean value of three diameters (D) according to the following formula: $L \times D \times \pi$ (in cm²). Results were expressed as calcium score divided by the surface of this segment of the abdominal aorta (calcium score/cm²).

Calculations

GFR was estimated (eGFR) using the CKD-EPI formula according to the plasma creatinine level. Body mass index was

calculated as weight in kg divided by height in meters squared (kg/m²). Fractional excretion of PP_i (FePP_i) was calculated as a percentage according to the following formula: $\frac{[PP_i]_u \times [creat]_p}{[PP_i]_p \times [creat]_u} \times 100$.

Statistics

Data are presented as medians with interquartile ranges [25th–75th percentiles]. All statistics were conducted with GraphPad Prism 6[®] software. Data were compared using non-parametric

tests: Kruskal Wallis test, followed by a Mann Whitney test in case of a statistically significant difference. Correlations were evaluated with Spearman's test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Overall, 39 patients were included in our study (**Table 1**). Age range and BMI were comparable in all groups. Hypertension was present in 40% of controls, 60% of HD, 40% of EKTR and 22% of LKTR. Type 2 diabetes (DT2) was present in 10% of controls, 30% of HD, 30% of EKTR whereas LKTR did not have DT2. Dyslipidemia was present in 30% of controls, 70% of HD, 60% of EKTR and 44% of LKTR. The syndrome of MBD was reflected by the degree of arterial calcification, which was significantly higher in HD than in controls; by significantly higher levels of parathyroid hormone (PTH) and osteocalcin in HD and KTR than in controls; by significantly higher bone ALP isoforms (**Table 1**) and higher ALP activity (**Figure 2A**) in HD or EKTR than in controls. Of note, two patients had very high ALP activity due to their poor compliance with treatment. All HD but one received phosphate binders and eight took 1-alpha 25-OH Vit D while most patients received cholecalciferol. Plasma levels of PP_i were significantly lower in all patient groups than in controls (**Figure 2B**). In contrast, renal elimination of PP_i was similar in all groups according to the FePP_i (**Table 1**). Plasma NPP activity was the same in all groups (**Figure 2C**). Plasma ALP activity was strongly and negatively correlated to [PP_i]pl (**Figure 3A**) and [PP_i]pl was positively correlated to [P_i]pl (**Figure 3B**). In contrast, there was no significant correlation between plasma ALP activity and [P_i]pl (**Figure 3C**) nor between plasma ALP activity and CRP levels ($r = 0.28$, $p = 0.09$), nor between bone ALP isoforms and CRP levels ($r = 0.18$; $p = 0.27$).

All incident or prevalent patients were asked to take part to the study unless they had an acute co-existing pathology, were below 18 years old or were incapable of giving informed consent. The inclusion of 10 patients in each group was anticipated and the patients could withdraw their consent anytime.

Patients without kidney disease after comprehensive examination were called controls. Early kidney transplant recipients (EKTR) were included at 2–11 months post-transplantation. Late kidney transplant recipients (LKTR) were included at 24–33 months post-transplantation. Routine medical examination and fasting blood and urine analysis were performed on a dedicated consultation for the purpose of the study.

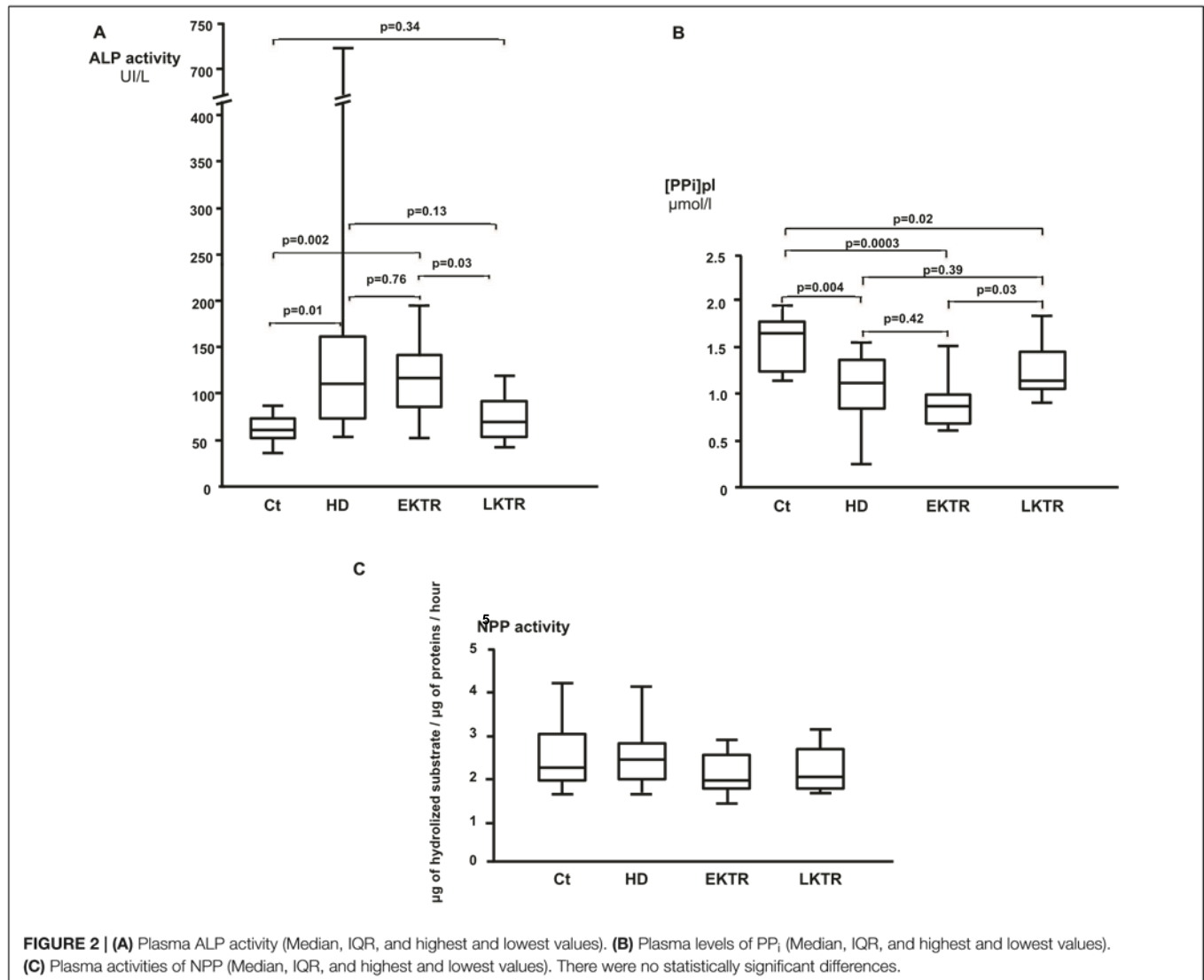
TABLE 1 | Patient and mineral and bone disorder characteristics.

	Ct (n = 10)	HD (n = 10)	EKTR (n = 10)	LKTR (n = 9)
Age (years)	58 [47–68]	58 [54–64]	59 [44–72]	50 [37–59]
Sex ratio (M/F)	7/3	4/6	5/5	4/6
Hypertension	4 (40%)	6 (60%)	4 (40%)	2 (22%)
Type 2 diabetes	1 (10%)	4 (40%)	3 (30%)	0 (%)
Dyslipidemia	2 (20%)	7 (70%)	6 (60%)	4 (44%)
BMI (kg/m ²)	28 [26–32]	27 [22–32]	26 [24–29]	25 [22–28]
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	70 [64–74]	–	44 [38–47]**	58 [50–68]
PTH (pg/mL)	55 [46–62]	300 [234–504]**	188 [153–210]**	134 [89–143]**
25-OH Vit D (ng/mL)	38 [30–45]	45 [33–50]	32 [26–42]	43 [28–48]
Bone specific alkaline phosphatase (µg/L)	9.2 [5.8–12.7]	15.5 [10.5–28.1]*	25.9 [14.9–31.1]**	5.7 [5.2–6.3]
[Ca]pl (mmol/L)	2.41 [2.33–2.42]	2.20 [2.14–2.24]**	2.40 [2.34–2.51]	2.49 [2.32–2.52]
[P _i]pl (mmol/L)	0.99 [0.95–1.03]	1.06 [0.91–1.22]	0.69 [0.60–0.99]	0.97 [0.86–1.04]
Osteocalcin (µg/L)	22.6 [20.9–26.8]	137.0 [100.7–263.8]**	46.5 [25.2–83.0]**	32.5 [26.3–47.9]*
Arterial calcifications (calcium score/cm ²)	9 [1–75]	399 [250–526]*	nd	nd
Fe PP _i (%)	11 [4–13%]	nd	14 [9–31%]	9 [8–16%]

*Vs ctrl P < 0.05.

**P < 0.01.

**P < 0.01.



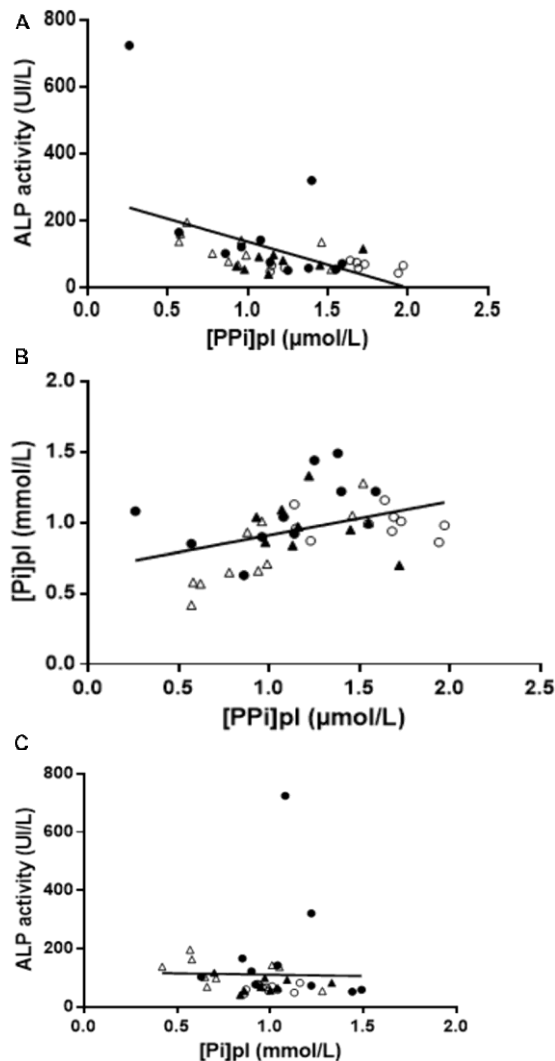


FIGURE 3 | (A) Relationship between plasma ALP activity and [PP_i]pl.

DISCUSSION

In the present study, we observed that [PP_i]pl levels were negatively correlated to plasma ALP activity and that [PP_i]pl was low in HD and remained low in KTR despite normalization of ALP activity, indicating that several mechanisms were controlling PP_i homeostasis in addition to ALP.

High plasma ALP activity was a major determinant for low [PP_i]pl in our study (Figure 2A). This was expected for the following reasons: 1/the elimination of PP_i depends on its

hydrolysis by tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP), encoded by the *ALPL* gene (Favre et al., 2017; Whyte, 2017), 2/ALP activity increases at the end of a dialysis session as compared to its baseline level and this results in 30% decrease of [PP_i]pl (Azpiazu et al., 2018), 3/pharmacological blockade of ALP activity restored [PP_i]pl in uremic mice (Tani et al., 2020). Plasma ALP activity and plasma levels of bone ALP isoforms followed the same pattern in our patients, in accordance with the overproduction of TNAP in CKD (Bover et al., 2018; Nizet et al., 2020). In contrast to our findings, Lomashvili et al. observed no correlation between plasma ALP activity and [PP_i]pl among 38 patients on maintenance dialysis (Lomashvili et al., 2005). This discrepancy might result from the broader range of plasma ALP activity in our cohort, including values both within and above normal limits. Since we found no statistically significant relationship between ALP activity and CRP, in contrast to published reports (Haarhaus et al., 2017), the degree of inflammation did not appear to influence ALP activity nor bone ALP isoforms in our patients. Here, high ALP activity belonged to the syndrome of MBD because high plasma ALP activity matched elevated bone ALP isoforms, was associated with high levels of osteocalcin and PTH (Table 1), as already described (Kurz et al., 1994; Wolf et al., 2016), and with the presence of arterial calcifications, in line with the literature (London et al., 2005).

We observed a positive correlation between [PP_i]pl and [P_i]pl (Figure 2C), which is consistent with other reports from three independent cohorts of patients on maintenance dialysis (Lomashvili et al., 2005; O'Neill et al., 2010; Villa-Bellosta et al., 2016). This led to the hypothesis that [P_i]pl could exert a negative feedback on ALP activity according to data observed *ex vivo* (Fernley and Walker, 1967; Coburn et al., 1998). However, our data were not in favor of such a negative feedback of [P_i]pl on ALP activity, as the latter was not correlated to [P_i]pl (Figure 2B). Consequently, we suggest that this balance may depend on undetermined cellular processes.

We observed that KT did not result in normal levels of [PP_i]pl 2 years after renal graft, despite recovery of a normal glomerular filtration rate and restoration of ALP activity to normal levels. Indeed, shortly after KT (2 ± 1 months), the low [PP_i]pl was in line with enhanced hydrolysis of PP_i due to raised plasma ALP activity. However, 2 years after KT, plasma ALP activity was normal and could not explain low [PP_i]pl levels. In light of the knowledge derived from studies of generalized arterial calcification of infancy (GACI), a rare disease characterized by low [PP_i]pl due to an inactivating mutation of *ENPP1* (Rutsch et al., 2003), we measured NPP plasma activity which was within normal values (Figure 1). Since PP_i is excreted in urine, we measured its renal elimination as reflected by FePP_i and found no increased PP_i excretion (Table 1). According to the mechanisms involved in pseudoxanthoma elasticum, due to mutations in *ABCC6* accounting for low [PP_i]pl (Le Saux et al., 2000) and vascular calcification (Leftheriotis et al., 2013), it could be that the production of PP_i related to *ABCC6* was decreased in our patients. Indeed, experimental data from uremic rats showed that low [PP_i]pl resulted from low *ABCC6* protein expression in the kidneys and in the liver (Lau et al., 2014). Furthermore, ANKH controls [PP_i]pl levels in uremic rats (Zhao et al., 2012;

Chen et al.,2019). However, in humans, mutations of *ANKH* account for craniometaphyseal dysplasia and, to the best of our knowledge, [PPI]pl levels was not yet measured in this condition ([Chen et al.,2011](#)).

This study is the first one, to the best of our knowledge, exploring the crosstalk between the purinergic system and PPI. IR and CD set up the dosage's method for PPI, mineral and bone disorder in CKD. The low [PPI]pl in KTR and the inverse relationship between ALP activity and [PPI]pl are new observations. However, this study is limited by the low number of patients and by the lack of association between biological and clinical data. Larger studies are needed to confirm our observations.

CONCLUSION

In conclusion, low [PPI]pl is partly related to its high level of hydrolysis due to elevated plasma ALP activity in patients with MBD induced by CKD. This is not the only mechanism because [PPI]pl remains low although plasma ALP activity is restored to normal levels after kidney transplantation. In addition to many experimental data, our pilot clinical study suggests that the purinergic system should be comprehensively explored in CKD in order to shed light on the complex pathogenesis of MBD ([Back et al.,2018](#)).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Comité de Protection des Personnes Sud Mediterranee III CHU de Nimes. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the

individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AL selected the patients, performed the clinical and biological investigations, determined the plasma levels of PPI. IR and CD set up the dosage's method for PPI, performed the dosages and provided their scientific expertise to the study. FR and YN performed the assays for NPP1 activity and provided their scientific expertise to the study. ER measured the arterial calcifications. SV referred the patients on maintenance dialysis and provided his medical expertise to the study. AS referred the transplanted patients and provided his medical expertise to the study. GL provided the scientific background for the design of the study and validated the measurements of arterial calcifications. GF delineated the protocol of the study and performed the clinical and biological investigations. All authors significantly contribute to the redaction of the manuscript.

FUNDING

This work was sponsored by the "Centre Hospitalier Universitaire de Nice" (Nice University Hospital) for regulatory and ethics approval. This work was supported by a grant from the Delegation of Clinical Research and the Innovation of University Hospital of Nice "2018." The number of the trial is 2018-A00140-55 ([clinicaltrial.gov](#)).

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the probands and to the patients for their kind participation and to Céline Fernandez, Nadia Ben Hassen-Dakhlaoui, and Kevin Zorzi for their skilled monitoring of the study. We thank Drs. Tamas Aranyi and Flora Szeri for their contributions to the preliminary discussions regarding this

REFERENCES

- Agatston, A. S., Janowitz, W. R., Hildner, F. J., Zusmer, N. R., Viamonte, M. Jr., et al. (1990). Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 15, 827–832. doi: 10.1016/0735-1097(90)90282-t
- Azpiazu, D., Gonzalez-Parra, E., Egado, J., and Villa-Bellosta, R. (2018). Hydrolysis of extracellular pyrophosphate increases in post-hemodialysis plasma. *Sci. Rep.* 8:11089. doi: 10.1038/s41598-018-29432-29434
- Back, M., Aranyi, T., Cancela, M. L., Carracedo, M., Conceicao, N., Leftheriotis, G., et al. (2018). Endogenous calcification inhibitors in the prevention of vascular calcification: a consensus statement from the cost action EuroSoftCalcNet. *Front. Cardiovasc. Med.* 5:196. doi: 10.3389/fcvm.2018.00196
- Bover, J., Urena, P., Aguilar, A., Mazzaferro, S., Benito, S., Lopez-Baez, V., et al. (2018). Alkaline phosphatases in the complex chronic kidney disease-mineral and bone disorders. *Calcif. Tissue Int.* 103, 111–124. doi: 10.1007/s00223-018-0399-z
- Chen, B., Zhao, Y., Han, D., Zhao, B., Mao, Y., Cui, Z. K., et al. (2019). Wnt1 inhibits vascular smooth muscle cell calcification by promoting ANKH expression. *J. Mol. Cell Cardio.* 135, 10–21. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.07.008
- Chen, I. P., Wang, L., Jiang, X., Aguila, H. L., and Reichenberger, E. J. (2011). A Phe377del mutation in ANK leads to impaired osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in a mouse model for craniometaphyseal dysplasia (CMD). *Hum. Mol. Genet.* 20, 948–961. doi: 10.1093/hmg/ddq541
- Chiu, Y. W., Adler, S. G., Budoff, M. J., Takasu, J., Ashai, J., and Mehrotra, R. (2010). Coronary artery calcification and mortality in diabetic patients with proteinuria. *Kidney Int.* 77, 1107–1114. doi: 10.1038/ki.2010.70
- Coburn, S. P., Mahuren, J. D., Jain, M., Zubovic, Y., and Wortsman, J. (1998). Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in serum is inhibited by physiological concentrations of inorganic phosphate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3951–3957. doi: 10.1210/jcem.83.11.5288
- Dedinszki, D., Szeri, F., Kozak, E., Pomozi, V., Tokesi, N., Mezei, T. R., et al. (2017). Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol. Med.* 9, 1463–1470. doi: 10.15252/emmm.201707532

- Favre, G., Laurain, A., Aranyi, T., Szeri, F., Fulop, K., Le Saux, O., et al. (2017). The ABCG6 transporter: a new player in biomineralization. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1941. doi: 10.3390/ijms18091941
- Fernley, H. N., and Walker, P. G. (1967). Studies on alkaline phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. *Biochem. J.* 104, 1011–1018. doi: 10.1042/bj1041011
- Fish, R. S., Klootwijk, E., Tam, F. W., Klea, R., Wheeler, D. C., Unwin, R. J., et al. (2013). ATP and arterial calcification. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 405–412. doi: 10.1111/eci.12055
- Fleisch, H., Russell, R. G., and Straumann, F. (1966). Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 212, 901–903. doi: 10.1038/212901a0
- Haarhaus, M., Brandenburg, V., Kalantar-Zadeh, K., Stenvinkel, P., and Magnusson, P. (2017). Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 429–442. doi: 10.1038/nrneph.2017.60
- Jansen, R. S., Duijst, S., Mahakena, S., Sommer, D., Szeri, F., Varadi, A., et al. (2014). ABCG6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation—brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1985–1989. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304017
- Kettler, M., Block, G. A., Evenepoel, P., Fukagawa, M., Herzog, C. A., McCann, L., et al. (2017). Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease—Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) guideline update: what's changed and why it matters. *Kidney Int.* 92, 26–36. doi: 10.1016/j.kint.2017.04.006
- Kurz, P., Monier-Faugere, M. C., Bogner, B., Werner, E., Roth, P., Vlachojannis, J., et al. (1994). Evidence for abnormal calcium homeostasis in patients with adynamic bone disease. *Kidney Int.* 46, 855–861. doi: 10.1038/ki.1994.342
- Lau, W. L., Liu, S., and Vaziri, N. D. (2014). Chronic kidney disease results in deficiency of ABCG6, the novel inhibitor of vascular calcification. *Am. J. Nephrol.* 40, 51–55. doi: 10.1159/000365014
- Le Saux, O., Urban, Z., Tschuch, C., Csiszar, K., Bacchetti, B., Quaglini, D., et al. (2000). Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* 25, 223–227. doi: 10.1038/76102
- Leftheriotis, G., Omarjee, L., Le Saux, O., Henrion, D., Abraham, P., Prunier, F., et al. (2013). The vascular phenotype in Pseudoxanthoma elasticum and related disorders: contribution of a genetic disease to the understanding of vascular calcification. *Front. Genet.* 4:4. doi: 10.3389/fgene.2013.00004
- Letavernier, E., Boudierlique, E., Zaworski, J., Martin, L., and Daudon, M. (2019). Pseudoxanthoma elasticum, kidney stones and pyrophosphate: from a rare disease to urolithiasis and vascular calcifications. *Int. J. Mol. Sci.* 20:6353. doi: 10.3390/ijms20246353
- Lomashvili, K. A., Khawand, W., and O'Neill, W. C. (2005). Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2495–2500. doi: 10.1681/ASN.2004080694
- London, G. M., Marchais, S. J., Guerin, A. P., and Metzger, F. (2005). Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 525–531. doi: 10.1097/01.mnh.0000168336.67499.c0
- Mazzafarro, S., Pasquali, M., Taggi, F., Baldinelli, M., Conte, C., Muci, M. L., et al. (2009). Progression of coronary artery calcification in renal transplantation and the role of secondary hyperparathyroidism and inflammation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 685–690. doi: 10.2215/CJN.03930808
- Miller, P. D., Roux, C., Boonen, S., Barton, I. P., Dunlap, I. E., and Burgo, D. E. (2005). Safety and efficacy of risedronate in patients with age-related reduced renal function as estimated by the cockcroft and gault method: a pooled analysis of nine clinical trials. *J. Bone Miner. Res.* 20, 2105–2115. doi: 10.1359/JBMR.050817
- Mitton-Fitzgerald, E., Gohr, C. M., Bettendorf, B., and Rosenthal, A. K. (2016). The role of ANK in calcium pyrophosphate deposition disease. *Curr. Rheumatol. Rep.* 18:25. doi: 10.1007/s11926-016-0574-z
- Netter, P., Bardim, T., Bianchi, A., Bichette, P., and Loeuffle, D. (2004). The ANKH gene and familial calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease. *Joint Bone Spine* 71, 365–368. doi: 10.1016/j.jbspin.2004.01.011
- Nizet, A., Cavalier, E., Stenvinkel, P., Haarhaus, M., and Magnusson, P. (2020). Bone alkaline phosphatase: an important biomarker in chronic kidney disease—mineral and bone disorder. *Clin. Chim. Acta* 501, 198–206. doi: 10.1016/j.cca.2019.11.012
- O'Neill, W. C., Sigris, M. K., and McIntyre, C. W. (2010). Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 25, 187–191. doi: 10.1093/ndt/gfp362
- Pomzi, V., Brampton, C., van de Weetering, K., Zoll, J., Calio, B., Pham, K., et al. (2017). Pyrophosphate supplementation prevents chronic and acute calcification in ABCG6-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 187, 1258–1272. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.02.009
- Rutsch, F., Ruf, N., Vatgankar, S., Tohat, M. R., Suk, A., Hohne, W., et al. (2003). Mutations in ENPP1 are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat. Genet.* 34, 379–381. doi: 10.1038/ng1221
- Stevens, L. A., Coresh, J., Greene, T., and Levey, A. S. (2006). Assessing kidney function—measured and estimated glomerular filtration rate. *N. Engl. J. Med.* 354, 2473–2483. doi: 10.1056/NEJMra054415
- Tani, T., Fujiwara, M., Orimo, H., Shimizu, A., Natsawa, S., Pinkerton, A. B., et al. (2020). Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improves survival probability in the CKD-MBD mouse model. *J. Pathol.* 250, 30–41. doi: 10.1002/path.5346
- Toloutan, R., Comery, S. M., O'Neill, W. C., and Gupta, A. (2012). Using a filtration technique to isolate platelet free plasma for assaying pyrophosphate. *Clin. Lab.* 58, 1129–1134.
- Vervloet, M., and Cozzolino, M. (2017). Vascular calcification in chronic kidney disease: different bricks in the wall? *Kidney Int.* 91, 808–817. doi: 10.1016/j.kint.2016.09.024
- Villa-Bellocosa, R., Gonzalez-Parra, E., and Egido, J. (2016). Alkalosis and dialytic clearance of phosphate increases phosphatase activity: a hidden consequence of hemodialysis. *PLoS One* 11:e0159858. doi: 10.1371/journal.pone.0159858
- Wallace, B. H., Lott, J. A., Griffiths, J., and Kirkpatrick, R. B. (1996). Isoforms of alkaline phosphatase determined by isoelectric focusing in patients with chronic liver disorders. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 34, 711–720.
- Whyte, M. P. (2017). Hypophosphatemia: an overview for 2017. *Bone* 102, 15–25. doi: 10.1016/j.bone.2017.02.011
- Wolf, M., Weir, M. R., Kopyt, N., Mannon, R. B., Von Visger, J., Deng, H., et al. (2016). A prospective cohort study of mineral metabolism after kidney transplantation. *Transplantation* 100, 184–193. doi: 10.1097/TP.0000000000000823
- Zhao, G., Xu, M. J., Zhao, M. M., Dai, X. Y., Kong, W., Wilson, G. M., et al. (2012). Activation of nuclear factor-kappa B accelerates vascular calcification by inhibiting ankylosin protein homolog expression. *Kidney Int.* 82, 34–44. doi: 10.1038/ki.2012.40

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling editor declared a past co-authorship with several of the authors FR, YN, and GL.

Copyright © 2020 Laurain, Rabera, Duranton, Rutsch, Nitschke, Ray, Vado, Sicard, Leftheriotis and Favre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4. Principaux résultats, discussion et perspectives

Cette étude a permis de confirmer la diminution des concentrations plasmatiques en PPI chez les patients atteints de maladie rénale en dialyse et d'établir un lien entre l'augmentation de l'activité des PAL et la baisse du PPI plasmatique. Nous avons mis en évidence une corrélation négative entre l'activité des PAL totales, les ostases et les concentrations plasmatiques en PPI. L'activité des PAL n'est pas corrélée à la fonction rénale et le rôle des PAL n'est pas clairement élucidé, bien qu'elles aient un rôle central dans la différenciation des VSMC et l'ostéoformation (Sheen et al., 2015), mais aussi dans l'homéostasie du PPI comme en témoigne son augmentation au cours de l'hypophosphatasie, qui correspond à l'inactivation du gène *ALPL* chez l'homme (Russell et al., 1971). Nous avons observé que l'augmentation de l'activité des PAL est associée à celle des ostases, de la PTH et de l'ostéocalcine au cours de la maladie rénale, qui sont des marqueurs de l'ostéodystrophie rénale. En définitive, la baisse de la concentration plasmatique de PPI chez les personnes dialysées semble liée à l'évolution de l'ostéodystrophie rénale.

Les concentrations plasmatiques en PPI abaissées au cours de la maladie rénale chronique en dialyse dépendent en partie de son hydrolyse par l'activité des PAL totales et des ostases. Ces résultats sont cohérents avec ceux préalablement obtenus par l'étude de Villà-bellosta dans laquelle l'administration de Levamisol, inhibiteur non sélectif des TNAP, permettait de restaurer les concentrations en PPI après la dialyse ex vivo (Azpiazu et al., 2018). L'étude d'Azpiazu réalisée chez des patients dialysés (Azpiazu et al., 2018) a permis de renforcer les résultats préliminaires de l'équipe de Russel (Russell et al., 1976) indiquant que la clairance dialytique du PPI a probablement un rôle dans l'élimination du PPI chez les patients dialysés, associée à l'augmentation de l'activité des PAL induite par la baisse du Pi en dialyse (levée d'inhibition). Dans notre étude les concentrations en Pi ne sont pas différentes entre les groupes et nos résultats ne révèlent pas le rôle du Pi comme un régulateur de l'activité des PAL au cours de la dialyse. En effet, nous n'avons pas mis en évidence de lien indépendant du PPI entre les concentrations en Pi et l'activité des PAL dans notre étude.

Pour la première fois nous avons mis en évidence que les concentrations en PPI restaient abaissées à distance de la transplantation rénale lorsque la fonction rénale, caractérisée par la formule du DFG, est restaurée et que l'activité des PAL est normalisée par rapport à des individus témoins. Nous

savons que plusieurs modifications de l'homéostasie osseuse et phosphocalcique ont lieu dans l'année qui suit la transplantation rénale (Vangala et al., 2018; Wolf et al., 2016; Zaker and Ardalán, 2020). Les PAL ne sont pas les seules impliquées dans l'homéostasie du PPI au cours de la maladie rénale, nous n'avons cependant pas observé de différence d'excrétion urinaire de PPI avant ou après transplantation rénale, mais d'autres marqueurs sont à étudier.

Se pose la question de l'ingesta de PPI et de l'altération des mécanismes de la production de PPI qui pourraient influencer les concentrations plasmatiques chez le patient atteint de maladie rénale. Il pourrait y avoir une diminution de l'expression hépatique d'ABCC6, impliqué dans la production du PPI, comme le suggère l'étude de Lau et al. Chez le rat néphrectomisé 5/6 où l'expression d'ABCC6 est abaissée dans le foie (Lau et al., 2014). Nous n'avons pas pu analyser le rôle d'ABCC6 ou de ANK dans notre étude. La diminution de l'hydrolyse de l'ATP extracellulaire n'explique pas la baisse des concentrations en PPI dans notre étude car l'activité d'ENPP1 est identique entre les groupes.

L'équilibre des concentrations en PPI influence l'apparition des calcifications artérielles et des concentrations plasmatiques abaissées en PPI sont retrouvées au cours de la maladie rénale en dialyse. Nous avons mis en évidence une augmentation des calcifications de l'aorte abdominale chez les patients hémodialysés par rapport aux individus sains, sans mettre en évidence de corrélation avec les concentrations en PPI. L'augmentation de l'activité des PAL est associée à la mortalité cardiovasculaire dans la population générale et chez les patients en dialyse (Beddhu et al., 2009; Kunutsor et al., 2014; Shantouf et al., 2009) sans que l'explication physiopathologique ne soit claire (Tonelli et al., 2009). Il existe un lien entre une augmentation de l'activité des PAL totales et le score calcique coronaire, lui-même corrélé à la mortalité cardiovasculaire dans une population d'individu témoin avec un score réalisé en prévention primaire du risque cardiovasculaire (Panh et al., 2017). Il est donc possible que le lien entre les PAL et l'augmentation de la mortalité cardiovasculaire s'explique en partie par l'hydrolyse et la baisse des concentrations plasmatiques en PPI impliquées dans la croissance et la formation des cristaux d'hydroxyapatite.

La plus grande limite de notre étude est le faible nombre de patient inclus et l'absence de suivi longitudinal. De ce fait, un PHRC régional va débiter au cours du 3eme trimestre 2021 intitulé

« PREDICAL » dans la continuité de l'étude « PYROCAL » débutée au CHU de Nice, dont l'objectif principal est de déterminer l'homéostasie du PPI chez l'Homme au cours de la maladie rénale chronique à différents stades et de déterminer le lien entre le PPI et l'apparition des calcifications artérielles dès le stade précoce de la maladie rénale chronique. Cette étude longitudinale pourrait permettre d'identifier le PPI comme biomarqueur prédictif du développement des calcifications artérielles, dans un but diagnostique et thérapeutique pour l'évaluation et le suivi du risque cardiovasculaire au cours de la maladie rénale chronique.

Un projet financé par l'ANR 2021 en collaboration avec l'équipe d'Emmanuel LeTavernier (Sorbonne Univ/INSERM UMRS 155/AP-HP) a débuté visant à démontrer le lien entre le déficit en PPI et les calcifications au cours de la maladie rénale dans des modèles murins et élucider les processus physiopathologiques sous-jacents. Nous pourrions ainsi décrire l'impact de la maladie rénale sur l'homéostasie du PPI et l'expression d'ABCC6 dans les 2 principaux sites de son expression (foie et rein), ainsi que l'expression d'ENPP1, CD73, ANK et TNAP. Des approches pré-cliniques basées notamment sur des apports de PPI per os seront envisagées. Grâce à un modèle d'hémodialyse chez le rat, nous évaluerons comment la dialyse affecte la biodisponibilité du PPI, en mesurant les concentrations en Pi et PPI (et Ca ionisé) avant, pendant et après la dialyse dans le sang veineux, en parallèle de l'expression de la TNAP et l'activité des PAL. Nous vérifierons également si la perfusion de PPI pendant l'hémodialyse, avec ou sans inhibiteurs de TNAP, affecte les concentrations plasmatiques en PPI et la cristallisation du phosphate de calcium, dans une perspective préthérapeutique.

L'objectif à terme est de caractériser le PPI comme un potentiel biomarqueur du risque cardiovasculaire si lien direct existe entre le PPI, les calcifications artérielles et la mortalité cardiovasculaire.

C. Homéostasie du Pyrophosphate au cours de la fibrose et de l'insuffisance hépatique

1. Objectifs

Le foie est un organe qui produit de grandes quantités de PPi dépendant des fonctions d'ABCC6 (Jansen 2014). Dans cette perspective, nous avons analysé les concentrations plasmatiques en PPi et les différents acteurs impliqués dans l'homéostasie du PPi au cours de la fibrose et de l'insuffisance hépatique chez l'Homme.

L'objectif était de suivre les patients avant et après transplantation hépatique afin d'observer si la restauration des fonctions hépatiques influence l'homéostasie du PPi

2. Matériels et méthodes

Dans notre étude nous avons inclus des patients inscrits sur la liste d'attente pour une transplantation hépatique, et nous les avons suivis jusqu'à 3 mois après la transplantation hépatique.

A l'inclusion, les patients ont bénéficié d'un prélèvement biologique de sang et d'urine, pour la mesure des concentrations des variables d'intérêt notamment le PPi.

Au cours du suivi ils ont bénéficié d'un score calcique coronaire et aortique par mesure scannographique selon la méthode d'Agatston.

Au moment de la transplantation hépatique, un prélèvement de foie explanté a permis l'analyse des transcrits des gènes impliqués dans l'homéostasie du PPi (*ALPL* ; *ANK* ; *NT5E* ; *ABCC6* ; *ENPP1*).

Les patients transplantés ont bénéficié d'un nouveau prélèvement biologique pour la mesure des concentrations plasmatiques en PPi 3 mois après la transplantation hépatique.

3. Article

Cette étude a fait l'objet d'un financement par appel d'offre interne au CHU de Nice (PYROTH- 2018-A1745-50).

Les résultats font l'objet d'une publication soumise à American Journal of Gastroenterology en cours de relecture dans laquelle je suis la première auteure.

Title: pyrophosphate deficiency associated with liver cirrhosis and arterial calcifications is restored by liver transplantation: a pilot study.

Authors: Audrey Laurain ^{1,2,3}, Isabelle Rubera ^{2,3}, Micheline Razzouk-Cadet ⁴, Stéphanie Bonnafous ^{2,5,6}, Miguel Albuquerque ^{7,8}, Valérie Paradis ^{7,8}, Stéphanie Patouraux ^{2,9}, Christophe Duranton ^{2,3}, Olivier Lesaux ¹⁰, Georges Lefthériotis ^{2,3,11}, Albert Tran ^{2,5,6}, Rodolphe Anty ^{2,5,6}, Philippe Gual ^{2,5}, Antonio Iannelli ^{2,5,6} and Guillaume Favre ^{1,2,3}

Affiliations:

¹ Department of Nephrology, Pasteur 1 university hospital, Nice, France

² University of Côte d'Azur, Nice, France

³ LP2M CNRS UMR 7370, Nice, France

⁴ Department of Nuclear Medicine, Archet 1 university hospital, Nice, France

⁵ Inserm, U1065, C3M, Nice, France

⁶ Digestive Unit, Archet 2 University Hospital, Nice, France

⁷ Pathology Department, Beaujon University Hospital, AP-HP, Clichy, France.

⁸ INSERM U1149, Beaujon University Hospital, Clichy, France.

⁹ Pathology Department, Pasteur 1 university hospital, Nice, France

¹⁰ Department Cell and Molecular Biology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, United States of America

¹¹ Department of vascular medicine and surgery, Pasteur 1 University Hospital, Nice, France

Corresponding author: Dr Guillaume Favre, Service de Néphrologie, Dialyses, Transplantation, Hôpital Pasteur, Pavillon S, 30 Voie Romaine, BP 1069, 06002 Nice, France, favre.g@chu-nice.fr, Phone number (0033) 492038428, Fax number (0033) 492038495.

ABSTRACT

Objectives: Liver fibrosis is associated with arterial calcification (AC). Since the liver is a source of inorganic pyrophosphate (PPI), an anti-calcifying compound, we investigated the relationship between plasma PPI, liver fibrosis, liver function, AC and the hepatic expression of genes regulating PPI homeostasis.

Methods: AC scores were assessed in coronary arteries, abdominal aorta and aortic valves. Liver fibrosis was evaluated on liver biopsies and from non-invasive tests (FIB-4 and APRI scores). Liver functions were assessed by measuring serum albumin, ALBI, MELD and Child-Pugh scores. An enzymatic assay was used to dose plasma PPI ([PPI]pl). Gene expression assays were performed with mRNA extracted from liver biopsies from transplanted patients and from control individuals.

Results: [PPI]pl negatively correlated with APRI ($r=-0.57$, $p=0.001$, $n=29$), FIB-4 ($r=-0.47$, $p=0.006$, $n=29$) but not with interstitial fibrosis index from liver biopsies ($r=0.07$, $p=0.40$, $n=16$). Serum albumin positively correlated with [PPI]pl ($r=0.71$; $p<0.0001$, $n=20$). ALBI, MELD and Child-Pugh scores correlated negatively with [PPI]pl ($r=-0.60$, $p=0.0005$; $r=-0.56$, $p=0.002$; $r=-0.41$, $p=0.02$ respectively, with $n=20$). Liver fibrosis assessed on liver biopsies, by FIB-4 and by APRI positively correlated with coronary AC ($r=0.51$, $p=0.02$, $n=16$; $r=0.58$, $p=0.009$, $n=20$, $r=0.41$, $p=0.04$, $n=20$ respectively) and with abdominal aorta AC ($r=0.50$, $p=0.02$, $n=16$; $r=0.67$, $p=0.002$, $n=20$; $r=0.61$, $p=0.04$, $n=20$ respectively). FIB-4 also positively correlated with aortic valve calcification ($r=0.40$, $p=0.046$, $n=20$). The key regulator genes of PPI production in liver were lower in patients undergoing liver transplantation as compared to controls. Three months after surgery, serum albumin levels were restored to physiological levels (40 [37-44] vs 35 [30-40], $p=0.009$) and [PPI]pl was normalized (1.40 [1.07-1.86] vs 0.68 [0.53-0.80] $\mu\text{mol/L}$, $p=0.0005$, $n=12$).

Conclusions: Liver failure and/or fibrosis correlated with AC in several arterial beds and were associated with low plasma PPI and dysregulation of key proteins involved in PPI homeostasis. Liver transplantation normalized these parameters.

INTRODUCTION

Arterial calcification (AC) is a strong cardiovascular risk factor in the general population (1) and more so in recipients of liver transplant (2). Arterial calcification can be found in the intimal and/or in the medial layers of large arteries and also affects cardiac valves. Ectopic calcification in the vasculature is a dynamic process (3) and is usually assessed by computer tomogram (CT) scan as described by Agatston (4). In the last decade, liver fibrosis has been associated with AC (5-7). Liver fibrosis is characterized by the hepatic accumulation of extracellular matrix resulting from diverse chronic liver pathologies including viral hepatitis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and other causes (8). Liver cirrhosis is the most advanced stage of liver fibrosis and is histologically characterized by regenerative nodules of liver parenchyma surrounded by fibrotic septa. It can be complicated by portal hypertension and liver function deterioration with the related complications such as ascites, variceal bleeding or hepatic encephalopathy (8). Liver cirrhosis can be associated with hepatic release of tissue non-specific ALP (TNAP) and elevated plasma alkaline phosphatase (ALP) activity (9), high levels of total bilirubin and gamma-glutamyl transferase (GGT) (10) and eventually with liver failure resulting in low prothrombin levels and/or hypoalbuminemia (11). The treatment of liver cirrhosis with end stage liver failure is liver transplantation (LT).

The association between AC and liver fibrosis may be explained by the presence of similar factors. Inflammation, accumulation of pro-inflammatory macrophages and myofibroblasts, increased oxidative stress are recognized as causal factors involved in the pathogenesis of these two related pathological conditions (3, 8). An imbalance between pro and anti-calcifying compounds likely plays an important role as the liver is the main source of fetuin A (12) and osteoprotegerin (13), which are upregulated with liver dysfunction. Inorganic pyrophosphate (PPi) is one of the main regulators of soft tissues calcification and is found at the micromolar range in plasma (14-16). The liver is responsible for the majority of the circulating PPi (14, 17). PPi prevents the formation of hydroxyapatite crystals that results from calcium and inorganic phosphates precipitates.

Physiological mineralization is normally restricted to bones and teeth. However, in specific pathological contexts, ectopic calcification can affect a variety of soft tissues, but the skin, kidneys, tendons, and cardiovascular tissues are particularly prone to this pathology. Indeed, low levels of plasma PPI ([PPI]_{pl}) drives AC in several monogenic diseases and most likely in the advanced stages of chronic kidney disease (CKD) (16, 18). In recent years, the identification of mutations in the ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCC6 (19-21) and the characterization of its function (22) has provided new molecular insight into the regulation of ectopic calcification inhibition in relation to plasma PPI. [PPI]_{pl} mainly depends on the liver expression of adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) subfamily C, member 6 (ABCC6) (14) which is primarily found in the liver (23). ABCC6 promotes the cellular release of ATP from hepatocytes (14, 22). Extracellular ATP is then hydrolyzed into AMP and PPI by ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP-1). ENPP-1 is a cell membrane glycoprotein, which is particularly abundant in hepatocytes and is the only enzyme generating PPI (24). Ecto 5' nucleotidase (NT5E as known as CD73) further hydrolyzes AMP into inorganic phosphates (Pi) and adenosine, which represses the transcription of *ALPL* gene encoding TNAP (25). TNAP is a membrane-bound enzyme which is also present a circulating form in the plasma. TNAP hydrolyzes PPI into Pi (26) and plasma ALP activity is a major determinant of systemic PPI (16). It is therefore conceivable that liver dysfunction in humans may affect PPI homeostasis and, thus, promote the development of AC.

To test this hypothesis, we compared [PPI]_{pl} before LT and 3 months after LT. We also assessed the expression of 4 key regulators of PPI in liver tissues and established correlations between AC, indices of liver fibrosis and liver failure in these patients.

PATIENTS AND METHODS

Patients

All prevalent and incident patients listed for LT were invited to take part in the study. Non-inclusion criteria were fulminant hepatitis or refusal to participate in the study. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved on the 2nd, July, 2018 and by the Ethics Committee: “Comité de Protection des Personnes Est-III”. Informed consents were obtained from all patients and the study was registered in ClinicalTrials.gov with the following identifier: NCT03576859.

A control group composed of morbidly obese patients were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Archet 2, University Hospital, Nice, France) where they underwent bariatric surgery. Exclusion criteria included the presence of hepatitis B or hepatitis C infection, excessive alcohol consumption (>20g/d) or another cause of chronic liver disease as previously described (27-29). Surgical liver biopsies were obtained during surgery and no ischemic preconditioning was performed. Hepatic histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner *et al.* (30). All subjects gave informed written consent in accordance with French legislation on Ethics and Human Research referred to as Huriot-Serussat’s law. The “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice” approved the study (07/04/2003, N° 03.017).

Trial procedures

This was a pilot study following the standard course of medical and surgical care for LT candidates. Wait-listed patients were cared for according to the best clinical practices. A myocardial scintigraphy associated with a CT scan was used to measure AC. At the time of LT, liver biopsies from the explanted organ were obtained during surgery. Samples were immediately snap-frozen in liquid

nitrogen before storage at -80°C for later mRNA analyses or fixed paraformaldehyde to determine the histological fibrosis index. All LT recipients were examined three months post-surgery, when liver function is typically restored (Figure 1). Blood and urine samples were systematically collected in the morning after an overnight fast during the two scheduled visits, at baseline and three months after LT.

Calculation of scores

Liver biopsy sections were stained with Masson's trichrome, and images were collected with scanscope AT Turbo (LEICA®, Wetzlar, Germany). Liver fibrosis red-green-blue images were acquired using ImageScope (LEICA®, Wetzlar, Germany) and analyzed using a dedicated algorithm. A ratio of green positive pixels to total pixels detected, representing the areas of liver fibrosis over total tissue section, was obtained, and used as an index of interstitial fibrosis. FIB-4-index was calculated using the following formula: $[\text{age (years)} \times \text{AST (IU/L)}] / [\text{platelet counts (x10}^9\text{/L)} \times (\text{ALT (IU/L)})^{1/2}]$. APRI (AST-to-platelet ratio) index was calculated using the formula: $[(\text{AST/ULN}) / \text{platelet counts (x10}^9\text{/L)}] \times 100$ (ULN denotes the upper level of normal). The Pugh-Child score was determined as usual. The Albumin-Bilirubin (ALBI) score was calculated with serum albumin and total bilirubin and the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) scores were based on serum creatinine, total bilirubin, international normalized ratio, and serum sodium. AC scores were measured according to Agatston (4). CT-scans were performed with a Discovery NM/CT 670 with 16-slice scanner (Brightspeed Elite) integrating dose reduction technology (General Electric, Milwaukee, USA) in a supine position following a myocardial scintigraphy. The 4DM software (General Electric, Milwaukee, USA) was used to calculate the AC scores. Briefly, the software selected 3 consecutive pixels on 2.5 mm-thick consecutive slices to determine points which density was measured in Hounsfield unit (UH). The points were positioned on the coronary arteries, abdominal aorta and on the aortic valves using a hand-controlled trackball cursor. The points were multiplied by 1 (130 à 199 UH), 2 (200 à 299 UH), 3 (300 à 399 UH) or 4 (≥ 400 UH) and added to produce the AC scores. The AC scores of the abdominal

aorta were measured between the diaphragm and the bifurcation of the iliac arteries and divided by the length of the aorta to allow for the comparison of subjects of different height. AC scores were log-transformed for graphical representation and expressed in arbitrary unit.

Specific dosages

Plasma ALP activity was assessed by absorbance at 450 nm of paranitrophenol at alkaline pH. Inorganic pyrophosphate concentrations were measured using a modified method based on the enzyme assay described by Jansen *et al.* (14). as previously reported (16, 31). Briefly, PPI was converted into ATP using ATPsulfurylase (New England Biolabs, MO394L) in the presence of APS (adenosine-5'-phosphosulfate, Sigma-Aldrich, A5508). Generated ATP was subsequently quantified using a luminescent ATP detection kit (ATPlite, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions. The luminescence was measured on a microplate reader (Synergy HT, BioTek). PPI values were obtained by subtracting basal ATP levels measured in each sample.

Serum creatinine was assessed with Jaffe's kinetic methods (IDMS standardized). Renal function was determined by estimating glomerular filtration rate according to CKD-EPI formula with creatinine. Fractional excretion of PPI (FePPI) was calculated as a percentage according to the following formula: $[PPI]_u \times [creat]_{pl} / [PPI]_{pl} \times [creat]_u \times 100$. Body mass index (BMI) was calculated with the ratio of weight and square value of height. For real-time quantitative RT-PCR analyses, total liver RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen, Hilden, Germany) and treated with Turbo DNA-free DNase (AM 1907, Thermo Fisher Scientific Inc.) following the manufacturer's protocol. The quantity and quality of the RNA samples were determined using the Agilent 2100 Bioanalyzer with RNA 6000 Nano Kit (5067-1511, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Real-time quantitative PCR was performed in duplicate for each sample using the StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) as previously described (27). Gene expression was normalized to the *RPLP0* (Ribosomal Phosphoprotein Large P0) housekeeping gene and

calculated based on the comparative cycle threshold Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). The results were expressed in arbitrary units.

Outcomes

The primary outcome was a deficit in [PPi]pl before LT defined by a statistically significant difference between [PPi]pl in LT candidates at baseline and [PPi]pl three months after LT.

The secondary outcomes were the assessments of:

1/ low [PPi]pl levels in LT candidates with the most severe liver fibrosis or with the most severe liver failure assessed by the following associations:

- Association between [PPi]pl and liver fibrosis indexes;
- Association between [PPi]pl and albumin or clinical scores of liver failure;

2/ high arterial calcification levels in LT candidates with the most severe liver fibrosis or with the most severe liver failure assessed by the following associations:

- Association between [PPi]pl and AC indexes;
- Association between liver fibrosis indexes and AC indexes;
- Association between albumin or clinical scores of liver failure and AC indexes.

3/ high levels of plasma ALP activity, responsible for [PPi]pl hydrolysis, and low levels of molecules involved in PPi production, assessed by:

- the correlation between plasma ALP activity and [PPi]pl at baseline;
- the comparison of mRNA levels of *ABCC6*, *ENPP1*, *ALPL*, and *NT5E* between the liver biopsies from the explanted liver from patients undergoing LT and liver biopsies from a control group of individuals without liver disease;
- the comparison between plasma ALP activity in LT candidates at baseline and plasma ALP activity in LT recipients three months after LT.

Statistical analysis

Sample size calculation

We hypothesized that [PPI]pl were low in LT candidates and were restored within the normal range three months after LT. We estimated, based on a previous study (16), that the participation of ten patients would sufficiently power the study to identify a significant difference in the median [PPI]pl before and after LT.

Statistics

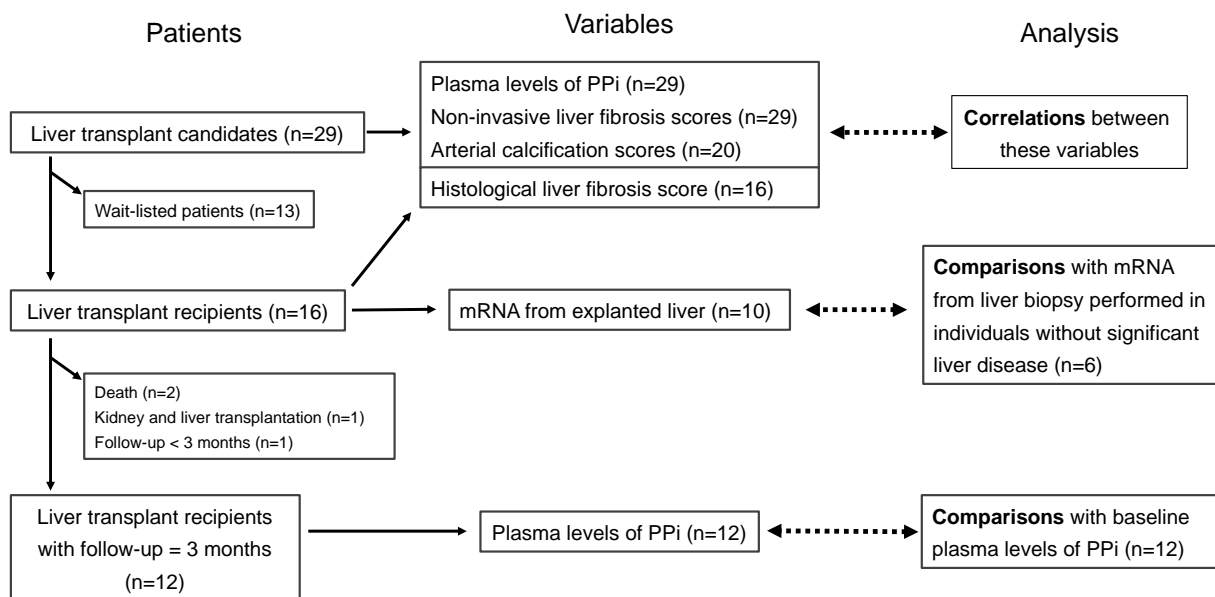
Quantitative data are presented as medians with interquartile ranges [25th–75th percentiles] and qualitative data are presented as counts and percentages. Data were compared using Mann Whitney test, paired or unpaired as appropriate. Correlations were evaluated with Spearman's test. All statistics were conducted with GraphPad Prism 6® software. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Description of the study

Between November, 2018 and November, 2020, 29 LT candidates were included in the study (Figure 1). Baseline [PPI]pl and clinical liver fibrosis scores were determined in all 29 LT candidates. Sixteen patients underwent LT 8 months after initial consultation. During surgery, a biopsy of the explanted liver was taken and prepared for interstitial fibrosis scoring from all patients, and 10 samples were obtained for mRNA extraction. Of the 29 patients, 12 LT recipients reached the 3rd month visit post-surgery within the study period. A cohort of six individuals without significant liver disease was used as a control group for the gene expression experiments.

Figure 1. Flow chart and study plan



Legend: during the study period, 29 patients waiting for LT were included. At baseline, plasma PPI levels and liver fibrosis scores were determined in all patients; AC scores were determined in 20 LT candidates. Correlations between AC scores, fibrosis scores and [PPI]pl were analyzed. Sixteen patients underwent LT. Biopsies from explanted liver prepared for interstitial fibrosis score were obtained from all patients and 10 samples were prepared for mRNA extraction. Six patients without significant liver disease were used as control for the gene expression assays. Twelve LT recipients

reached the 3rd months post-surgery withing the study period and their [PPI]pl were compared with baseline values.

Description of the patients

The median age of the 29 LT candidates was 60 [57-65] years. There was 22 men (76%) and 7 women (24%) and the median BMI was 27 [24-30] kg/m². Recommendation for LT were based on liver cirrhosis with viral hepatitis in 8 patients (27.5%), alcoholism in 7 patients (24.0%), alcoholism and viral hepatitis in 5 patients (17.0%), non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in 2 patients (7.0%), NASH and alcoholism in 2 patients (7%), cryptogenetic in 2 patients (7.0%), hemochromatosis in 1 patient (3.5%) and no liver cirrhosis with papillomatosis in 1 patient (3.5%) or refractory hepatocellular carcinoma in 1 patient (3.5%).

Twenty patients also had a hepatocellular carcinoma (69%), 21 patients were smokers (72%) and eight had type 2 diabetes (T2D) (27%). The median interstitial fibrosis score was 12.2 [7.2-17.9], the median FIB-4 score was 4.7 [1.9-9.3] and the median APRI index was 1.3 [0.5-2.7]. The Child-Pugh score was A in 16 LT candidates (55%), B in 10 LT candidates (34%) and C in 3 LT candidates (11%). Liver function tests are given in table 1.

The control group included six morbidly obese patients with no (n=2) or mild steatosis (n=4), without liver inflammation and without septal fibrosis. Median age was 26 [24-32] years. This group only included women (100%) with type 2 diabetes (100%) and their median BMI was 43 [40-46] kg/m². Their median FIB-4 score was 0.43 [0.37-0.52] and their median APRI score was 0.23 [0.20-0.30].

Table 1. Comparison between patients before and after LT

Variables	LT candidates (n=29)	LT recipients before LT (n=12)	LT recipients after LT (n=12)	p
Interstitial fibrosis score (n=16)	12.2 [7.2-17.9]	10.3 [5.2-16.1]	-	
FIB-4	4.7 [1.9-9.3]	5.8 [3.3-8.8]	-	
APRI	1.3 [0.5-2.7]	1.6 [1.0-3.2]	-	
MELD score	7 [3-12]	8 [5-13]	-	
ALBI score	-2.3 [-3.1 -1.8]	-2.1 [-2.8 -1.7]	-	
Pugh-Child score	6 [5-9]	8 [5-9]	-	
[PPi]pl (μmol/L)	0.86 [0.64-1.27]	0.68 [0.52-0.80]	1.40[1.07-1.86]	0.0005
Fe PPI (%)	7.6 [4.0-15.0]	9.2 [5.7-18.8]	9.3 [5.7-17.2]	0.31
eGFR (mL/mn/1.73m ²)	94 [82-101]	92 [81-98]	73 [62-92]	0.002
Serum albumin (g/L)	37 [33-44]	35 [30-40]	40 [37-44]	0.009
C-reactiv protein (mg/L)	2 [1-8]	7 [2-12]	3 [1-8]	0.20
Plasma ALP activity (UI/L)	138 [76-245]	191 [87-322]	81 [65-156]	0.05
Prothrombin level (%)	76 [62-94]	75 [60-89]	100 [87-100]	0.01
Total bilirubin (μmol/L)	14 [10-30]	20 [10-44]	9 [8-13]	0.059
AST (UI/L)	46 [32-72]	54 [37-91]	23 [18-27]	0.008
ALT (UI/L)	34 [28-39]	37 [29-54]	26 [20-28]	0.04
GGT (UI/L)	55 [37-133]	98 [30-162]	24 [13-67]	0.11
Platelet count (x10 ⁹ /L)	105 [71-216]	85 [72-142]	151 [124-233]	0.008

Legend: FIB-4 and APRI are liver fibrosis indexes, MELD, ALBI, Pugh-Child Scores are liver failure indexes, [PPi]pl = plasma level of inorganic pyrophosphate, FePPI = fractional excretion of inorganic

pyrophosphate, ALP = alkaline phosphatase, eGFR = estimated glomerular filtration rate. Comparisons were performed with paired Mann-Whitney tests. LT candidates were not different from LT recipients before LT. *P* values related to the comparisons between LT recipients before and 3 months post-surgery. Values are median \pm interquartiles 25-75.

Table 2. comparisons between LT candidates and biopsies from patients without liver fibrosis

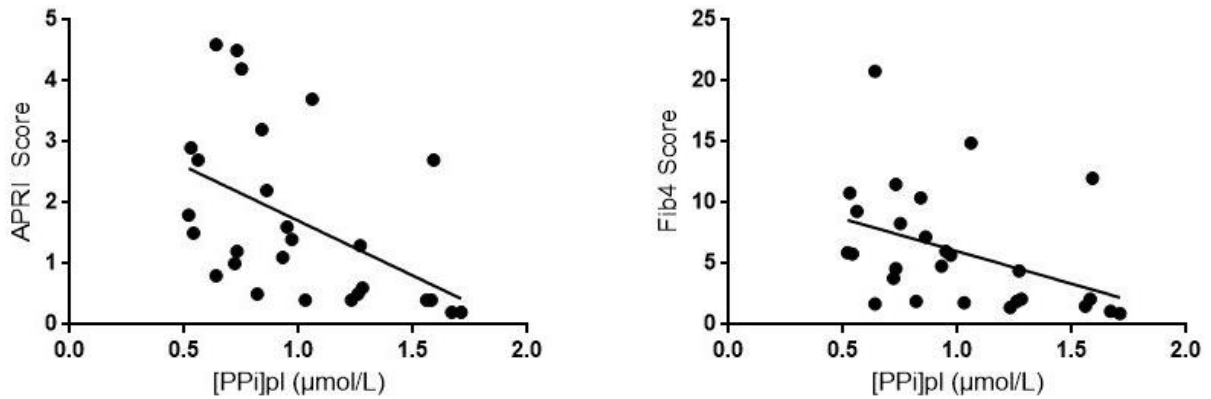
Variables	LT recipients (n=10)	Patients without fibrosis (n=6)	p
Pugh-Child score	8 [5-9]	-	
APRI	2.45 [0.83-3.63]	0.23 [0.20-0.30]	0.0004
FIB-4	5.78 [3.24-13.24]	0.43 [0.37-0.52]	0.0004
Plasma ALP activity (UI/L)	244 [110-364]	65 [58-83]	0.001
Total bilirubin (µmol/L)	35 [15-145]	6 [4-6]	0.003
Serum albumin (g/L)	29 [26- 33]	46 [39-48]	0.002

Legend: FIB-4 and APRI are liver fibrosis indexes, Pugh-Child Scores is a liver failure index, ALP = alkaline phosphatase. Comparisons were performed with Mann-Whitney tests. Values are median ± interquartiles 25-75.

1/ Low [PPi]pl levels associate with the most severe liver fibrosis

The APRI score correlated negatively with [PPi]pl ($r=-0.57$, $p=0.001$) and the FIB-4 score correlated negatively with [PPi]pl ($r=-0.47$, $p=0.007$) (Fig 2). However, there was no correlation between the interstitial fibrosis index and [PPi]pl ($r=0.07$, $p=0.40$, $n=16$).

Figure 2. Correlations between [PPI]pl and the non-invasive indexes of liver fibrosis

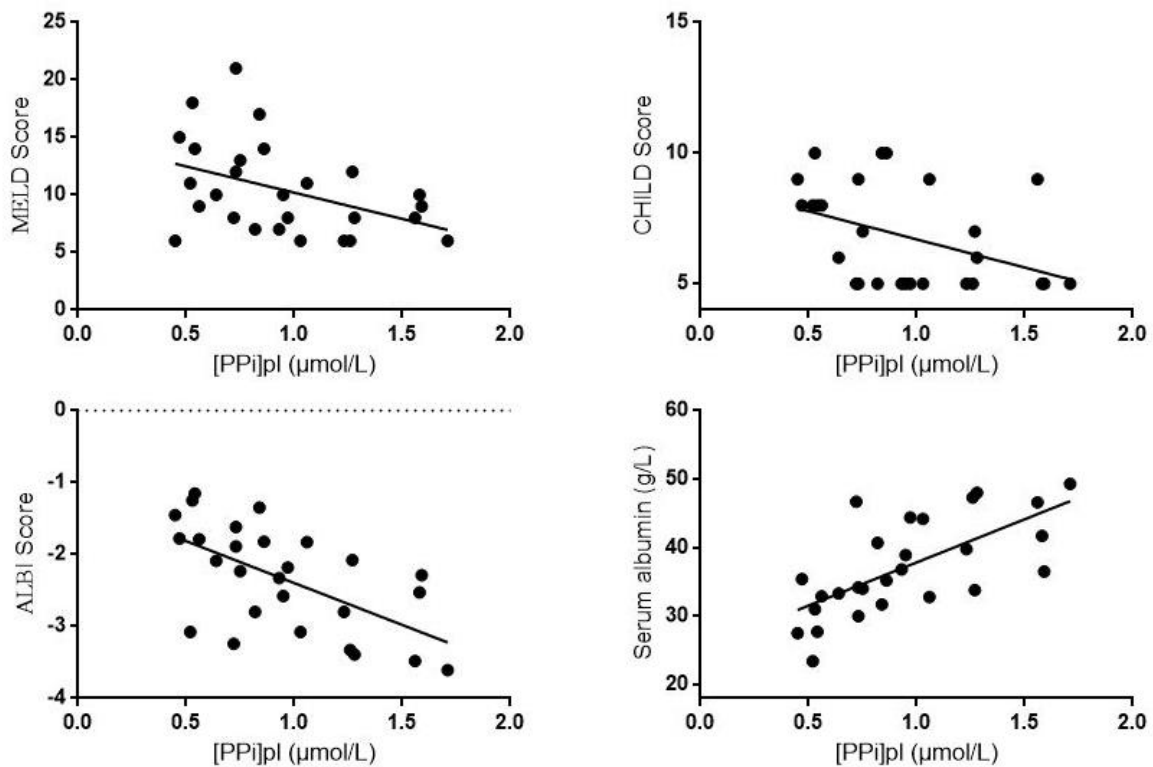


Legend: APRI and FIB-4 scores were calculated with variables measured at baseline. The correlations were assessed with the Spearman's test. (APRI : n=29, $r = -0.57$, $p=0.001$ and Fib4 n=29, $r=-0.47$, $p=0.007$)

2/ Low [PPI]pl levels associate with the most severe liver failure

Serum albumin correlated positively with [PPI]pl ($r=0.71$; $p<0.0001$) and ALBI, MELD and Child-Pugh scores correlated negatively with [PPI]pl (Fig 3).

Figure 3. Correlations between [PPI]pl and the indexes of liver failure



Legend: MELD, ALBI and Pugh-Child scores were calculated with variables measured at baseline. The correlations were assessed with the Spearman's test. (MELD Score $n=29$, $r=-0.56$, $p=0.002$, CHILD Score $n=29$, $r=-0.41$, $p=0.02$, ALBI score $n=29$, $r=-0.60$, $p=0.0005$; Serum albumin $n=29$, $r=0.67$, $p<0.0001$)

3/ LT completely restores plasma PPI levels.

The median [PPI]pl was significantly higher in LT recipients three months after LT than at baseline (1.40 [1.07-1.86] vs 0.68 [0.53-0.80] $\mu\text{mol/L}$, $p=0.0005$) (Table 1).

4/ PPI homeostasis is impaired in hepatocyte before LT.

The expression of genes directly related to PPI production were significantly downregulated in LT recipients as compared to controls: *ABCC6* (0.33 vs 1.06, $p=0.01$), *ENPP1* (0.19 vs 0.89, $p=0.001$). The mRNA levels of *ALPL* were unchanged (1.23 vs 0.89, $p=0.11$) whereas the expression of *NT5E* was significantly reduced (0.28 vs 0.74, $p=0.0002$) (Figure 4). We measured a higher plasma ALP activity in

LT candidates than in LT recipients (190 [87-321] vs 81 [65-158] UI/L, $p=0.05$) (Table 1). Plasma ALP activity negatively correlated with [PPI]pl at baseline ($r=-0.54$, $p=0.0003$), as expected (16).

Figure 4. A. mRNA levels of four genes regulating PPI homeostasis and of one gene related to fibrosis

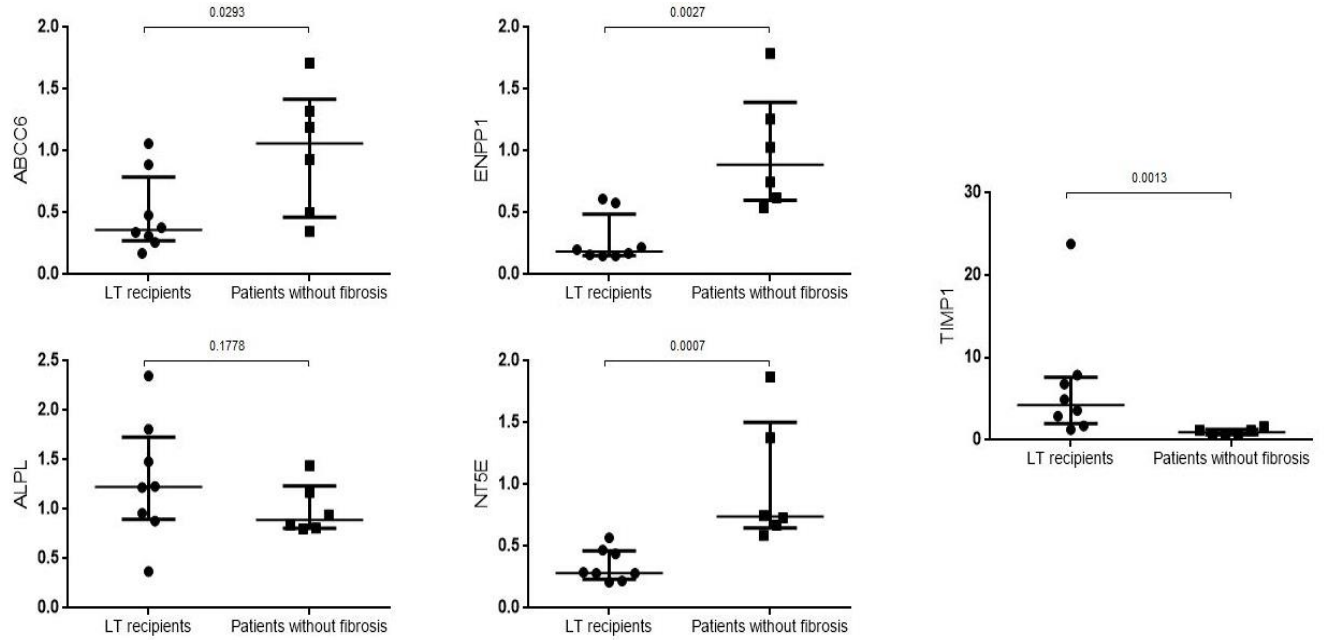
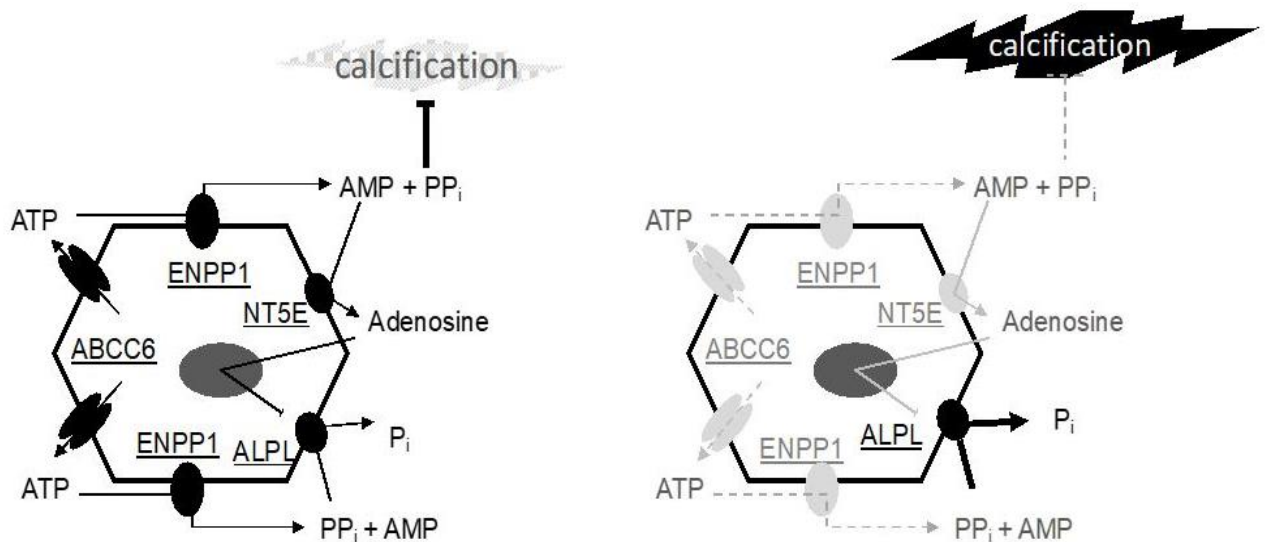


Figure 4. B. A schematic representation of PPI homeostasis in hepatocytes with respect to ectopic calcification



Legend

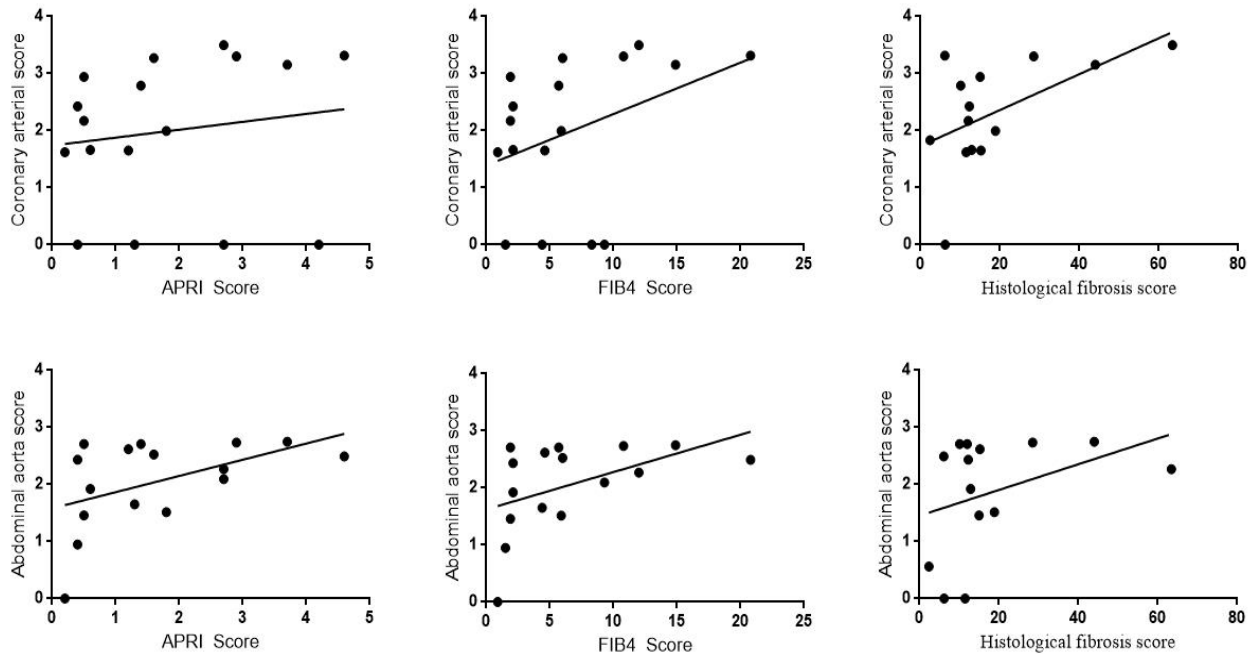
4.A: The figure shows the relative expression of genes directly involved in PPI homeostasis in the liver of LT candidates and controls. Specific gene expressions were normalized to the RPLP0 housekeeping gene. The results are shown as median \pm interquartiles 25-75.

4.B: The two diagrams are a representation of the relation between the PPI homeostasis in hepatocytes and arterial calcification. On the left panel (normal hepatocyte), PPI production and PPI hydrolysis are balanced and the development of arterial calcifications is prevented. PPI production is initiated by the cellular release of ATP by *ABCC6* which is then hydrolyzed by *ENPP1* into PPI and AMP. PPI levels depend on *NT5E*, which generates adenosine from AMP. Adenosine normally inhibits the expression of *ALPL* which encodes TNAP. In the right panel (hepatocyte in pathological liver), the decreased expression of *ABCC6* and *ENPP1* is consistent with the lower [PPI]_{pl} we observed. Furthermore, sustain elevated plasma ALP activity enhances the PPI deficit and promotes arterial calcification.

5/ High AC scores associate with the most severe liver fibrosis indexes

The AC scores measured in the coronary arteries and in the abdominal aorta positively correlated with the interstitial fibrosis and with APRI and FIB-4 indices (Figure 5). The AC score of aortic valves also positively correlated with FIB-4 ($r=0.40$, $p<0.05$) but there was no correlation with the interstitial fibrosis index ($r=0.40$, $p=0.064$), or the APRI score ($r=0.30$, $p=0.11$). Not surprisingly, coronary AC ($r=0.41$, $p=0.035$) and abdominal aorta AC ($r=0.44$, $p=0.03$) correlated with age.

Figure 5. Correlations between arterial calcification scores and liver fibrosis indices



Legend: Liver fibrosis scores were calculated with variables measured at baseline (platelet count, AST, ALT) and the interstitial fibrosis index was measured on Masson trichrome-stained liver biopsies. The AC scores were measured on CT scans according to Agatston and log transformed. The length of the abdominal aorta was used to divide the abdominal aorta calcification score. The correlations were assessed with the Spearman’s test. (Coronary arterial vs APRI : n=20, r=0.41, p=0.04 ; vs Fib 4 : n=20, r=0.58, p=0.009 ; vs histological fibrosis : n=16, r=0.51, p=0.002, and Abdominal aorta score vs APRI : n=20, r=0.68, p=0.04, vs Fib4 : n=20, r=0.67, p=0.002, vs histological fibrosis score : n=16, r=0.50, p=0.02)

5/ High AC scores correlated with the most severe liver failure

Abdominal aorta AC scores positively correlated with MELD score (r=0.46, p=0.042) and with ALBI score (r=0.53, p=0.016). Aortic valve calcifications negatively correlated with albumin (r=- 0.51, p=0.021) and positively with Pugh-Child score (r=0.57, p=0.008). AC, irrespective of its localization, and liver failure indices showed no significant correlation (data not shown). Finally, there were no

correlation between [PPi]pl and coronary AC scores ($r=-0.06$, $p=0.40$), or between [PPi]pl and abdominal aorta AC scores ($r=-0.23$, $p=0.17$).

DISCUSSION

Liver cirrhosis with liver failure of any grade is associated with a deficit in plasma PPI which is the result of a significant reduction in the genes expression levels of key regulators of PPI synthesis in the liver *i.e.* *ABCC6* and *ENPP1* concomitant to enhanced degradation via TNAP. We found that LT restores [PPi]pl 3 months post-surgery to within physiological range (16, 31). This is likely due to the normalization of the expression levels of *ABCC6*, *ENPP1*, *NT5E* and *ALPL* in the newly and healthy transplanted livers. The central role of the liver in regulating plasma PPI was demonstrated in animal studies. In liver perfusion experiments, Jansen *et al.* and Li *et al.* showed that this tissue produces the bulk of circulating PPI in mouse and rat respectively (14, 32). Furthermore, plasma PPI levels are reduced in liver perfusates of *Abcc6*^{-/-} mice as compared to wild-type controls and the transient expression of the human *ABCC6* protein in liver restores PPI concentration in liver perfusate to near normal levels (25). Furthermore, the liver-specific inactivation of *Abcc6* reduces plasma PPI levels which can be further decreased by the combined inactivation of *Enpp1* (17). Our results with human LT patients are clearly consistent with these previously published data in animal models and confirm the intimate role played by *ABCC6*→*ENPP1*→*NT5E*-TNAP pathway in regulating plasma PPI homeostasis. Although we observed no significant variation in the expression of *ALPL* in diseased livers vs controls in the limited number of samples we had access to, plasma ALP activity was abnormally elevated in LT candidates. ALP activity was significantly reduced 3 months post-surgery (Table 1) which is consistent with a restoration of adenosine production via *NT5E* in liver and other tissues (figure 4. B) (25, 33). Indeed, TNAP regulates ectopic calcification not only from liver but also from many other tissues (34-36).

Until now, ectopic calcification only in coronary arteries has been documented in patients with liver disease (5-7). In this study, we not only confirmed the presence of AC in the coronary arteries of patients with liver fibrosis but we found that calcification also affected the abdominal aorta and aortic valves (Fig 5). CT-scans didn't provide enough resolution to distinguish whether AC affected the medial or intimal layers of the arteries. However, the calcification of coronary arteries is usually found in the intima layers and is related to atherosclerosis and ischemic cardiopathy. In our cohort, we found that coronary AC were not associated with ischemic cardiopathy (data not shown) therefore it is safe to assume that calcification primarily affected the media. Similarly, in patients on maintenance hemodialysis (HD) severity of ischemic cardiopathy, as determined by coronary artery stenosis, is not associated with coronary AC scores (37). In contrast, medial calcification is the hallmark of age and is significantly more pronounced in patients with TD2 or in patients on maintenance HD (38-40). Although the pathomechanism leading is not fully known an imbalance between pro-and anti-calcifying factors, especially PPI, is strongly suspected (40, 41). Unlike vascular mineralization, aortic valve calcification mainly occurs on degenerative valves and depends on mechanic factors such as arterial hypertension. In our study we found that the pattern of ectopic calcification in LT candidates mimic the observations in patients on maintenance HD (42, 43). These similarities argue for a key role of one or several circulating compound(s) in the formation of AC, probably with PPI as the main contributor (16, 44, 45).

Despite different causes of liver diseases in our patients, we observe a homogeneous calcification pattern, suggesting that liver fibrosis and/or liver failure associated with the dysregulation of genes involved in PPI homeostatis are the main driver for AC. The role of liver fibrosis was pointed to in the literature, as shown studies between cardiovascular mortality and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in the national health and nutrition examination survey III (NHANES III). In this representative population of the USA, the association between NAFLD and the occurrence of cardiovascular events with 14 years follow-up remained controversial (46, 47) and NAFLD was not associated with an increased risk of cardiovascular death (46). However, in this

population, a high APRI index raised the hazard ratio for cardiovascular mortality to 2.53 and a high FIB-4 index elevated the hazard ratio to 2.68, compared to the patients with low fibrosis scores (48). An association between AC and hepatic steatosis was found in larger cohorts of patients. In a much larger cohort than NHANES III, involving 10,308 patients with ultrasonographic detection of hepatic steatosis, the odd ratio for the presence of coronary AC was elevated in patients with alcoholic fatty liver disease (AFLD) or NAFLD as compared to patients without hepatic steatosis, with or without excessive alcoholic consumption (49). Conversely, in patients with ischemic cardiopathy without liver fibrosis index assessment, the coronary AC scores raised with the prevalence of NAFLD (50).

In this work, we were able to show an association between liver fibrosis and AC in a small cohort of patients with a high fibrosis score (Figure 5). Similar associations between non-invasive fibrosis indexes and AC were described in larger cohorts of 81, 94 or 142 patients respectively (5-7). In one of these cohorts, patients had a lower FIB-4 index (2.09) (6) than our patients. Further, a large meta-analysis regarding the association of impaired liver function tests with AC among 1.23 million participants from diverse populations showed that one standard deviation in plasma ALP activity toward the higher values increased the risk of AC by up to 8%, whereas one standard deviation in GGT toward the higher values increased the risk of AC to 23% (10). In light of these data, one may speculate a progressive effect of liver fibrosis and/or of liver function impairment on the development of AC.

The strength of our study is in the comparison of the plasma levels of PPI before and after LT, in the molecular analysis of genes involved in PPI homeostasis, in the measurement of fibrosis score on liver biopsies and in the various localizations of AC (coronary and abdominal arteries, aortic valves). However, here are some limitations to our interpretations. We find no association between baseline [PPI]pl and interstitial fibrosis scores, whereas there is an association between baseline [PPI]pl and non-invasive fibrosis scores. This is probably due to the limited number of liver biopsies we had access to, to determine interstitial fibrosis scores, as compared to with blood tests for the

measure of the non-invasive fibrosis scores (16 vs 29 patients, respectively, Figure 1). We found no association between AC and [PPi]pl, most likely because the development of AC is a slow and progressive process spanning decades, whereas our study was limited to 3 months post-surgery. Therefore, longer longitudinal studies would be needed to determine the progression of AC in relation to [PPi]pl levels. However, one considers that the restoration of [PPi]pl does not lead to a decrease in existing calcification in animal models (23, 51). Furthermore, the small number of patients did not allow for adjustments for known confounding factors influencing AC, such type 2 diabetes or age. In addition, control patients without liver disease could not be sex- and age-matched with LT recipients. Finally, we were not able to perform immunohistology analysis on liver samples.

In conclusion, we showed that liver diseases promote AC in several arterial beds via the dysregulation of key proteins involved in the production and degradation of plasma PPi, and that liver transplantation normalized these parameters.

Financial support statement

This work was sponsored by the "Centre Hospitalier Universitaire de Nice" (Nice University Hospital) for regulatory and ethics approval. This work was supported by a grant from the Delegation of Clinical Research and the Innovation of University Hospital of Nice "2018", by grants from INSERM (France), and charities (Association Française pour l'Etude du Foie). This work was also funded by the French Government (National Research Agency, ANR): #ANR-18-CE14-0019-02, #ANR-19-CE14-0044-01 and through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE (#ANR-11-LABX-0028-01) and the UCA^{JEDI} Investments in the Future project (#ANR-15-IDEX-01). Financial support to OLS came from National Institutes of Health P20GM113134.

Acknowledgments

We are grateful for the patient kind participation and to Ms Marie-Pierre Gilly for her skilled management of the study.

References

1. Budoff MJ, Shaw LJ, Liu ST, et al. Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:1860-70.
2. Zorzi A, Brunetti G, Cardaioli F, et al. Coronary artery calcium on standard chest computed tomography predicts cardiovascular events after liver transplantation. *Int J Cardiol* 2021;339:219-224.
3. Durham AL, Speer MY, Scatena M, et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovasc Res* 2018;114:590-600.
4. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, et al. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:827-32.
5. Dogan S, Celikbilek M, Yilmaz YK, et al. Association between liver fibrosis and coronary heart disease risk in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015;27:298-304.
6. Ishiba H, Sumida Y, Kataoka S, et al. Association of coronary artery calcification with liver fibrosis in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2016;46:1107-1117.
7. You SC, Kim KJ, Kim SU, et al. Hepatic fibrosis assessed using transient elastography independently associated with coronary artery calcification. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30:1536-42.
8. Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med* 2019;65:37-55.
9. Narayanan S. Serum alkaline phosphatase isoenzymes as markers of liver disease. *Ann Clin Lab Sci* 1991;21:12-8.
10. Kunutsor SK, Apekey TA, Khan H. Liver enzymes and risk of cardiovascular disease in the

- general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Atherosclerosis* 2014;236:7-17.
11. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. *Lancet* 2014;383:1749-61.
 12. Meex RCR, Watt MJ. Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:509-520.
 13. Monseu M, Dubois S, Boursier J, et al. Osteoprotegerin levels are associated with liver fat and liver markers in dysmetabolic adults. *Diabetes Metab* 2016;42:364-367.
 14. Jansen RS, Duijst S, Mahakena S, et al. ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:1985-9.
 15. Dedinszki D, Szeri F, Kozak E, et al. Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol Med* 2017.
 16. Laurain A, Rubera I, Durantou C, et al. Alkaline Phosphatases Account for Low Plasma Levels of Inorganic Pyrophosphate in Chronic Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:586831.
 17. Zhao J, Kingman J, Sundberg JP, et al. Plasma PPI Deficiency is the Major, But Not the Exclusive, Cause of Ectopic Mineralization in an *Abcc6*^{-/-} Mouse Model of PXE. *J Invest Dermatol* 2017.
 18. Favre G, Laurain A, Aranyi T, et al. The ABCC6 Transporter: A New Player in Biomineralization. *Int J Mol Sci* 2017;18.
 19. Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, et al. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:228-31.
 20. Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, et al. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000;25:223-7.
 21. Ringpfeil F, Lebwohl MG, Christiano AM, et al. Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6001-6.
 22. Jansen RS, Kucukosmanoglu A, de Haas M, et al. ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:20206-11.
 23. Beck K, Hayashi K, Dang K, et al. Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 2005;123:517-28.
 24. Belli SI, van Driel IR, Goding JW. Identification and characterization of a soluble form of the plasma cell membrane glycoprotein PC-1 (5'-nucleotide phosphodiesterase). *Eur J Biochem* 1993;217:421-8.
 25. Pomozi V, Brampton C, van de Wetering K, et al. Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice. *Am J Pathol* 2017;187:1258-1272.
 26. Back M, Aranyi T, Cancela ML, et al. Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement From the COST Action EuroSoftCalcNet. *Front Cardiovasc Med* 2018;5:196.
 27. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2017;67:328-338.
 28. Bekri S, Gual P, Anty R, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH. *Gastroenterology* 2006;131:788-96.
 29. Anty R, Bekri S, Luciani N, et al. The inflammatory C-reactive protein is increased in both liver and adipose tissue in severely obese patients independently from metabolic syndrome, Type 2 diabetes, and NASH. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1824-33.
 30. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
 31. Legrand A, Pujol C, Durand CM, et al. Pseudoxanthoma elasticum overlaps hereditary spastic paraplegia type 56. *J Intern Med* 2021;289:709-725.
 32. Li Q, Kingman J, van de Wetering K, et al. *Abcc6* knockout rat model highlights the role of liver in PPI homeostasis in pseudoxanthoma elasticum. *J Invest Dermatol* 2017;137:1025-1032.
 33. Miglionico R, Armentano MF, Carosino M, et al. Dysregulation of gene expression in ABCC6

knockdown HepG2 cells. *Cell Mol Biol Lett* 2014;19:517-26.

34. Sanchez-Tevar AM, Garcia-Fernandez M, Murcia-Casas B, et al. Plasma inorganic pyrophosphate and alkaline phosphatase in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Ann Transl Med* 2019;7:798.
35. Savinov AY, Salehi M, Yadav MC, et al. Transgenic Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Vascular Endothelium Results in Generalized Arterial Calcification. *J Am Heart Assoc* 2015;4.
36. Brichacek AL, Benkovic SA, Chakraborty S, et al. Systemic inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase alters the brain-immune axis in experimental sepsis. *Sci Rep* 2019;9:18788.
37. Sharples EJ, Pereira D, Summers S, et al. Coronary artery calcification measured with electron-beam computerized tomography correlates poorly with coronary artery angiography in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2004;43:313-9.
38. Kauppila LI, Polak JF, Cupples LA, et al. New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* 1997;132:245-50.
39. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, et al. Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1731-40.
40. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, et al. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:525-31.
41. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, et al. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta* 2015;438:401-14.
42. Braun J, Oldendorf M, Moshage W, et al. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996;27:394-401.
43. London GM, Pannier B, Marchais SJ, et al. Calcification of the aortic valve in the dialyzed patient. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:778-783.
44. Lomashvili KA, Khawandi W, O'Neill WC. Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2495-500.
45. O'Neill WC, Sigrist MK, McIntyre CW. Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:187-91.
46. Stepanova M, Younossi ZM. Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:646-50.
47. Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ* 2011;343:d6891.
48. Kim D, Kim WR, Kim HJ, et al. Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology* 2013;57:1357-65.
49. Chang Y, Ryu S, Sung KC, et al. Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease and associations with coronary artery calcification: evidence from the Kangbuk Samsung Health Study. *Gut* 2019;68:1667-1675.
50. Chen CH, Nien CK, Yang CC, et al. Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery calcification. *Dig Dis Sci* 2010;55:1752-60.
51. Li Q, Sundberg JP, Levine MA, et al. The effects of bisphosphonates on ectopic soft tissue mineralization caused by mutations in the ABCC6 gene. *Cell Cycle* 2015;14:1082-9.

4. Principaux résultats, discussion et perspectives

Notre étude est la première étude révélant une diminution des concentrations plasmatiques en PPI chez l'Homme en lien avec l'intensité de la fibrose et de l'insuffisance hépatique en rapport avec une diminution de l'expression des principaux régulateurs de l'homéostasie du PPI.

Nous démontrons que le foie est une des principales sources de PPI chez l'homme puisque la restauration d'une fonction hépatique normale par la transplantation hépatique permet de corriger le déficit plasmatique en PPI observé avant la transplantation et ce dès 3 mois après la transplantation. Cette diminution des concentrations plasmatiques en PPI est liée à une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la production de PPI tels que *ABCC6*, *ENPP1* et *NT5* sur les foies atteints de fibrose à des degrés variables associées à une augmentation de l'hydrolyse du PPI par l'activité des PAL totales. En effet, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre l'activité des PAL et les concentrations en PPI avant la transplantation hépatique. L'activité des PAL peut être augmentée chez les patients en attente de transplantation hépatique et elle est positivement corrélée aux événements cardiovasculaires chez ces patients (Kunutsor et al., 2014). L'excrétion rénale de PPI quant à elle n'explique pas sa concentration plasmatique.

La fibrose hépatique est un facteur de risque d'évènement cardiovasculaire, et la littérature décrit bien le lien entre les calcifications coronaires et la fibrose hépatique (Kim et al., 2012). Le score calcique coronaire est le plus utilisé en routine pour prédire le risque cardiovasculaire, et témoigne généralement d'une atteinte initiale en lien avec l'athérosclérose mais peu d'études sont disponibles sur les calcifications de l'axe aortique, notamment abdominale, au cours de la fibrose hépatique. Dans notre étude, nous avons confirmé la présence de calcification artérielle coronaire par coroscanner, sans retrouver d'association à la cardiopathie ischémique, et nous avons constaté que la calcification touchait également l'aorte abdominale et les valves aortiques chez les patients atteints de fibrose hépatique. L'évaluation de la calcification artérielle de l'aorte abdominale apporte des informations complémentaires, en effet l'augmentation des calcifications aortiques abdominales est corrélée au risque d'évènements cardiovasculaires, de complications rénales, de diabètes ou de cancer après la transplantation hépatique (Imaoka et al., 2019). Nos résultats confortent ceux obtenus dans les études précédentes au cours de la NAFLD, avec une

augmentation des calcifications coronaires et aortiques chez les patients atteints de fibrose ou d'insuffisance hépatique, considérés à haut risque cardiovasculaire (Mellinger et al., 2015; Song et al., 2019). Nous avons mis en évidence une corrélation positive entre le degré de fibrose interstitielle par une mesure histologique et les scores de calcification artérielle aussi bien coronaire qu'aortique.

Nous avons mis en évidence une corrélation négative entre les concentrations plasmatiques en PPI et les scores de fibrose non invasive, sans mettre en évidence de corrélation avec les scores de fibrose interstitielle. Ceci peut s'expliquer par un manque de puissance avec un plus faible nombre de biopsie hépatique disponible (n=16) par rapport aux mesures de score de fibrose réalisés (n=29). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les concentrations plasmatiques en PPI et les calcifications artérielles, ceci peut s'expliquer par la cinétique lente d'évolution des calcifications artérielles. La durée de notre étude de 3 mois n'est pas compatible avec le suivi dans le temps de l'évolution des calcifications artérielles et du nombre d'évènements cardiovasculaires en fonction des concentrations plasmatiques en PPI, et la mise au point de l'étude ne nous permettait pas de prendre en compte les autres facteurs de calcification artérielle tels que le diabète ou l'âge. A notre connaissance, une seule étude a mis en évidence une relation positive entre le degré du score calcique coronaire avant transplantation hépatique et l'augmentation du nombre d'évènement cardiovasculaire dans l'année suivant la transplantation (Zorzi et al., 2021). Cependant, il est possible que restaurer les concentrations plasmatiques en PPI n'entraîne pas nécessairement une régression des calcifications pré existantes (Li et al., 2015).

D'autres études à plus grande échelle sont nécessaires pour préciser le rôle du foie et du PPI dans l'apparition et le développement des calcifications artérielles au cours de la fibrose et de la cirrhose hépatique dans un but de compréhension et de prévention des calcifications artérielles au cours de ces maladies procalcifiantes.

V. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les calcifications artérielles sont associées à la morbidité cardiovasculaire dans la population générale et au cours des maladies calcifiantes monogéniques ou acquises. Le déséquilibre entre les facteurs pro et anticalcifians favorise la formation et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite et les calcifications (Bäck et al., 2018). Le transporteur *ABCC6*, dont l'expression est principalement hépatique et rénale, contrôle les niveaux plasmatiques du PPI, agent anticalcifiant, et pourrait jouer un rôle central dans la calcification artérielle (revue cosignée en 2017, [Favre et al., 2017](#)).

La mise au point d'un dosage du PPI standardisé a fait partie intégrante de la première étape de ma thèse, ce travail fait l'objet d'une demande de brevet. Nous avons donc pu étudier l'homéostasie du PPI au cours de la maladie rénale chronique, de la fibrose et de l'insuffisance hépatique. Pour la première fois, à notre connaissance, le PPI a été dosé chez l'Homme avant et après transplantation rénale et hépatique.

Nous avons montré que les concentrations plasmatiques en PPI sont abaissées au cours de ces deux maladies calcifiantes acquises et que la transplantation d'organe permet d'améliorer voir de restaurer totalement le déficit plasmatique en PPI. En effet, la transplantation rénale améliore les concentrations plasmatiques en PPI sans pour autant les normaliser (Laurain et al., 2020), et la littérature décrit l'évolution des calcifications artérielles chez l'Homme plus lente après transplantation rénale en comparaison à la dialyse sans pour autant les faire régresser (Alappan et al., 2020; Mazzaferro et al., 2009). Alors que la transplantation hépatique restaure complètement les concentrations plasmatiques en PPI démontrant que le foie est donc un des principaux organes de la production de PPI chez l'Homme. De plus nous confirmons que la diminution des concentrations en PPI au cours des maladies calcifiantes acquises est liée à l'augmentation de son hydrolyse par l'activité des PAL. Nous n'avons pas mis en évidence de variation de l'activité enzymatique d'*ENPP1*, ni d'augmentation de l'élimination rénale de PPI au cours de ces deux maladies. Cependant, nous avons observé une baisse de l'expression des ARNm d'*ENPP1* et d'*ABCC6* au cours de la fibrose et de l'insuffisance hépatique sur les explants de foie malades mais cette donnée n'a pas pu être explorée au cours de la maladie rénale chronique. Il reste important de pouvoir différencier l'activité locale tissulaire et systémique des enzymes impliqués dans le système purinergique par d'autres études. Nous avons donc mis en place des études avec des modèles murins de souris atteintes de maladie

rénale (ANR 2021 – Collaboration E. Letavernier) et des études longitudinales de plus grandes échelles chez l'Homme (PHRC PREDICAL) pour expliquer plus précisément ces mécanismes et répondre à ces interrogations.

L'objectif d'augmenter les concentrations plasmatiques en PPi au cours de la maladie rénale et de la fibrose hépatique est intéressant pour influencer l'évolution et l'apparition des calcifications artérielles et leurs conséquences cardiovasculaires. En effet, la restauration des concentrations plasmatique en PPi n'est pas un facteur formellement déterminant de la régression des calcifications artérielles (Li et al., 2015).

Nos résultats impliquent de déterminer 1/ le bénéfice de la régression des calcifications ou du ralentissement de la progression des calcifications artérielles sur la mortalité cardiovasculaire et que celles-ci ne soient pas juste un reflet des anomalies physiopathologiques induites par les calcifications et le retentissement qui en découle, et de 2/ Prouver que la variation de concentration plasmatique en PPi entraîne une conséquence directe sur l'apparition des calcifications artérielles chez l'homme.

L'apport exogène de PPi dans le cadre de la maladie rénale chronique, de la fibrose ou de l'insuffisance hépatique est une approche envisageable pour corriger partiellement ou complètement le déficit plasmatique en PPi du fait de son faible coût et de son efficacité, tel que c'est actuellement suggéré et testé au cours du PXE. Quelques études ont rapporté l'efficacité de l'administration intrapéritonéale du PPi sur les calcifications artérielles dans le cadre de la maladie rénale sur des modèles murins (de Oliveira et al., 2015; O'Neill et al., 2011; Riser et al., 2011), et le PPi semble être biodisponible per os contrairement à ce que l'on pensait (Dedinszki et al., 2017). Cependant l'apport de PPi dans le cadre de la maladie rénale n'a jamais été testé chez l'homme, et il est important de prendre en compte les potentielles modifications phosphocalciques induites par l'administration exogène de PPi et son hydrolyse en Pi par les PAL, dont les concentrations sont déjà élevées au cours de la maladie rénale. Le PHRC « PROPHECI » va nous permettre d'étudier l'administration exogène per os de PPi chez l'Homme au cours du PXE et ses conséquences biologiques et cardiovasculaires.

Une autre option pourrait être l'administration d'analogues stables du PPi tels que les biphosphonates mais nous manquons de données chez l'Homme au cours de la MRC (Lomashvili et al., 2009; Toussaint et al., 2009). Quelques études ont été réalisées au stade IV et V de la MRC, chez les patients les plus

concernés par l'ostéodystrophie rénale et les effets secondaires sur l'os sont non négligeables d'autant plus en cas d'ostéopathie adynamique (Damasiewicz and Nickolas, 2020). L'étude réalisée sur la cohorte MESA évaluant le retentissement cardiovasculaire de l'administration de biphosphonates chez la femme en générale a mis en évidence une amélioration des calcifications après l'âge de 65ans mais un sur risque de calcifications artérielles chez les jeunes (Elmariah et al., 2010). Les biphosphonates ont été testés au cours du PXE et semblent avoir un effet bénéfique relatif sur la minéralisation sans permettre de faire régresser les lésions artérielles pré existantes en dehors de la néovascularisation rétinienne (Kranenburg et al., 2018). Ces résultats appuient sur l'importance du maintien du dialogue entre l'os et le vaisseau, et l'équilibre de celui-ci. Les doses de biphosphonates actuellement utilisées pour une efficacité sur la minéralisation ne semblent pas être suffisantes pour exercer un effet anticalcifiant sur les calcifications artérielles (Hildebrand and Cunningham, 2021).

Nous avons confirmé que l'hydrolyse du PPi par l'activité des PAL est un déterminant majeur des concentrations en PPi au cours de ces deux maladies calcifiantes. Basée sur cette conclusion, le contrôle des concentrations plasmatiques en PPi par l'intermédiaire de l'inhibition des PAL serait un modèle thérapeutique de prévention cardiovasculaire intéressant au cours de ces maladies calcifiantes acquises. Les iTNAP semblent avoir déjà bien démontré leur efficacité sur la calcification artérielle dans le cadre de la maladie rénale ou du PXE sur des modèles murins (Li et al., 2019; Tani et al., 2020). En effet, l'administration d'iTNAP *in vitro* diminue les concentrations en PPi dans un milieu de VSMC en culture et diminue la calcification de cellule Abcc6 -/- comme dans des modèles murins ABCC6 KO ((Narisawa et al., 2007; Ziegler et al., 2017). L'iTNAP sous forme orale a pu être évalué sur des modèles murins de rats atteint de MRC induite ou de calcifications artérielles favorisées par l'administration de Warfarine, les résultats mettent en évidence baisse de la médiacalcose sans altération de la minéralisation osseuse (Opdebeeck et al., 2020; Tani et al., 2020), mais des études supplémentaires sont nécessaires pour établir le rôle des iTNAP sur la progression et /ou la régression des calcifications artérielles associées à l'atteinte osseuse au cours de la MRC. L'administration concomitante de PPi et d'iTNAP pourrait aussi être un axe thérapeutique de choix dans les maladies calcifiantes concernées par une élévation de l'activité des PAL.

En conclusion, la standardisation de la méthode de dosage du PPi a été nécessaire pour étudier l'homéostasie du PPi à plus grande échelle en physiologie et en thérapeutique par notre laboratoire. Le

foie est un organe prépondérant dans l'équilibre des concentrations plasmatiques en PPI chez l'Homme, et une fonction rénale normale participe à l'homéostasie du PPI. Les perspectives à venir vont concerner l'évolution naturelle des calcifications artérielles dans le cadre de pathologies calcifiantes acquises dès le stade précoce de la maladie, et le lien avec les concentrations plasmatiques en PPI pour pouvoir cibler les possibilités de prévention et d'intervention thérapeutique pour prévenir la morbidité cardiovasculaire chez l'homme avec des facteurs de risque cardiovasculaire.

VI. Références

- Abramowitz, M., Muntner, P., Coco, M., Southern, W., Lotwin, I., Hostetter, T.H., and Melamed, M.L. (2010). Serum alkaline phosphatase and phosphate and risk of mortality and hospitalization. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *5*, 1064–1071.
- Addison, W.N., Azari, F., Sørensen, E.S., Kaartinen, M.T., and McKee, M.D. (2007). Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *J. Biol. Chem.* *282*, 15872–15883.
- Alappan, H.R., Vasanth, P., Manzoor, S., and O'Neill, W.C. (2020). Vascular Calcification Slows But Does Not Regress After Kidney Transplantation. *Kidney Int. Rep.* *5*, 2212–2217.
- Albright, R.A., Stabach, P., Cao, W., Kavanagh, D., Mullen, I., Braddock, A.A., Covo, M.S., Tehan, M., Yang, G., Cheng, Z., et al. (2015). ENPP1-Fc prevents mortality and vascular calcifications in rodent model of generalized arterial calcification of infancy. *Nat. Commun.* *6*, 10006.
- Alvaro, D., Benedetti, A., Marucci, L., Delle Monache, M., Monterubbianesi, R., Di Cosimo, E., Perego, L., Macarri, G., Glaser, S., Le Sage, G., et al. (2000). The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. *Hepatology* *32*, 174–184.
- Anand, D.V., Lim, E., Darko, D., Bassett, P., Hopkins, D., Lipkin, D., Corder, R., and Lahiri, A. (2007). Determinants of progression of coronary artery calcification in type 2 diabetes: role of glycemic control and inflammatory/vascular calcification markers. *J. Am. Coll. Cardiol.* *50*, 2218–2225.
- Anderson, H.C., Harmey, D., Camacho, N.P., Garimella, R., Sipe, J.B., Tague, S., Bi, X., Johnson, K., Terkeltaub, R., and Millán, J.L. (2005). Sustained osteomalacia of long bones despite major improvement in other hypophosphatasia-related mineral deficits in tissue nonspecific alkaline phosphatase/nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 double-deficient mice. *Am. J. Pathol.* *166*, 1711–1720.
- Azpiazu, D., González-Parra, E., Egido, J., and Villa-Bellosta, R. (2018). Hydrolysis of Extracellular Pyrophosphate increases in post-hemodialysis plasma. *Sci. Rep.* *8*, 11089.
- Bäck, M., Aranyi, T., Cancela, M.L., Carracedo, M., Conceição, N., Leftheriotis, G., Macrae, V., Martin, L., Nitschke, Y., Pasch, A., et al. (2018). Endogenous Calcification Inhibitors in the Prevention of Vascular Calcification: A Consensus Statement From the COST Action EuroSoftCalcNet. *Front. Cardiovasc. Med.* *5*, 196.
- Bai, W., Li, J., and Liu, J. (2016). Serum phosphorus, cardiovascular and all-cause mortality in the general population: A meta-analysis. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *461*, 76–82.
- Barenbrock, M., Spieker, C., Hausberg, M., Kisters, K., Kosch, M., and Rahn, K.H. (1998). J005: Relationship between parathormone levels and arterial distensibility in renal transplant recipients. *Am. J. Hypertens.* *11*, 178A.
- Baron, R. (2001). L'ostéoclaste et les mécanismes moléculaires de la résorption osseuse. *médecine/sciences* *17*, 1260–1269.
- Bastos Gonçalves, F., Voûte, M.T., Hoeks, S.E., Chonchol, M.B., Boersma, E.E., Stolker, R.J., and Verhagen, H.J.M. (2012). Calcification of the abdominal aorta as an independent predictor of cardiovascular events: a meta-analysis. *Heart Br. Card. Soc.* *98*, 988–994.
- Beddhu, S., Ma, X., Baird, B., Cheung, A.K., and Greene, T. (2009). Serum alkaline phosphatase and mortality in African Americans with chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *4*, 1805–1810.

- Bellasi, A., and Raggi, P. (2012). Vascular imaging in chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *21*, 382–388.
- Benetos, A., Rudnichi, A., Safar, M., and Guize, L. (1998). Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertens. Dallas Tex* *1979* *32*, 560–564.
- Blacher, J., Guerin, A.P., Pannier, B., Marchais, S.J., Safar, M.E., and London, G.M. (1999). Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation* *99*, 2434–2439.
- Blaser, M.C., and Aikawa, E. (2018). Roles and Regulation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Mineral Metabolism. *Front. Cardiovasc. Med.* *5*, 187.
- Bonewald, L.F. (2011). The Amazing Osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* *26*, 229–238.
- Borst, P., Váradi, A., and van de Wetering, K. (2019). PXE, a Mysterious Inborn Error Clarified. *Trends Biochem. Sci.* *44*, 125–140.
- Bostom, A., Pasch, A., Madsen, T., Roberts, M.B., Franceschini, N., Steubl, D., Garimella, P.S., Ix, J.H., Tuttle, K.R., Ivanova, A., et al. (2018). Serum Calcification Propensity and Fetuin-A: Biomarkers of Cardiovascular Disease in Kidney Transplant Recipients. *Am. J. Nephrol.* *48*, 21–31.
- Boutouyrie, P., and Laurent, S. (2004). Remodelling of large and small arteries in hypertension. *Sang Thromb. Vaiss.* *16*, 81–89.
- Brampton, C., Yamaguchi, Y., Vanakker, O., Laer, L.V., Chen, L.-H., Thakore, M., De Paepe, A., Pomozi, V., Szabó, P.T., Martin, L., et al. (2011). Vitamin K does not prevent soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum. *Cell Cycle* *10*, 1810–1820.
- Braun, J., Oldendorf, M., Moshage, W., Heidler, R., Zeitler, E., and Luft, F.C. (1996). Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *27*, 394–401.
- Brown, A.J., Dusso, A., Lopez-Hilker, S., Lewis-Finch, J., Grooms, P., and Slatopolsky, E. (1989). 1,25-(OH)₂D receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs. *Kidney Int.* *35*, 19–23.
- Brück, K., Stel, V.S., Gambaro, G., Hallan, S., Völzke, H., Ärnlöv, J., Kastarinen, M., Guessous, I., Vinhas, J., Stengel, B., et al. (2016). CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *27*, 2135–2147.
- Budoff, M.J., Shaw, L.J., Liu, S.T., Weinstein, S.R., Mosler, T.P., Tseng, P.H., Flores, F.R., Callister, T.Q., Raggi, P., and Berman, D.S. (2007). Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J. Am. Coll. Cardiol.* *49*, 1860–1870.
- Budoff, M.J., Rader, D.J., Reilly, M.P., Mohler, E.R., Lash, J., Yang, W., Rosen, L., Glenn, M., Teal, V., Feldman, H.I., et al. (2011). Relationship of estimated GFR and coronary artery calcification in the CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* *58*, 519–526.
- Byon, C.H., Sun, Y., Chen, J., Yuan, K., Mao, X., Heath, J.M., Anderson, P.G., Tintut, Y., Demer, L.L., Wang, D., et al. (2011). Runx2-upregulated receptor activator of nuclear factor κ B ligand in calcifying smooth muscle cells promotes migration and osteoclastic differentiation of macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 1387–1396.
- Byrne, C.D., and Targher, G. (2015). NAFLD: a multisystem disease. *J. Hepatol.* *62*, S47-64.
- Cai, M.M.X., Smith, E.R., and Holt, S.G. (2015). The role of fetuin-A in mineral trafficking and deposition. *BoneKEY Rep.* *4*, 672.

- Cancela, M.L., Laizé, V., Conceição, N., Kempf, H., and Murshed, M. (2021). Keutel Syndrome, a Review of 50 Years of Literature. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 802.
- Carney, E.F. (2020). The impact of chronic kidney disease on global health. *Nat. Rev. Nephrol.* *16*, 251–251.
- Carracedo, M., and Bäck, M. (2018). Fetuin A in aortic stenosis and valve calcification: Not crystal clear. *Int. J. Cardiol.* *265*, 77–78.
- Chen, C.-C., Hsu, W.-C., Wu, H.-M., Wang, J.-Y., Yang, P.-Y., and Lin, I.-C. (2021). Association between the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and the Risk of Coronary Artery Calcification. *Medicina (Mex.)* *57*, 807.
- Chiu, Y.-W., Adler, S.G., Budoff, M.J., Takasu, J., Ashai, J., and Mehrotra, R. (2010). Coronary artery calcification and mortality in diabetic patients with proteinuria. *Kidney Int.* *77*, 1107–1114.
- Cholongitas, E., Papatheodoridis, G.V., Vangelis, M., Terreni, N., Patch, D., and Burroughs, A.K. (2005). Systematic review: The model for end-stage liver disease--should it replace Child-Pugh's classification for assessing prognosis in cirrhosis? *Aliment. Pharmacol. Ther.* *22*, 1079–1089.
- Cummings, S.R., Black, D.M., Nevitt, M.C., Browner, W., Cauley, J., Ensrud, K., Genant, H.K., Palermo, L., Scott, J., and Vogt, T.M. (1993). Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet Lond. Engl.* *341*, 72–75.
- Damasiewicz, M.J., and Nickolas, T.L. (2020). Bisphosphonate therapy in CKD: the current state of affairs. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *29*, 221–226.
- Damera, S., Raphael, K.L., Baird, B.C., Cheung, A.K., Greene, T., and Beddhu, S. (2011). Serum alkaline phosphatase levels associate with elevated serum C-reactive protein in chronic kidney disease. *Kidney Int.* *79*, 228–233.
- Dao, H.H., Essalihi, R., Bouvet, C., and Moreau, P. (2005). Evolution and modulation of age-related medial elastocalcinosis: impact on large artery stiffness and isolated systolic hypertension. *Cardiovasc. Res.* *66*, 307–317.
- Dedinszki, D., Szeri, F., Kozák, E., Pomozi, V., Tórkési, N., Mezei, T.R., Merczel, K., Letavernier, E., Tang, E., Le Saux, O., et al. (2017). Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO Mol. Med.* *9*, 1463–1470.
- Detrano, R., Guerci, A.D., Carr, J.J., Bild, D.E., Burke, G., Folsom, A.R., Liu, K., Shea, S., Szklo, M., Bluemke, D.A., et al. (2008). Coronary Calcium as a Predictor of Coronary Events in Four Racial or Ethnic Groups. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1336–1345.
- Doherty, T.M., Asotra, K., Fitzpatrick, L.A., Qiao, J.-H., Wilkin, D.J., Detrano, R.C., Dunstan, C.R., Shah, P.K., and Rajavashisth, T.B. (2003). Calcification in atherosclerosis: bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 11201–11206.
- Drake, M.T., Clarke, B.L., and Khosla, S. (2008). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin. Proc.* *83*, 1032–1045.
- Ejerblad, S., Ericsson, J.L., and Eriksson, I. (1979). Arterial lesions of the radial artery in uraemic patients. *Acta Chir. Scand.* *145*, 415–428.
- Ekstedt, M., Hagström, H., Nasr, P., Fredrikson, M., Stål, P., Kechagias, S., and Hultcrantz, R. (2015). Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology*. *Baltim. Md* *61*, 1547–1554.

- Elmariah, S., Delaney, J.A.C., O'Brien, K.D., Budoff, M.J., Vogel-Claussen, J., Fuster, V., Kronmal, R.A., and Halperin, J.L. (2010). Bisphosphonate use and the Prevalence of Valvular and Vascular Calcification in Women: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* *56*, 1752–1759.
- Essary, L.R., and Wick, M.R. (2000). Cutaneous calciphylaxis. An underrecognized clinicopathologic entity. *Am. J. Clin. Pathol.* *113*, 280–287.
- Fadini, G.P., Rattazzi, M., Matsumoto, T., Asahara, T., and Khosla, S. (2012). The emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis. *Circulation* *125*, 2772–2781.
- Farrington-Rock, C., Crofts, N.J., Doherty, M.J., Ashton, B.A., Griffin-Jones, C., and Canfield, A.E. (2004). Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* *110*, 2226–2232.
- Fausther, M., Lavoie, E.G., Goree, J.R., Baldini, G., and Dranoff, J.A. (2014). NT5E mutations that cause human disease are associated with intracellular mistrafficking of NT5E protein. *PLoS One* *9*, e98568.
- Favre, G., Laurain, A., Aranyi, T., Szeri, F., Fulop, K., Le Saux, O., Duranton, C., Kauffenstein, G., Martin, L., and Lefthérotis, G. (2017). The ABCC6 Transporter: A New Player in Biomineralization. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Fleisch, H., and Bisaz, S. (1962a). Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am. J. Physiol.* *203*, 671–675.
- Fleisch, H., and Bisaz, S. (1962b). [The inhibitory role of pyrophosphate in calcification]. *J. Physiol. (Paris)* *54*, 340–341.
- Fleisch, H., and Bisaz, S. (1962c). Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* *195*, 911.
- Fleisch, H., and Neuman, W. (1961). [The role of phosphatase and polyphosphates in calcification of collagen]. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* *19*, C17-18.
- Fleisch, H., Russell, R.G.G., and Straumann, F. (1966). Effect of Pyrophosphate on Hydroxyapatite and Its Implications in Calcium Homeostasis. *Nature* *212*, 901–903.
- Forster, I.C., Hernando, N., Biber, J., and Murer, H. (2006). Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int.* *70*, 1548–1559.
- Gauthier-Bastien, A., Ung, R.-V., Larivière, R., Mac-Way, F., Lebel, M., and Agharazii, M. (2014). Vascular remodeling and media calcification increases arterial stiffness in chronic kidney disease. *Clin. Exp. Hypertens. N. Y. N* *1993* *36*, 173–180.
- Giachelli, C.M. (2009). The emerging role of phosphate in vascular calcification. *Kidney Int.* *75*, 890–897.
- Goettsch, C., Strzelecka-Kiliszek, A., Bessueille, L., Quillard, T., Mechtouff, L., Pikula, S., Canet-Soulas, E., Millán, J.L., Fonta, C., and Magne, D. (2020). TNAP as a therapeutic target for cardiovascular calcification - a discussion of its pleiotropic functions in the body. *Cardiovasc. Res.* *cvaa299*.
- Goltzman, D., Mannstadt, M., and Marcocci, C. (2018). Physiology of the Calcium-Parathyroid Hormone-Vitamin D Axis. *Front. Horm. Res.* *50*, 1–13.
- Goodman, W.G., Goldin, J., Kuizon, B.D., Yoon, C., Gales, B., Sider, D., Wang, Y., Chung, J., Emerick, A., Greaser, L., et al. (2000). Coronary-Artery Calcification in Young Adults with End-Stage Renal Disease Who Are Undergoing Dialysis. *N. Engl. J. Med.* *342*, 1478–1483.
- Górriz, J.L., Molina, P., Cerverón, M.J., Vila, R., Bover, J., Nieto, J., Barril, G., Martínez-Castelao, A., Fernández, E., Escudero, V., et al. (2015). Vascular calcification in patients with nondialysis CKD over 3 years. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *10*, 654–666.

- Greenland, P., Alpert, J.S., Beller, G.A., Benjamin, E.J., Budoff, M.J., Fayad, Z.A., Foster, E., Hlatky, M.A., Hodgson, J.M., Kushner, F.G., et al. (2010). 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* *122*, 2748–2764.
- Guzman, R.J., Brinkley, D.M., Schumacher, P.M., Donahue, R.M.J., Beavers, H., and Qin, X. (2008). Tibial artery calcification as a marker of amputation risk in patients with peripheral arterial disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* *51*, 1967–1974.
- Haarhaus, M., Brandenburg, V., Kalantar-Zadeh, K., Stenvinkel, P., and Magnusson, P. (2017). Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nat. Rev. Nephrol.* *13*, 429–442.
- Hafner, J., Keusch, G., Wahl, C., Sauter, B., Hürlimann, A., von Weizsäcker, F., Krayenbühl, M., Biedermann, K., Brunner, U., and Helfenstein, U. (1995). Uremic small-artery disease with medial calcification and intimal hyperplasia (so-called calciphylaxis): a complication of chronic renal failure and benefit from parathyroidectomy. *J. Am. Acad. Dermatol.* *33*, 954–962.
- Hajjawi, M.O.R., MacRae, V.E., Huesa, C., Boyde, A., Millán, J.L., Arnett, T.R., and Orriss, I.R. (2014). Mineralisation of collagen rich soft tissues and osteocyte lacunae in *Enpp1(-/-)* mice. *Bone* *69*, 139–147.
- Harmey, D., Hessle, L., Narisawa, S., Johnson, K.A., Terkeltaub, R., and Millán, J.L. (2004). Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am. J. Pathol.* *164*, 1199–1209.
- Haydar, A.A., Covic, A., Colhoun, H., Rubens, M., and Goldsmith, D.J.A. (2004). Coronary artery calcification and aortic pulse wave velocity in chronic kidney disease patients. *Kidney Int.* *65*, 1790–1794.
- Hendig, D., Schulz, V., Arndt, M., Szliska, C., Kleesiek, K., and Götzting, C. (2006). Role of serum fetuin-A, a major inhibitor of systemic calcification, in pseudoxanthoma elasticum. *Clin. Chem.* *52*, 227–234.
- Herrmann, M., Kinkeldey, A., and Jahn-Dechent, W. (2012). Fetuin-A function in systemic mineral metabolism. *Trends Cardiovasc. Med.* *22*, 197–201.
- Hessle, L., Johnson, K.A., Anderson, H.C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J.W., Terkeltaub, R., and Millan, J.L. (2002). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 9445–9449.
- Hildebrand, S., and Cunningham, J. (2021). Is there a role for bisphosphonates in vascular calcification in chronic kidney disease? *Bone* *142*, 115751.
- Ho, A.M., Johnson, M.D., and Kingsley, D.M. (2000). Role of the mouse *ank* gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* *289*, 265–270.
- Honkanen, E., Kauppila, L., Wikström, B., Rensma, P.L., Krzesinski, J.-M., Aasarod, K., Verbeke, F., Jensen, P.B., Mattelaer, P., Volck, B., et al. (2008). Abdominal aortic calcification in dialysis patients: results of the CORD study. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *23*, 4009–4015.
- Hortells, L., Sosa, C., Guillén, N., Lucea, S., Millán, Á., and Sorribas, V. (2017). Identifying early pathogenic events during vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* *92*, 1384–1394.
- Hosaka, N., Mizobuchi, M., Ogata, H., Kumata, C., Kondo, F., Koiwa, F., Kinugasa, E., and Akizawa, T. (2009). Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells. *Calcif. Tissue Int.* *85*, 523–529.
- Hoshi, K., Amizuka, N., Oda, K., Ikehara, Y., and Ozawa, H. (1997). Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem. Cell Biol.* *107*, 183–191.

- Hou, Y.-C., Lu, C.-L., and Lu, K.-C. (2018). Mineral bone disorders in chronic kidney disease. *Nephrol. Carlton Vic* 23 *Suppl* 4, 88–94.
- Hwang, I.-C., Park, H.E., Kim, H.-L., Kim, H.M., Park, J.-B., Yoon, Y.E., Lee, S.-P., Kim, H.-K., Cho, G.-Y., Sohn, D.-W., et al. (2016). Systemic Inflammation Is Associated With Coronary Artery Calcification and All-Cause Mortality in Chronic Kidney Disease. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 80, 1644–1652.
- Imaoka, Y., Ohira, M., Nakano, R., Shimizu, S., Kuroda, S., Tahara, H., Ide, K., Kobayashi, T., and Ohdan, H. (2019). Impact of Abdominal Aortic Calcification Among Liver Transplantation Recipients. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 25, 79–87.
- Iyemere, V.P., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., and Shanahan, C.M. (2006). Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* 260, 192–210.
- Jackson, E.K., Cheng, D., Verrier, J.D., Janesko-Feldman, K., and Kochanek, P.M. (2014). Interactive roles of CD73 and tissue nonspecific alkaline phosphatase in the renal vascular metabolism of 5'-AMP. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 307, F680–F685.
- Jamal, S.A., Vandermeer, B., Raggi, P., Mendelssohn, D.C., Chatterley, T., Dorgan, M., Lok, C.E., Fitchett, D., and Tsuyuki, R.T. (2013). Effect of calcium-based versus non-calcium-based phosphate binders on mortality in patients with chronic kidney disease: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* 382, 1268–1277.
- Jansen, R.S., Küçükosmanoglu, A., de Haas, M., Saphu, S., Otero, J.A., Hegman, I.E.M., Bergen, A.A.B., Gorgels, T.G.M.F., Borst, P., and van de Wetering, K. (2013). ABCC6 prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20206–20211.
- Jansen, R.S., Duijst, S., Mahakena, S., Sommer, D., Szeri, F., Váradi, A., Plomp, A., Bergen, A.A., Oude Elferink, R.P.J., Borst, P., et al. (2014). ABCC6-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 1985–1989.
- Jaruvongvanich, V., Wirunsawanya, K., Sanguankeo, A., and Upala, S. (2016). Nonalcoholic fatty liver disease is associated with coronary artery calcification: A systematic review and meta-analysis. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* 48, 1410–1417.
- Jiang, Q., Dibra, F., Lee, M.D., Oldenburg, R., and Uitto, J. (2010). Overexpression of fetuin-a counteracts ectopic mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (abcc6(-/-)). *J. Invest. Dermatol.* 130, 1288–1296.
- Jin, H., St Hilaire, C., Huang, Y., Yang, D., Dmitrieva, N.I., Negro, A., Schwartzbeck, R., Liu, Y., Yu, Z., Walts, A., et al. (2016). Increased activity of TNAP compensates for reduced adenosine production and promotes ectopic calcification in the genetic disease ACDC. *Sci. Signal.* 9, ra121.
- Johnson, K.A., Hesse, L., Vaingankar, S., Wennberg, C., Mauro, S., Narisawa, S., Goding, J.W., Sano, K., Millan, J.L., and Terkeltaub, R. (2000). Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1365-1377.
- Johnson, R.C., Leopold, J.A., and Loscalzo, J. (2006). Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ. Res.* 99, 1044–1059.
- Jung, A., Bisaz, S., and Fleisch, H. (1973). The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif. Tissue Res.* 11, 269–280.
- Kamath, P.S., Wiesner, R.H., Malinchoc, M., Kremers, W., Therneau, T.M., Kosberg, C.L., D'Amico, G., Dickson, E.R., and Kim, W.R. (2001). A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology. Baltim. Md* 33, 464–470.

- Kamath, P.S., Kim, W.R., and Advanced Liver Disease Study Group (2007). The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology*. Baltim. Md *45*, 797–805.
- Kapustin, A.N., Davies, J.D., Reynolds, J.L., McNair, R., Jones, G.T., Sidibe, A., Schurgers, L.J., Skepper, J.N., Proudfoot, D., Mayr, M., et al. (2011). Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ. Res.* *109*, e1-12.
- Kaupilla, L.I., Polak, J.F., Cupples, L.A., Hannan, M.T., Kiel, D.P., and Wilson, P.W. (1997). New indices to classify location, severity and progression of calcific lesions in the abdominal aorta: a 25-year follow-up study. *Atherosclerosis* *132*, 245–250.
- Kestenbaum, B., Sampson, J.N., Rudser, K.D., Patterson, D.J., Seliger, S.L., Young, B., Sherrard, D.J., and Andress, D.L. (2005). Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *16*, 520–528.
- Kestenbaum, B.R., Adeney, K.L., de Boer, I.H., Ix, J.H., Shlipak, M.G., and Siscovick, D.S. (2009). Incidence and progression of coronary calcification in chronic kidney disease: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Kidney Int.* *76*, 991–998.
- Ketteler, M., Bongartz, P., Westenfeld, R., Wildberger, J.E., Mahnken, A.H., Böhm, R., Metzger, T., Wanner, C., Jahn-Dechent, W., and Floege, J. (2003). Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet Lond. Engl.* *361*, 827–833.
- Kim, D., Choi, S.-Y., Park, E.H., Lee, W., Kang, J.H., Kim, W., Kim, Y.J., Yoon, J.-H., Jeong, S.H., Lee, D.H., et al. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease is associated with coronary artery calcification. *Hepatology*. Baltim. Md *56*, 605–613.
- Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Baas, F., and Borst, P. (1999). Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res.* *59*, 175–182.
- Kranenburg, G., de Jong, P.A., Bartstra, J.W., Lagerweij, S.J., Lam, M.G., Ossewaarde-van Norel, J., Risseuw, S., van Leeuwen, R., Imhof, S.M., Verhaar, H.J., et al. (2018). Etidronate for Prevention of Ectopic Mineralization in Patients With Pseudoxanthoma Elasticum. *J. Am. Coll. Cardiol.* *71*, 1117–1126.
- Krishnamurthy, V.R., Baird, B.C., Wei, G., Greene, T., Raphael, K., and Beddhu, S. (2011). Associations of serum alkaline phosphatase with metabolic syndrome and mortality. *Am. J. Med.* *124*, 566.e1-7.
- Kunutsor, S.K., Apekey, T.A., and Khan, H. (2014). Liver enzymes and risk of cardiovascular disease in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Atherosclerosis* *236*, 7–17.
- LaHaye, S., Lincoln, J., and Garg, V. (2014). Genetics of valvular heart disease. *Curr. Cardiol. Rep.* *16*, 487.
- Lanske, B., and Razzaque, M.S. (2014). Molecular interactions of FGF23 and PTH in phosphate regulation. *Kidney Int.* *86*, 1072–1074.
- Lau, W.L., Liu, S., and Vaziri, N.D. (2014). Chronic kidney disease results in deficiency of ABCC6, the novel inhibitor of vascular calcification. *Am. J. Nephrol.* *40*, 51–55.
- Laurain, A., Rubera, I., Durantou, C., Rutsch, F., Nitschke, Y., Ray, E., Vido, S., Sicard, A., Lefthériotis, G., and Favre, G. (2020). Alkaline Phosphatases Account for Low Plasma Levels of Inorganic Pyrophosphate in Chronic Kidney Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* *8*.
- Laurent, S., Katsahian, S., Fassot, C., Tropeano, A.-I., Gautier, I., Laloux, B., and Boutouyrie, P. (2003). Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke* *34*, 1203–1206.

- Le Saux, O., Urban, Z., Tschuch, C., Csiszar, K., Bacchelli, B., Quaglino, D., Pasquali-Ronchetti, I., Pope, F.M., Richards, A., Terry, S., et al. (2000a). Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* *25*, 223–227.
- Le Saux, O., Urban, Z., Tschuch, C., Csiszar, K., Bacchelli, B., Quaglino, D., Pasquali-Ronchetti, I., Pope, F.M., Richards, A., Terry, S., et al. (2000b). Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* *25*, 223–227.
- Le Saux, O., Urban, Z., Tschuch, C., Csiszar, K., Bacchelli, B., Quaglino, D., Pasquali-Ronchetti, I., Pope, F.M., Richards, A., Terry, S., et al. (2000c). Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat. Genet.* *25*, 223–227.
- Le Saux, O., Bunda, S., VanWart, C.M., Douet, V., Got, L., Martin, L., and Hinek, A. (2006). Serum factors from pseudoxanthoma elasticum patients alter elastic fiber formation in vitro. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 1497–1505.
- Lee, S.J., Lee, I.-K., and Jeon, J.-H. (2020). Vascular Calcification—New Insights into Its Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 2685.
- Leroux-Berger, M., Queguiner, I., Maciel, T.T., Ho, A., Relaix, F., and Kempf, H. (2011). Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *26*, 1543–1553.
- Letavernier, E., Kauffenstein, G., Huguet, L., Navasiolava, N., Boudierlique, E., Tang, E., Delaitre, L., Bazin, D., de Frutos, M., Gay, C., et al. (2018a). ABCC6 Deficiency Promotes Development of Randall Plaque. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *29*, 2337–2347.
- Letavernier, E., Kauffenstein, G., Huguet, L., Navasiolava, N., Boudierlique, E., Tang, E., Delaitre, L., Bazin, D., de Frutos, M., Gay, C., et al. (2018b). ABCC6 Deficiency Promotes Development of Randall Plaque. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *29*, 2337–2347.
- Levitzy, Y.S., Cupples, L.A., Murabito, J.M., Kannel, W.B., Kiel, D.P., Wilson, P.W.F., Wolf, P.A., and O'Donnell, C.J. (2008). Prediction of intermittent claudication, ischemic stroke, and other cardiovascular disease by detection of abdominal aortic calcific deposits by plain lumbar radiographs. *Am. J. Cardiol.* *101*, 326–331.
- Li, Q., Sundberg, J.P., Levine, M.A., Terry, S.F., and Uitto, J. (2015). The effects of bisphosphonates on ectopic soft tissue mineralization caused by mutations in the ABCC6 gene. *Cell Cycle Georget. Tex* *14*, 1082–1089.
- Li, Q., Kingman, J., van de Wetering, K., Tannouri, S., Sundberg, J.P., and Uitto, J. (2017). Abcc6 Knockout Rat Model Highlights the Role of Liver in PPI Homeostasis in Pseudoxanthoma Elasticum. *J. Invest. Dermatol.* *137*, 1025–1032.
- Li, Q., Kingman, J., Sundberg, J.P., Levine, M.A., and Uitto, J. (2018). Etidronate prevents, but does not reverse, ectopic mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (Abcc6^{-/-}). *Oncotarget* *9*, 30721–30730.
- Li, Q., Huang, J., Pinkerton, A.B., Millan, J.L., van Zelst, B.D., Levine, M.A., Sundberg, J.P., and Uitto, J. (2019). Inhibition of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Attenuates Ectopic Mineralization in the Abcc6^{-/-} Mouse Model of PXE but Not in the Enpp1 Mutant Mouse Models of GACI. *J. Invest. Dermatol.* *139*, 360–368.
- Lieben, L., and Carmeliet, G. (2013). Vitamin D signaling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis. *Bone* *54*, 237–243.

- Liedtke, D., Hofmann, C., Jakob, F., Klopocki, E., and Graser, S. (2020). Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase-A Gatekeeper of Physiological Conditions in Health and a Modulator of Biological Environments in Disease. *Biomolecules* *10*, E1648.
- Lim, H.E., Park, C.G., Shin, S.H., AHN, J.C., Seo, H.S., and Oh, D.J. (2004). Aortic pulse wave velocity as an independent marker of coronary artery disease. *Blood Press.* *13*, 369–375.
- Lomashvili, K.A., Cobbs, S., Hennigar, R.A., Hardcastle, K.I., and O'Neill, W.C. (2004). Phosphate-induced vascular calcification: role of pyrophosphate and osteopontin. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *15*, 1392–1401.
- Lomashvili, K.A., Khawandi, W., and O'Neill, W.C. (2005). Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *16*, 2495–2500.
- Lomashvili, K.A., Garg, P., Narisawa, S., Millan, J.L., and O'Neill, W.C. (2008). Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int.* *73*, 1024–1030.
- Lomashvili, K.A., Monier-Faugere, M.-C., Wang, X., Malluche, H.H., and O'Neill, W.C. (2009). Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int.* *75*, 617–625.
- Lonardo, A., Sookoian, S., Pirola, C.J., and Targher, G. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and risk of cardiovascular disease. *Metabolism.* *65*, 1136–1150.
- London, G.M., Blacher, J., Pannier, B., Guérin, A.P., Marchais, S.J., and Safar, M.E. (2001). Arterial wave reflections and survival in end-stage renal failure. *Hypertens. Dallas Tex* *1979* *38*, 434–438.
- London, G.M., Guérin, A.P., Marchais, S.J., Métivier, F., Pannier, B., and Adda, H. (2003). Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *18*, 1731–1740.
- Luo, G., Ducy, P., McKee, M.D., Pinero, G.J., Loyer, E., Behringer, R.R., and Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* *386*, 78–81.
- Lust, G., and Seegmiller, J.E. (1976). A rapid, enzymatic assay for measurement of inorganic pyrophosphate in biological samples. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *66*, 241–249.
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A.L., Koskinas, K.C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M.J., De Backer, G.G., Delgado, V., Ference, B.A., et al. (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* *41*, 111–188.
- Marie, P. (2001). Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *médecine/sciences* *17*, 1252–1259.
- Markello, T.C., Pak, L.K., St Hilaire, C., Dorward, H., Ziegler, S.G., Chen, M.Y., Chaganti, K., Nussbaum, R.L., Boehm, M., and Gahl, W.A. (2011). Vascular pathology of medial arterial calcifications in NT5E deficiency: implications for the role of adenosine in pseudoxanthoma elasticum. *Mol. Genet. Metab.* *103*, 44–50.
- Matsui, I., Hamano, T., Mikami, S., Fujii, N., Takabatake, Y., Nagasawa, Y., Kawada, N., Ito, T., Rakugi, H., Imai, E., et al. (2009). Fully phosphorylated fetuin-A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine-induced renal failure. *Kidney Int.* *75*, 915–928.
- Matsushita, K., Sang, Y., Ballew, S.H., Shlipak, M., Katz, R., Rosas, S.E., Peralta, C.A., Woodward, M., Kramer, H.J., Jacobs, D.R., et al. (2015). Subclinical atherosclerosis measures for cardiovascular prediction in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *26*, 439–447.

- Mazzaferro, S., Pasquali, M., Taggi, F., Baldinelli, M., Conte, C., Muci, M.L., Pirozzi, N., Carbone, I., Francone, M., and Pugliese, F. (2009). Progression of Coronary Artery Calcification in Renal Transplantation and the Role of Secondary Hyperparathyroidism and Inflammation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 4, 685–690.
- McKimmie, R.L., Daniel, K.R., Carr, J.J., Bowden, D.W., Freedman, B.I., Register, T.C., Hsu, F.-C., Lohman, K.K., Weinberg, R.B., and Wagenknecht, L.E. (2008). Hepatic Steatosis and Subclinical Cardiovascular Disease in a Cohort Enriched for Type 2 Diabetes: The Diabetes Heart Study. *Am. J. Gastroenterol.* 103, 3029–3035.
- McMullen, E.R., Harms, P.W., Lowe, L., Fullen, D.R., and Chan, M.P. (2019). Clinicopathologic Features and Calcium Deposition Patterns in Calciphylaxis: Comparison With Gangrene, Peripheral Artery Disease, Chronic Stasis, and Thrombotic Vasculopathy. *Am. J. Surg. Pathol.* 43, 1273–1281.
- Mellinger, J.L., Pencina, K.M., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Seshadri, S., Fox, C.S., O'Donnell, C.J., and Speliotes, E.K. (2015). Hepatic steatosis and cardiovascular disease outcomes: An analysis of the Framingham Heart Study. *J. Hepatol.* 63, 470–476.
- Merion, R.M., Schaubel, D.E., Dykstra, D.M., Freeman, R.B., Port, F.K., and Wolfe, R.A. (2005). The survival benefit of liver transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 307–313.
- Millán, J.L. (2013). The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 93, 299–306.
- Mills, K.T., Xu, Y., Zhang, W., Bundy, J.D., Chen, C.-S., Kelly, T.N., Chen, J., and He, J. (2015). A systematic analysis of worldwide population-based data on the global burden of chronic kidney disease in 2010. *Kidney Int.* 88, 950–957.
- Moe, S., Drüeke, T., Cunningham, J., Goodman, W., Martin, K., Olgaard, K., Ott, S., Sprague, S., Lameire, N., Eknoyan, G., et al. (2006). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 69, 1945–1953.
- Moss, D.W. (1986). Multiple forms of acid and alkaline phosphatases: genetics, expression and tissue-specific modification. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 161, 123–135.
- Murshed, M., Harmey, D., Millán, J.L., McKee, M.D., and Karsenty, G. (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* 19, 1093–1104.
- Nadra, I., Mason, J., Philippidis, P., Florey, O., Smythe, C., Mccarthy, G., Landis, R., and Haskard, D. (2005). Proinflammatory Activation of Macrophages by Basic Calcium Phosphate Crystals via Protein Kinase C and MAP Kinase Pathways A Vicious Cycle of Inflammation and Arterial Calcification? *Circ. Res.* 96, 1248–1256.
- Nakatani, T., Ohnishi, M., and Razzaque, M.S. (2009). Inactivation of klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 3702–3711.
- Narisawa, S., Harmey, D., Yadav, M.C., O'Neill, W.C., Hoylaerts, M.F., and Millán, J.L. (2007). Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 22, 1700–1710.
- Nigwekar, S.U., Bloch, D.B., Nazarian, R.M., Vermeer, C., Booth, S.L., Xu, D., Thadhani, R.I., and Malhotra, R. (2017). Vitamin K-Dependent Carboxylation of Matrix Gla Protein Influences the Risk of Calciphylaxis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 28, 1717–1722.

- Nigwekar, S.U., Thadhani, R., and Brandenburg, V.M. (2018). Calciphylaxis. *N. Engl. J. Med.* *378*, 1704–1714.
- Nitschke, Y., Baujat, G., Botschen, U., Wittkamp, T., du Moulin, M., Stella, J., Le Merrer, M., Guest, G., Lambot, K., Tazarourte-Pinturier, M.-F., et al. (2012). Generalized arterial calcification of infancy and pseudoxanthoma elasticum can be caused by mutations in either ENPP1 or ABCC6. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 25–39.
- Nitschke, Y., Yan, Y., Buers, I., Kintziger, K., Askew, K., and Rutsch, F. (2018). ENPP1-Fc prevents neointima formation in generalized arterial calcification of infancy through the generation of AMP. *Exp. Mol. Med.* *50*, 1–12.
- Nouwen, E.J., and De Broe, M.E. (1994). Human intestinal versus tissue-nonspecific alkaline phosphatase as complementary urinary markers for the proximal tubule. *Kidney Int. Suppl.* *47*, S43-51.
- Nürnberg, P., Thiele, H., Chandler, D., Höhne, W., Cunningham, M.L., Ritter, H., Leschik, G., Uhlmann, K., Mischung, C., Harrop, K., et al. (2001). Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia. *Nat. Genet.* *28*, 37–41.
- O'Brien, K.D. (2006). Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 1721–1728.
- de Oliveira, R.B., Louvet, L., Riser, B.L., Barreto, F.C., Benchitrit, J., Rezg, R., Poirot, S., Jorgetti, V., Drüeke, T.B., and Massy, Z.A. (2015). Peritoneal delivery of sodium pyrophosphate blocks the progression of pre-existing vascular calcification in uremic apolipoprotein-E knockout mice. *Calcif. Tissue Int.* *97*, 179–192.
- O'Neill, W.C., Lomashvili, K.A., Malluche, H.H., Faugere, M.-C., and Riser, B.L. (2011). Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int.* *79*, 512–517.
- Ong, J.P., Pitts, A., and Younossi, Z.M. (2008). Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* *49*, 608–612.
- Opdebeeck, B., Neven, E., Millán, J.L., Pinkerton, A.B., D'Haese, P.C., and Verhulst, A. (2020). Pharmacological TNAP inhibition efficiently inhibits arterial media calcification in a warfarin rat model but deserves careful consideration of potential physiological bone formation/mineralization impairment. *Bone* *137*, 115392.
- Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch. Nippon Ika Daigaku Zasshi* *77*, 4–12.
- O'Rourke, M.F., Nichols, W.W., and Safar, M.E. (2004). Pulse waveform analysis and arterial stiffness: realism can replace evangelism and scepticism. *J. Hypertens.* *22*, 1633–1634; author reply 1634.
- Orriss, I.R., Utting, J.C., Brandao-Burch, A., Colston, K., Grubb, B.R., Burnstock, G., and Arnett, T.R. (2007). Extracellular nucleotides block bone mineralization in vitro: evidence for dual inhibitory mechanisms involving both P2Y2 receptors and pyrophosphate. *Endocrinology* *148*, 4208–4216.
- Orriss, I.R., Arnett, T.R., and Russell, R.G.G. (2016). Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr. Opin. Pharmacol.* *28*, 57–68.
- Pai, A.S., and Giachelli, C.M. (2010). Matrix remodeling in vascular calcification associated with chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *21*, 1637–1640.
- Pai, A., Leaf, E.M., El-Abbadi, M., and Giachelli, C.M. (2011). Elastin degradation and vascular smooth muscle cell phenotype change precede cell loss and arterial medial calcification in a uremic mouse model of chronic kidney disease. *Am. J. Pathol.* *178*, 764–773.

- Panh, L., Ruidavets, J.B., Rousseau, H., Petermann, A., Bongard, V., Bérard, E., Taraszkievicz, D., Lairez, O., Galinier, M., Carrié, D., et al. (2017). Association between serum alkaline phosphatase and coronary artery calcification in a sample of primary cardiovascular prevention patients. *Atherosclerosis* *260*, 81–86.
- Panizo, S., Cardus, A., Encinas, M., Parisi, E., Valcheva, P., López-Ongil, S., Coll, B., Fernandez, E., and Valdivielso, J.M. (2009). RANKL increases vascular smooth muscle cell calcification through a RANK-BMP4-dependent pathway. *Circ. Res.* *104*, 1041–1048.
- Parker, B.D., Schurgers, L.J., Brandenburg, V.M., Christenson, R.H., Vermeer, C., Ketteler, M., Shlipak, M.G., Whooley, M.A., and Ix, J.H. (2010). The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Ann. Intern. Med.* *152*, 640–648.
- Pasch, A., Farese, S., Gräber, S., Wald, J., Richtering, W., Floege, J., and Jahnke-Dechent, W. (2012). Nanoparticle-based test measures overall propensity for calcification in serum. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *23*, 1744–1752.
- Pinkerton, A.B., Sergienko, E., Bravo, Y., Dahl, R., Ma, C.-T., Sun, Q., Jackson, M.R., Cosford, N.D.P., and Millán, J.L. (2018). Discovery of 5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)sulfonamido)nicotinamide (SBI-425), a potent and orally bioavailable tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *28*, 31–34.
- Pohle, K., Mäffert, R., Ropers, D., Moshage, W., Stilianakis, N., Daniel, W.G., and Achenbach, S. (2001). Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* *104*, 1927–1932.
- Pomozi, V., Brampton, C., Szeri, F., Dedinszki, D., Kozák, E., van de Wetering, K., Hopkins, H., Martin, L., Váradi, A., and Le Saux, O. (2017a). Functional Rescue of ABCC6 Deficiency by 4-Phenylbutyrate Therapy Reduces Dystrophic Calcification in Abcc6-/- Mice. *J. Invest. Dermatol.* *137*, 595–602.
- Pomozi, V., Brampton, C., van de Wetering, K., Zoll, J., Calio, B., Pham, K., Owens, J.B., Marh, J., Moisyadi, S., Váradi, A., et al. (2017b). Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice. *Am. J. Pathol.* *187*, 1258–1272.
- Pomozi, V., Julian, C.B., Zoll, J., Pham, K., Kuo, S., Tókési, N., Martin, L., Váradi, A., and Le Saux, O. (2019). Dietary Pyrophosphate Modulates Calcification in a Mouse Model of Pseudoxanthoma Elasticum: Implication for Treatment of Patients. *J. Invest. Dermatol.* *139*, 1082–1088.
- Prosdocimo, D.A., Douglas, D.C., Romani, A.M., O'Neill, W.C., and Dubyak, G.R. (2009). Autocrine ATP release coupled to extracellular pyrophosphate accumulation in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *296*, C828–C839.
- Pujari-Palmer, M., Pujari-Palmer, S., Lu, X., Lind, T., Melhus, H., Engstrand, T., Karlsson-Ott, M., and Engqvist, H. (2016). Pyrophosphate Stimulates Differentiation, Matrix Gene Expression and Alkaline Phosphatase Activity in Osteoblasts. *PLoS ONE* *11*, e0163530.
- Raggi, P., Bellasi, A., Ferramosca, E., Islam, T., Muntner, P., and Block, G.A. (2007). Association of pulse wave velocity with vascular and valvular calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int.* *71*, 802–807.
- Raggi, P., Chertow, G.M., Torres, P.U., Csiky, B., Naso, A., Nossuli, K., Moustafa, M., Goodman, W.G., Lopez, N., Downey, G., et al. (2011). The ADVANCE study: a randomized study to evaluate the effects of cinacalcet plus low-dose vitamin D on vascular calcification in patients on hemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *26*, 1327–1339.
- Ren, X., Li, F., Wang, C., Hou, Z., Gao, Y., Yin, W., and Lu, B. (2019). Age- and Sex-Related Aortic Valve Dysfunction and Aortopathy Difference in Patients with Bicuspid Aortic Valve. *Int. Heart. J.* *60*, 637–642.

- Rennenberg, R.J.M.W., Kessels, A.G.H., Schurgers, L.J., van Engelshoven, J.M.A., de Leeuw, P.W., and Kroon, A.A. (2009). Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: a meta-analysis. *Vasc. Health Risk Manag.* *5*, 185–197.
- Reynolds, J.L., Joannides, A.J., Skepper, J.N., McNair, R., Schurgers, L.J., Proudfoot, D., Jahnen-Dechent, W., Weissberg, P.L., and Shanahan, C.M. (2004). Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *15*, 2857–2867.
- Reynolds, J.L., Skepper, J.N., McNair, R., Kasama, T., Gupta, K., Weissberg, P.L., Jahnen-Dechent, W., and Shanahan, C.M. (2005). Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *16*, 2920–2930.
- Riggs, B.L., Melton, L.J., Robb, R.A., Camp, J.J., Atkinson, E.J., McDaniel, L., Amin, S., Rouleau, P.A., and Khosla, S. (2008). A Population-Based Assessment of Rates of Bone Loss at Multiple Skeletal Sites: Evidence for Substantial Trabecular Bone Loss in Young Adult Women and Men. *J. Bone Miner. Res.* *23*, 205–214.
- Riser, B.L., Barreto, F.C., Rezg, R., Valaitis, P.W., Cook, C.S., White, J.A., Gass, J.H., Maizel, J., Louvet, L., Druke, T.B., et al. (2011). Daily peritoneal administration of sodium pyrophosphate in a dialysis solution prevents the development of vascular calcification in a mouse model of uraemia. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *26*, 3349–3357.
- Roberts, F., Zhu, D., Farquharson, C., and Macrae, V.E. (2019). ENPP1 in the Regulation of Mineralization and Beyond. *Trends Biochem. Sci.* *44*, 616–628.
- Román-García, P., Rodríguez-García, M., Cabezas-Rodríguez, I., López-Ongil, S., Díaz-López, B., and Cannata-Andía, J.B. (2011). Vascular calcification in patients with chronic kidney disease: types, clinical impact and pathogenesis. *Med. Princ. Pract. Int. J. Kuwait Univ. Health Sci. Cent.* *20*, 203–212.
- Roy, M.E., and Nishimoto, S.K. (2002). Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity. *Bone* *31*, 296–302.
- Russell, R.G.G. (2011). Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* *49*, 2–19.
- Russell, R.G., Wadstrom, L.B., Lindstedt, S., Care, A.D., Bisaz, S., and Fleisch, H. (1969). The origin of inorganic pyrophosphate in urine. *Clin. Sci.* *37*, 419–429.
- Russell, R.G., Bisaz, S., Donath, A., Morgan, D.B., and Fleisch, H. (1971). Inorganic pyrophosphate in plasma in normal persons and in patients with hypophosphatasia, osteogenesis imperfecta, and other disorders of bone. *J. Clin. Invest.* *50*, 961–969.
- Russell, R.G., Bisaz, S., and Fleisch, H. (1976). The influence of orthophosphate on the renal handling of inorganic pyrophosphate in man and dog. *Clin. Sci. Mol. Med.* *51*, 435–443.
- Russo, D., Corrao, S., Miranda, I., Ruocco, C., Manzi, S., Elefante, R., Brancaccio, D., Cozzolino, M., Biondi, M.L., and Andreucci, V.E. (2007). Progression of coronary artery calcification in predialysis patients. *Am. J. Nephrol.* *27*, 152–158.
- Rutsch, F., Vaingankar, S., Johnson, K., Goldfine, I., Maddux, B., Schauerte, P., Kalhoff, H., Sano, K., Boisvert, W.A., Superti-Furga, A., et al. (2001). PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am. J. Pathol.* *158*, 543–554.
- Rutsch, F., Ruf, N., Vaingankar, S., Toliat, M.R., Suk, A., Höhne, W., Schauer, G., Lehmann, M., Roscioli, T., Schnabel, D., et al. (2003). Mutations in ENPP1 are associated with “idiopathic” infantile arterial calcification. *Nat. Genet.* *34*, 379–381.

- Rutsch, F., Böyer, P., Nitschke, Y., Ruf, N., Lorenz-Depierieux, B., Wittkamp, T., Weissen-Plenz, G., Fischer, R.-J., Mughal, Z., Gregory, J.W., et al. (2008). Hypophosphatemia, hyperphosphaturia, and bisphosphonate treatment are associated with survival beyond infancy in generalized arterial calcification of infancy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* *1*, 133–140.
- Rutsch, F., Buers, I., and Nitschke, Y. (2021). Hereditary Disorders of Cardiovascular Calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *41*, 35–47.
- Ryan, L.M., Kozin, F., and Mccarty, D.J. (1979). Quantification of human plasma inorganic pyrophosphate. *Arthritis Rheum.* *22*, 886–891.
- Savinov, A.Y., Salehi, M., Yadav, M.C., Radichev, I., Millán, J.L., and Savinova, O.V. (2015). Transgenic Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP) in Vascular Endothelium Results in Generalized Arterial Calcification. *J. Am. Heart Assoc.* *4*.
- Scatena, M., Liaw, L., and Giachelli, C.M. (2007). Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 2302–2309.
- Schafer, C., Heiss, A., Schwarz, A., Westenfeld, R., Ketteler, M., Floege, J., Muller-Esterl, W., Schinke, T., and Jahn-Dechent, W. (2003). The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J. Clin. Invest.* *112*, 357–366.
- Schurgers, L.J., Akbulut, A.C., Kaczor, D.M., Halder, M., Koenen, R.R., and Kramann, R. (2018). Initiation and Propagation of Vascular Calcification Is Regulated by a Concert of Platelet- and Smooth Muscle Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Front. Cardiovasc. Med.* *5*, 36.
- Seiler, S., Reichart, B., Roth, D., Seibert, E., Fliser, D., and Heine, G.H. (2010). FGF-23 and future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease before initiation of dialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *25*, 3983–3989.
- Shanahan, C.M. (2007). Inflammation ushers in calcification: a cycle of damage and protection? *Circulation* *116*, 2782–2785.
- Shantouf, R., Kovesdy, C.P., Kim, Y., Ahmadi, N., Luna, A., Luna, C., Rambod, M., Nissenson, A.R., Budoff, M.J., and Kalantar-Zadeh, K. (2009). Association of serum alkaline phosphatase with coronary artery calcification in maintenance hemodialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *4*, 1106–1114.
- Shao, J.-S., Cheng, S.-L., Sadhu, J., and Towler, D.A. (2010). Inflammation and the osteogenic regulation of vascular calcification: a review and perspective. *Hypertens. Dallas Tex 1979* *55*, 579–592.
- Shaw, L.J., Raggi, P., Schisterman, E., Berman, D.S., and Callister, T.Q. (2003). Prognostic value of cardiac risk factors and coronary artery calcium screening for all-cause mortality. *Radiology* *228*, 826–833.
- Sheen, C.R., Kuss, P., Narisawa, S., Yadav, M.C., Nigro, J., Wang, W., Chhea, T.N., Sergienko, E.A., Kapoor, K., Jackson, M.R., et al. (2015). Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *30*, 824–836.
- Shimada, B.K., Pomozi, V., Zoll, J., Kuo, S., Martin, L., and Le Saux, O. (2021). ABCC6, Pyrophosphate and Ectopic Calcification: Therapeutic Solutions. *Int. J. Mol. Sci.* *22*, 4555.
- Shobeiri, N., Adams, M.A., and Holden, R.M. (2014). Phosphate: an old bone molecule but new cardiovascular risk factor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* *77*, 39–54.
- Silcox, D.C., and McCarty, D.J. (1973). Measurement of inorganic pyrophosphate in biological fluids. Elevated levels in some patients with osteoarthritis, pseudogout, acromegaly, and uremia. *J. Clin. Invest.* *52*, 1863–1870.

- Song, D.S., Chang, U.I., Kang, S.-G., Song, S.-W., and Yang, J.M. (2019). Noninvasive Serum Fibrosis Markers are Associated with Coronary Artery Calcification in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gut Liver* 13, 658–668.
- St Hilaire, C., Ziegler, S.G., Markello, T.C., Brusco, A., Groden, C., Gill, F., Carlson-Donohoe, H., Lederman, R.J., Chen, M.Y., Yang, D., et al. (2011). NT5E mutations and arterial calcifications. *N. Engl. J. Med.* 364, 432–442.
- Stepanova, M., and Younossi, Z.M. (2012). Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 10, 646–650.
- Sterling, R.K., Lissen, E., Clumeck, N., Sola, R., Correa, M.C., Montaner, J., Sulkowski, M., Torriani, F.J., Dieterich, D.T., Thomas, D.L., et al. (2006). Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. *Hepatol. Baltim. Md* 43, 1317–1325.
- Sun, Y., Byon, C.H., Yuan, K., Chen, J., Mao, X., Heath, J.M., Javed, A., Zhang, K., Anderson, P.G., and Chen, Y. (2012). Smooth muscle cell-specific runx2 deficiency inhibits vascular calcification. *Circ. Res.* 111, 543–552.
- Sung, K.-C., Wild, S.H., Kwag, H.J., and Byrne, C.D. (2012). Fatty liver, insulin resistance, and features of metabolic syndrome: relationships with coronary artery calcium in 10,153 people. *Diabetes Care* 35, 2359–2364.
- Suzuki, N., Irie, M., Iwata, K., Nakane, H., Yoshikane, M., Koyama, Y., Uehara, Y., Takeyama, Y., Kitamura, Y., Sohda, T., et al. (2006). Altered expression of alkaline phosphatase (ALP) in the liver of primary biliary cirrhosis (PBC) patients. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* 35, 37–44.
- Szeri, F., Lundkvist, S., Donnelly, S., Engelke, U.F.H., Rhee, K., Williams, C.J., Sundberg, J.P., Wevers, R.A., Tomlinson, R.E., Jansen, R.S., et al. (2020). The membrane protein ANKH is crucial for bone mechanical performance by mediating cellular export of citrate and ATP. *PLoS Genet.* 16, e1008884.
- Tani, T., Fujiwara, M., Orimo, H., Shimizu, A., Narisawa, S., Pinkerton, A.B., Millán, J.L., and Tsuruoka, S. (2020). Inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase protects against medial arterial calcification and improves survival probability in the CKD-MBD mouse model. *J. Pathol.* 250, 30–41.
- Targher, G., Byrne, C.D., Lonardo, A., Zoppini, G., and Barbui, C. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *J. Hepatol.* 65, 589–600.
- Taylor, A.J., Bindeman, J., Feuerstein, I., Cao, F., Brazaitis, M., and O'Malley, P.G. (2005). Coronary calcium independently predicts incident premature coronary heart disease over measured cardiovascular risk factors: mean three-year outcomes in the Prospective Army Coronary Calcium (PACC) project. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 807–814.
- Temmar, M., Liabeuf, S., Renard, C., Czernichow, S., Esper, N.E., Shahapuni, I., Presne, C., Makdassi, R., Andrejak, M., Tribouilloy, C., et al. (2010). Pulse wave velocity and vascular calcification at different stages of chronic kidney disease. *J. Hypertens.* 28, 163–169.
- Tonelli, M., Curhan, G., Pfeffer, M., Sacks, F., Thadhani, R., Melamed, M.L., Wiebe, N., and Muntner, P. (2009). Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. *Circulation* 120, 1784–1792.
- Tonelli, M., Pannu, N., and Manns, B. (2010). Oral phosphate binders in patients with kidney failure. *N. Engl. J. Med.* 362, 1312–1324.
- Toussaint, N.D., Elder, G.J., and Kerr, P.G. (2009). Bisphosphonates in chronic kidney disease; balancing potential benefits and adverse effects on bone and soft tissue. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 4, 221–233.

- Utsunomiya, M. (1996). [Angiographic study of stenosis and calcification of coronary vessels in long-term dialysis patients: examination of risk factors for coronary calcification]. *Nihon Jinzo Gakkai Shi* 38, 155–163.
- Vanakker, O.M., Martin, L., Schurgers, L.J., Quaglino, D., Costrop, L., Vermeer, C., Pasquali-Ronchetti, I., Coucke, P.J., and De Paepe, A. (2010). Low serum vitamin K in PXE results in defective carboxylation of mineralization inhibitors similar to the GGCX mutations in the PXE-like syndrome. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 90, 895–905.
- Vangala, C., Pan, J., Cotton, R.T., and Ramanathan, V. (2018). Mineral and Bone Disorders After Kidney Transplantation. *Front. Med.* 5, 211.
- Vattikuti, R., and Towler, D.A. (2004). Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E686-696.
- Vlachopoulos, C., Aznaouridis, K., and Stefanadis, C. (2010). Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 1318–1327.
- Vliegenthart, R., Oudkerk, M., Hofman, A., Oei, H.-H.S., van Dijck, W., van Rooij, F.J.A., and Witteman, J.C.M. (2005). Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation* 112, 572–577.
- Wang, X.-R., Zhang, J.-J., Xu, X.-X., and Wu, Y.-G. (2019). Prevalence of coronary artery calcification and its association with mortality, cardiovascular events in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Ren. Fail.* 41, 244–256.
- Whyte, M.P. (2017). Hypophosphatasia: An overview For 2017. *Bone* 102, 15–25.
- Wilson, P.W., Kauppila, L.I., O'Donnell, C.J., Kiel, D.P., Hannan, M., Polak, J.M., and Cupples, L.A. (2001). Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 103, 1529–1534.
- Wolf, M., Weir, M.R., Kopyt, N., Mannon, R.B., Von Visger, J., Deng, H., Yue, S., and Vincenti, F. (2016). A Prospective Cohort Study of Mineral Metabolism After Kidney Transplantation. *Transplantation* 100, 184–193.
- Wong, V.W.-S., Vergniol, J., Wong, G.L.-H., Foucher, J., Chan, H.L.-Y., Le Bail, B., Choi, P.C.-L., Kowo, M., Chan, A.W.-H., Merrouche, W., et al. (2010). Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 51, 454–462.
- Wuthier, R.E., Bisaz, S., Russell, R.G., and Fleisch, H. (1972). Relationship between pyrophosphate, amorphous calcium phosphate and other factors in the sequence of calcification in vivo. *Calcif. Tissue Res.* 10, 198–206.
- You, S.C., Kim, K.J., Kim, S.U., Kim, B.K., Park, J.Y., Kim, D.Y., Ahn, S.H., and Han, K.-H. (2015). Hepatic fibrosis assessed using transient elastography independently associated with coronary artery calcification. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 1536–1542.
- Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nat. Med.* 13, 791–801.
- Zaker, B., and Ardalan, M. (2020). Vascular calcification; Stony bridge between kidney and heart. *J. Cardiovasc. Thorac. Res.* 12, 165–171.
- Zebboudj, A.F., Imura, M., and Boström, K. (2002). Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.* 277, 4388–4394.

Zebboudj, A.F., Shin, V., and Boström, K. (2003). Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J. Cell. Biochem.* *90*, 756–765.

Zhao, J., Kingman, J., Sundberg, J.P., Uitto, J., and Li, Q. (2017). Plasma PPi Deficiency Is the Major, but Not the Exclusive, Cause of Ectopic Mineralization in an Abcc6^{-/-} Mouse Model of PXE. *J. Invest. Dermatol.* *137*, 2336–2343.

Zhu, D., Mackenzie, N.C.W., Farquharson, C., and Macrae, V.E. (2012). Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Front. Endocrinol.* *3*, 95.

Ziegler, S., Gahl, W., and Ferreira, C. (2018). Disorders and Mechanisms of Ectopic Calcification. In *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease (Second Edition)*, pp. 571–595.

Ziegler, S.G., Ferreira, C.R., MacFarlane, E.G., Riddle, R.C., Tomlinson, R.E., Chew, E.Y., Martin, L., Ma, C.-T., Sergienko, E., Pinkerton, A.B., et al. (2017). Ectopic calcification in pseudoxanthoma elasticum responds to inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *Sci. Transl. Med.* *9*, eaal1669.

Zimmermann, H., Zebisch, M., and Sträter, N. (2012). Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal.* *8*, 437–502.

Zorzi, A., Brunetti, G., Cardaioli, F., D’Arcangelo, F., Fabris, T., Gambato, M., Iliceto, S., Martini, A., Mattesi, G., Peluso, C., et al. (2021). Coronary artery calcium on standard chest computed tomography predicts cardiovascular events after liver transplantation. *Int. J. Cardiol.* *339*, 219–224.

Biological role of inorganic pyrophosphate - relié - Jukka K. Heinonen - Achat Livre | fnac.

Review

The ABCC6 transporter: A new player in biomineralization

Guillaume Favre 1,2,3,4, Audrey Laurain 4, Tamas Aranyi 5, Flora Szeri 5, Olivier Le Saux 6, Christophe Duranton 7, Gilles Kauffenstein 8,9, Ludovic Martin 8,9, Georges Lefthériotis 3,7

INSERM, U 1081, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), “Aging and Diabetes” team, 06107 Nice, France

CNRS, UMR7284, IRCAN, Nice, France

University of Nice-Sophia Antipolis, Faculty of Medicine, Nice, France

Nephrology Department, University Hospital, Nice, France;

Institute of Enzymology, RCNS, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

Department Cell and Molecular Biology, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, United States of America

Laboratory of Physiology and Molecular Medicine (LP2M) UMR CNRS 7073, Nice, France

UMR CNRS 6015 - Inserm 1083, School of Medicine, Bretagne Loire University, Angers, France

PXE Health and Research Center, University Hospital of Angers, Angers, France

Correspondence: Guillaume Favre, Service de Néphrologie, CHU Pasteur, 30 voie Romaine, 06002 CD1, Nice,

France, favre.g@chu-nice.fr, Tel.: (0033) 492038428, Fax: (0033) 492038495

Received: 15 August 2017; Accepted: date; Published: date

Abstract: Pseudoxanthoma elasticum (PXE) is a genetic metabolic disease with autosomal recessive inheritance caused by mutations in the ABCC6 gene. Since the first description of the disease in 1896, alleging a disease involving the elastic fibers, the concept evolved with the further discoveries of the

¹. Introduction

Membrane transporters are basic cellular elements, which play a central role in various cellular functions and cells' integrity. Adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters are a large family of 48 members involved in the pathogenesis of various inherited metabolic diseases. In this regard, ABCC6 is one of these new players, whose deficiency is responsible for the pseudoxanthoma elasticum (PXE), a rare and intriguing inherited disease, whose phenotype is characterized by ectopic calcifications in elastin-rich tissues such as the skin, the Burch's membrane for the retina and the arterial wall. To date, the physiological role of ABCC6 and its preferential

pivotal role of ectopic mineralization that is preponderant in the elastin-rich tissues of the skin, eyes and blood vessel walls. Due to a late discovery of the causative gene of the disease in 2000, the function of the ABCC6 protein remains elusive. More than 300 mutations have been now reported and the concept of a dermal disease has progressively evolved toward a metabolic disorder resulting from the remote effects caused by lack of a circulating anti-mineralization factor. In the last decades, evidence has accumulated that this anti-mineralizing factor is inorganic pyrophosphate (PPi). This leads to decreased PPi/Pi (inorganic phosphate) ratio that results from the lack of extracellular ATP release by hepatocytes and probably renal cells harbouring the mutant ABCC6 protein. However, the mechanism by which ABCC6 dysfunction causes diminished ATP release remains an enigma. Studies of other ABC transporters, such as ABCC7 or ABCC1 could help our understanding of what ABCC6 exact function is. Data and a hypothesis on the possible roles of ABCC6 in acquired metabolic diseases are also discussed.

Keywords: ABC transporter; inorganic pyrophosphate; pseudo-xanthoma elasticum; arterial calcifications; chronic kidney disease

substrate(s) remain an enigma. Recent findings are now showing a pivotal role in the regulation of extracellular nucleotide metabolism and in the control of biomineralization. This review will summarize the current knowledge and speculated roles of ABCC6 transporter not only in PXE but also in acquired metabolic diseases characterized by life-threatening arterial calcifications (AC).

2. History of the discovery of ABCC6 or Pseudoxanthoma elasticum: the story of a “misnamed” disease

The study of ABCC6 is paved by important scientific rebounds and a brief time-sketch of the progresses in our knowledge and on-going debates are mandatory to the understanding of its biological and clinical relevance. PXE, also known variously as Grönblad-Strandberg syndrome, elastosis dystrophica or elastodysplasia calcificans, is a rare inherited disease (OMIM 264800, prevalence 1/25,000 to 1/50,000) characterized by a generalized accumulation of calcified and fragmented elastic fibers selectively affecting the elastin-rich tissues such as the skin, the retina and the vascular wall. Remarkably, there is no pulmonary pathology [1, 2]. Other organs such as the kidneys, joints and tendons are affected to various degrees. The skin manifestations are often the initial and most visible lesions in PXE, with a “pseudoxanthoma” aspect affecting, for yet unknown reasons, the flexural areas of the body (i.e. neck, arm and knee joints, groin and periumbilical). The ambiguous name “pseudoxanthoma”, arose from the fact that the skin lesions mimic “xanthoma” lesions (i.e. subcutaneous papules of yellow-orange colour). Following the initial and independent reports on “xanthomas” lesion [3-5], François-Ferdinand Darier in 1896 presented the idea that they were distinct from xanthomas with an unusual involvement of elastic tissues, thereafter introducing the prefix “pseudo” as to cast doubt on the real nature of the dermal lesions [6]. The fundamental histopathological feature of PXE, i.e. the calcification of elastin, were described first in 1901 by von Tannenhain; Werther seemed to have seeded the idea that PXE was a congenital trait [7]. Knapp was the first to report a specific retinopathy coining the descriptor "angioid streaks", still a pathognomonic clinical manifestation of the disease. Finally, in 1929, Grönblad, an ophthalmologist and Strandberg, a dermatologist, determined that PXE was a specific entity. Currently, PXE diagnosis relies on the following criteria : clinically suggestive skin lesions, angioid streaks, fragmented and calcified elastic fibers on skin biopsy [8]. The cardiovascular complications linked to PXE were initially reported by Balzer in 1884 who described an "elastic degeneration of the skin and heart" and Carlsborg gave the first well-documented study of cardiovascular elastic tissue calcification in 1944. Since that time, the term “pseudoxanthoma elasticum” continues to be the most frequently used to designate this pathology in the literature for historical reasons. However, one would suggest elasto-calcinosis as more appropriate [9].

3. Vascular lesions of PXE

Beside the skin and retinal lesions, the arterial phenotype is an important aspect of the disease. The internal elastic laminae in arteries are the most frequently affected. The small and medium peripheral arterial beds are mostly involved [10], although other arteries, such as the coronary and the cerebral arteries may also be affected. Typically, arterial lesions are characterized by an obstruction of the lumen from a diffuse thickening of the wall and an echogenic plaque revealing calcification. The lesions are primarily found on straight segments in leg arteries such as the superficialis femoralis or arteries below knee. To date, the exact nature of these lesions is unknown, at least in humans. As a result, lower limb intermittent claudication due to peripheral occlusive disease represent a typical symptom of the disease affecting more than 20% of the patients [11]. Contrary to what is expected with arterial medial sclerosis, arterial compressibility is well-preserved in PXE, suggesting a specific arterial remodelling [11]. In fact, abnormal proteoglycan deposits, authenticated by post mortem histology, was advocated to contribute to preserving the compressibility of the peripheral arteries despite fragmentation and calcifications of the elastin fibers [12, 13]. To the best of our knowledge, intimal hyperplasia has never been reported in these patients. Arterial wall aneurysms have rarely been described in PXE patients. Although PXE patients are at high risk for stroke, it is mostly attributed to a small-cerebral vessel disease with narrowed arteries rather than to embolisms. Increased myogenic tone in resistance arteries, primarily evidenced in *Abcc6*^{-/-} mice [14], may be responsible for such ischemic events, even no evidence for such mechanism has been shown in humans. Taken as a whole, the vascular phenotype of PXE is unique and is not associated to bone mineralization defect [15] contrary to patients with osteoporosis and/or chronic kidney disease (CKD) [16].

Although arterial calcifications represent the most visible cardiovascular lesions in PXE, other abnormalities have been reported [9]. Cardiac tissue may be affected in PXE. Some cohort studies have reported specific changes in myocardial function whereas others reported that preclinical cardiac dysfunction were rare [17, 18]. Recently, results from prospective and comprehensive assessment of cardiac function in 67 PXE patients aged 48 ± 15 years were found not to be different from those of a comparable population with coronary artery disease, valve disease and echocardiography findings [19].

4. Lessons from knockout mice

Knockout animal models of PXE have been developed using targeted disruption of selected exons in *ABCC6* [20, 21]. These models replicate the human phenotype with mouse-specific distinctions. For example, *Abcc6*^{-/-} mice lack skin lesions and exhibit abnormal calcification of the capsule of the vibrissae, a connective tissue not present in humans [20]. These knock out mice also mimic the human cardiovascular phenotype [20, 22] including higher intima-media thickness [23]. Conversely, a higher myogenic tone in distal arteries have been observed [14], which has not been reported in PXE patients. Finally, cardiac hypertrophy was described in *Abcc6*^{-/-} mice after 24 months of life, suggesting that late cardiopathy could develop in older PXE patients [19]. These mice also develop dystrophic cardiac calcification that refers to acute calcifications that occur following myocardia necrotic lesions [24].

5. Molecular aspects of *ABCC6*

PXE is an inherited autosomal recessive disease with an unexplained 2/3 female-1/3 male ratio [25]. In 2000, Le Saux et al identified the first PXE-causing mutations in the gene encoding *ABCC6* (also referred to as multi-drug resistance-associated protein-6, MRP6) [26]. Genetic linkage analysis failed to reveal any locus heterogeneity, suggesting that *ABCC6* is solely responsible for PXE. Today, more than 300 mutations have been identified. The vast majority are represented by single nucleotide substitutions

resulting in missense, nonsense and splice variants while a few others are large and small deletions or insertions [25]. The *ABCC6* gene is a member of the gene family encoding ATP-binding cassette (ABC) proteins, one of the largest gene families. The 48 human ABC transporters are distributed in 7 classes from A to G. All these genes code for proteins, which have conserved domains specific to ATP binding and hydrolysis (e.g. Walker A, B and signature sequence). All ABC transporters are transmembrane proteins as their function mainly relate to the cellular efflux of a variety of compounds. ABC transporters are composed of a trans membrane domain (TMD) and a nucleotide binding domain (NBD). Two NBD domains interact to utilize ATP. The ABC transporters are divided into two subgroups based on their short or long structure. The long ABC family members, *ABCC1*, 2, 3, 6 and 10 contain a specific N-terminal TMD0 domain followed by an L0 linker segment connecting to the transmembrane and NBD-1 and -2 regions. Genes coding for long ABC proteins are closely related to each other and are present in all eukaryotic kingdoms. They are likely to have evolved from a distant ancestor by a series of gene duplication events [27]. The evolution of ABC transporters is still ongoing. Indeed, the human *ABCC6* underwent several recent partial gene duplications leading to two pseudogenes and a third shorter fragment [28]. These pseudogenes are specific to human and non-human primates, as there are chimpanzee-specific similar pseudogenes similar to the humans [27].

The transcriptional regulation of *ABCC6* has been investigated in detail. Both activator and silencer elements have been identified in the promoter [29]. The core promoter was mapped to the 145/+72 (numbering relative to the translational start site), which confers a ubiquitous low expression in cell assay systems [29]. Two other activator sequences were identified in the upstream promoter region: an evolutionarily highly conserved region between -209/-145 and a stronger primate-specific region between -234 and -209 bp. Both of these elements confer tissue-specific activity to the gene [30, 31]. Furthermore, a strong primate-specific activator sequence was identified in the first intron of the gene. This intronic sequence interacts with and its activity depends on regulatory sequences of the promoter [32]. Several transcription factors playing an important role in the regulation of *ABCC6* expression were identified. The most important among them is hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α), which binds to the evolutionarily highly conserved element of the promoter [30-32]. HNF4 α plays a particularly important role in the maintenance of homeostasis of hepatocytes by regulating the expression of more than 1000 genes. This nuclear receptor seems to be a major determinant of tissue-specificity for *ABCC6* as this gene is highly expressed in tissues and cells in which HNF4 α is present. In another set of experiments the sensitivity of *ABCC6* expression to environmental stimuli has been demonstrated and the molecular mechanisms of the alteration of gene expression level was also elucidated in some cases. The expression level of the gene is down regulated by growth factors (hepatocyte growth factor, epidermal growth factor and potentially transforming growth factor- β , although the latter is controversial) [30, 33] and oxidative stress. Several studies have shown the inhibitory effect of oxidative stress on *ABCC6* expression [12, 30], which led to the hypothesis that, this could contribute to development of PXE-like manifestations in beta-thalassemia patients [34, 35]. It has been shown that these effects, in part converge on the ERK1/2 pathway, which upon activation phosphorylates HNF4 α leading to the reduced binding of the factor to its response element in the promoter. This may then cause the repression of *ABCC6* expression. Similarly, other environmental stimuli activating protein kinase cascades (PKA, PKC and AMPK) lead to the reduced activity of HNF4 α and the decreased expression of *ABCC6*. *ABCC6* was reported to be capable to transport leukotriene C4 (LTC4) and N-ethylmaleimide S-glutathione (NEM-GS) in vitro [36].

6. Pathophysiology of *ABCC6*

The expression pattern of *ABCC6* gene has been extensively studied. *ABCC6* is primarily expressed in the liver [37-41], with moderate levels in the proximal tubules of the kidneys [42, 43] and has also been

detected in the intestines [32, 39]. While the expression level is considered as low or absent in other tissues, few studies reported ubiquitous presence of ABCC6 [38, 44]. The paradox that ABCC6 is almost entirely missing from tissues directly affected by ectopic mineralization in humans, mice and rats [45-47] has led to the hypothesis that PXE could be due to a circulating factor [48]. Accordingly, a systemic factor transported by ABCC6 into the circulation under physiological conditions, would play a key role in preventing ectopic calcification. This hypothesis was supported by parabiotic experiments using crosses of wild type and *Abcc6*^{-/-} mice with *Rag*^{-/-} immune-tolerant animals. Indeed, this study found that the calcifying phenotype of *Abcc6*^{-/-} mice was inhibited when sharing blood circulation with wild type animals, demonstrating the presence of an inhibitory molecule [49].

The observation of low levels of carboxylated anticalcifying factors in the blood of PXE and the report of PXE phenocopy due to a defect in vitamin K dependent γ -glutamyl carboxylase (GGCX) in humans [50], suggested a possible role for vitamin K in PXE. GGCX is required for the activation of matrix gla protein (MGP) by γ -glutamyl carboxylation with vitamin K₂ as a co-factor [51]. The initial and intriguing hypothesis that ABCC6 could release vitamin K into the systemic circulation was rapidly discounted when it was shown that the supplementation of vitamin K₂ failed to ameliorate the PXE phenotype in *Abcc6*^{-/-} mice [52, 53]. In 2014, Jansen et al opened a new chapter in the pathophysiology of PXE. In 2 key papers [54, 55], these authors demonstrated that expression of ABCC6 in HEK cells was linked to a higher release of ATP in the culture media. Interestingly, a link between ABC transporters and extracellular levels of ATP is not new. Release of ATP has been also reported with cystic fibrosis trans membrane conductance regulator (CFTR, ABCC7) and Pglycoprotein (ABCB1) [56, 57] suggesting at first that ABCC6 could extrude triphosphated compounds. In their cellular models, Jansen et al failed to show a direct ABCC6-mediated ATP transport in vitro [55]. The fact that ABCC6 is involved in the extracellular nucleotid metabolism appears of paramount importance because it establishes a link between PXE and generalized arterial calcification of infancy (GACI) [58] or calcification of joints and arteries (ACDC) [59]. These diseases are caused by mutations in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) and in ecto-5'-nucleotidase (NT5E, alias CD73), which encode proteins involved in extracellular ATP and PPi metabolism. This finding prompted the hypothesis that PXE patients could be deficient in PPi, which is a potent anti-calcifying molecule resulting from the hydrolysis of extracellular ATP [60]. Indeed, a 60% reduction of PPi levels in humans was observed in PXE patients and in *ABC6*^{-/-} mice [54], whereas *Enpp1*^{-/-} mice have very low PPi levels [61]. Further, the cross-transplantation experiments between *Enpp1*^{-/-} and wild type mice showed that aortas of *Enpp1*^{-/-} mice no longer showed calcification after transplantation into wild-type mice while allografts of wild-type mice calcified in *Enpp1*^{-/-} mice [61]. It is now a matter of fact, that *Abcc6* deficiency in both local and distant cells/tissues is necessary to achieve the early onset and penetrant ectopic calcification observed in humans and mice [20]. Indeed, Ziegler et al showed that ABCC6 conditional knockout in vascular endothelium, liver or the kidneys was not sufficient to promote calcification of the capsule of the vibrissae in mice [62]. In contrast, deletion of ABCC6 in the liver led to mineralization after a period of one year. Most of the systemic PPi (60%) is believed to come from the liver in an ABCC6-dependent manner [47, 54]. The fact that PPi levels only decrease after targeted disruption of ABCC6 in the liver reinforces this notion [62].

7. ABCC6 in the context of biomineralization

Inorganic pyrophosphate (PPi) is slightly absorbed by the intestinal epithelium [63]. Its normal fasting plasma level in humans is 2-4 $\mu\text{mol/L}$ and it mainly depends on a balance between its cellular production and its hydrolysis [60]. PPi originates from PPI transport regulator protein encoded by ANKH [64] and from ATP degradation by ENPP1, which converts ATP into AMP and PPi. ATP plasma level is 0.02 to 0.2 $\mu\text{mol/L}$ [65, 66]. ATP, PPi and Pi are linked together. PPi can be hydrolysed into Pi by Tissue Non-

specific Alkaline Phosphatase (TNAP). Of note, adenosine resulting from the lysis of AMP by CD73 represses the gene encoding TNAP and is therefore able to regulate PPi levels [62]. Therefore, PPi levels depend on a balance between its production through ENPP1 and its degradation by the adenosine-regulated activity of TNAP. Indeed, crossing *Abcc6*^{-/-} mice with *Enpp1*^{-/-} mice did not increase calcifications of the capsule of the vibrissae as observed in *Enpp1*^{-/-} mice. In contrast, calcifications resulting from *ABCC6* inactivation were augmented by crossing *Abcc6*^{-/-} mice with *Nt5e*^{-/-} mice [62]. Interestingly, *ABCC6* KO mice have been found to have reduced *Nt5e* expression in their arteries [14]. It should be remembered that other molecular mechanisms are able to mediate ATP release independently of *ABCC6*: vesicular exocytosis at nerve terminals, connexin hemichannel and pannexin channel activity [67]. These mechanisms are important because *Abcc6*^{-/-} mice and PXE patients have reduced PPi levels to 40% of wild type levels in mice or healthy patients [54], indicating that 40% of PPi comes from an *ABCC6*-independent ATP release. Despite overwhelming evidence linking PPi deficiency to the PXE phenotype, some concerns remain. In addition, the overexpression of the human ENPP1 led to incomplete reduction in mineralization suggesting that other cellular and/or molecular mechanism participates in the calcification phenotype in PXE [68].

8. Insight from *ABCC6* into vascular calcifications of metabolic diseases

Calcifications of the arterial media (medialcalcosis) are common features of CKD and osteoporosis. In contrast to PXE [15], medialcalcosis is linked to disturbed bone mineralization or bone turnover leading to increased risk of fracture. This has been called the “bone-arterial calcification paradox” [16]. Remarkably, patients suffering from CKD have an increased rate of fracture [69, 70] and patients affected by osteoporosis have more arterial calcifications [71] or develop them over time in parallel to loss of their mineral bone mass [72]. More than 10% of the global population suffers from CKD [73]. The first cause of mortality in CKD is cardiovascular disease [74, 75] mostly due to arterial calcifications. Arterial calcifications in CKD are not limited to medialcalcosis. Atherosclerotic lesions are also present. A widely used marker of AC is the Agatston coronary artery calcification (CAC) score, measured with electron-beam computer tomography [76], which does not provide information on the spatial distribution of calcifications in the arterial wall. However, CAC score is a strong independent risk factor of cardiovascular mortality [77]. This score is remarkably high in CKD patients undergoing regular dialysis, even in children and in adults under the age of 30 and it increases very rapidly [78, 79]. The role of *ABCC6* in CKD has not been addressed thoroughly yet. As a matter of fact, PPi/Pi ratio is low because Pi levels are high [80] and PPi levels are low [81, 82] in advanced CKD stages. The observation of a lower hepatic expression of *ABCC6* in uremic rats [83] suggests that decreased PPi level observed in CKD could be caused by a decreased ATP-derived PPi production from the liver. The high TNAP expression found in the arterial wall of the aorta of uremic rats following 5/6 nephrectomy could lower local PPi level and favour AC [84]. TNAP activity reacts to uremic compounds because exposure of rat aortic ring to uremic plasma increases arterial TNAP activity [84]. Plasma TNAP activity is usually high in CKD following hyperparathyroidism, which increases bone remodelling. Remarkably, high TNAP activity is independently linked to mortality in CKD after adjustment for other usual risk factors [85]. TNAP-driven PPi hydrolysis could offer a rational explanation for this latter observation. Another frequent disease, which is associated with high level of AC is non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Patients affected by NAFLD are at high risk for CAC independently from diabetes, gender and age [86, 87]. NAFLD patients primarily die from cardiovascular (CV) incidents [88-90]. Liver fibrosis seems of particular relevance regarding CAC and CV mortality. Indeed, CAC score is significantly higher in NAFLD patients with an intermediate to high fibrosis index than in those with a low fibrosis index [91]. Furthermore, liver fibrosis is independently associated with CAC score in NAFLD patients [92, 93]. It has been reported that advanced fibrosis is also

a significant predictor of mortality from CV disease in NAFLD patients [94]. The expression of ABCC6 or PPi/Pi ratio have not been determined in patients with liver fibrosis. However, It has been shown using liver ^{32}P -NTP magnetic resonance imaging (MRI) that hepatic mitochondrial ATP homeostasis was impaired in patients with NAFLD [95, 96]. Therefore, one might speculate that decreased ATP production from the liver could lower ABCC6-mediated extracellular ATP release and in turn reduce systemic PPi levels, which may provide an explanation for increased AC in NAFLD patients.

9. Kidney stones related to ABCC6 deficiency

PPi was identified as an inhibitor of crystal formation more than 50 years ago [97] and has not been found to decrease in the urine of stone forming patients [98]. The prevalence of nephrolithiasis in the western population is 10% [99], close to prevalence of nephrolithiasis in PXE [100]. However, the female preponderance of PXE and the predominance of males for nephrolithiasis suggest that PXE could increase nephrolithiasis prevalence in women. Urinary PPi level is unknown in PXE. It might be influenced by its plasma level because PPi level is high in both the plasma and urine of patients with TNAP inactivation (hypophosphatasia) [101]. However, determination of fractional excretion of PPi will not be sufficient to understand renal transport of PPi in humans, which remains to be determined.

10. Therapeutic perspectives

To date treatment of the ABCC6 deficiency is still lacking. In line with the deleterious effect of low PPi/Pi ratio in relation to ABCC6 deficiency, therapeutics should aim at lowering Pi levels and at increasing PPi levels. Phosphate binders have been proposed for the treatment of PXE calcifying lesions following a successful pilot study with aluminium hydroxide in humans [102]. However a randomized controlled trial performed with sevelamer hydrochloride showed no improvement [103]. This unexpected result was attributed to the high magnesium (Mg) content in the placebo controls. Dietary supplementation with Mg in *Abcc6*^{-/-} mice was shown to contribute to reduce calcifications but the Mg concentrations used were more elevated than acceptable for human use [104]. Pharmacologic blockade of TNAP could be a valuable tool for limiting AC as this enzyme promotes the hydrolysis of PPi. However, the risk of bone demineralization, which is exemplified by the patients suffering from hypophosphatasia, may be a limitation [85]. PPi administration has been considered for the treatment of AC. Daily intraperitoneal injection was able to lower calcification in a mouse model of PXE [105]. Intraperitoneal administration of PPi reduces the calcium content of the arterial wall of uremic rats without affecting bone mineralization [106]. Orally administered PPi was able to enter blood circulation in humans and mice. Oral gavage of mice with PPi was shown to reduce calcification both in *Abcc6*^{-/-} and *Enpp1*^{-/-} mice [63]. Restoration of ABCC6 function with chemical chaperone 4-phenylbutyrate treatment in case of localisation deficient disease caused by ABCC6 mutants was also shown to be effective because it rescued injury-induced dystrophic cardiac calcifications [107, 108]. Some bisphosphonate, non-hydrolysable analogs of PPi, prevents calcification induced by excess Vitamin D in rats [109]. However, this effect has never been confirmed in humans where bisphosphonates are used to reduce bone formation. Some soluble forms of ENPP1 were proposed as treatment to increase circulating PPi. Such treatment displayed efficacy to prevent calcification in *Enpp1*^{-/-} mice [110] and could theoretically be used in the context of ABCC6 deficiency. Finally, experimental data reported that vitamin K intake could improve soft tissue's ectopic calcifications due to the use of anti-vitamin K drugs [111, 112]. However, the addition of vitamin K2 to the diet of *Abcc6*^{-/-} mice did not significantly modify the calcifications [52, 53].

11. Conclusions

In conclusion, current results suggest that ABCC6-dependent plasmatic PPi levels are the major determinant of soft tissue mineralization in PXE, but also hint at a PPi independent unknown mechanism, by which ABCC6 prevents ectopic mineralization under physiologic conditions. ABCC6 involvement in the metabolism of the extracellular nucleotides, which play a central role for cellular energy, autocrine/paracrine and possibly remote signalizations points to a possible role of purinergic signalling in the development of arterial calcifications in PXE patients. The understanding of the biomineralization process base on rare monogenic calcifying diseases sheds light on arterial calcifications and high cardiovascular mortality of CKD and NAFLD, which are far more frequent diseases, and could pave the way for therapeutic solutions.

Acknowledgments: OLS: NIH grants HL108249 and P20GM113134; AL, GL and GF: grants from the university hospital of Nice

Author contributions: GF and AL wrote, collected and edited the various contributions from the co-authors whereas GL, OLS and GK critically examined and provided additional overall editing of the final manuscript. In details, OLS and GL contributed to “brief history of the discovery of ABCC6 or pseudoxanthoma elasticum: the story of a “misnamed” disease”, “vascular lesions of PXE” and “lessons from transgenic mice”. TA and FS contributed to “molecular aspects of ABCC6”, “pathophysiology of ABCC6”. GF and AL contributed to “ABCC6 in the context of biomineralization”, “insight from ABCC6 into vascular calcifications of metabolic diseases”, “kidney stones” and “therapeutic perspectives”.

Conflict of interest: The author declares no conflict of interest.

1. References

1. Gheduzzi, D.; Sammarco, R.; Quaglino, D.; Bercovitch, L.; Terry, S.; Taylor, W.; Ronchetti, I. P., Extracutaneous ultrastructural alterations in pseudoxanthoma elasticum. *Ultrastruct Pathol* 2003, 27, (6), 375-84.
2. Miki, K.; Yuri, T.; Takeda, N.; Takehana, K.; Iwasaka, T.; Tsubura, A., An autopsy case of pseudoxanthoma elasticum: histochemical characteristics. *Med Mol Morphol* 2007, 40, (3), 172-7.
3. Balzer, F., Recherches sur les caractères anatomiques du xanthelasma. *Arch Physiol (Serie 3)* 1884, 4, 65-80.
4. Chauffard, M. A., Xanthélasma disséminé et symétrique et sans insuffisance hépatique. *Bull. Soc. Med. Paris (Ser 3)* 1889, 6, 412-419.
5. Rigal, D., Observation pour servir à l'histoire de la chéloïde diffuse xanthélasmique. *Ann Dermatol Syphilol* 1881, 2, 491-501.
6. Darier, J., Pseudo-xanthome élastique. III ème congrès Intern de Dermat de Londres 1896, 289-295.
7. Werther, über pseudoxanthoma elasticum. *Arch. Dermatol. Syph.* 1904, 69, 23-36.
8. Lebowitz, M.; Neldner, K.; Pope, F. M.; De Paepe, A.; Christiano, A. M.; Boyd, C. D.; Uitto, J.; McKusick, V. A., Classification of pseudoxanthoma elasticum: report of a consensus conference. *J Am Acad Dermatol* 1994, 30, (1), 103-7.

9. Leftheriotis, G.; Omarjee, L.; Le Saux, O.; Henrion, D.; Abraham, P.; Prunier, F.; Willoteaux, S.; Martin, L., The vascular phenotype in Pseudoxanthoma elasticum and related disorders: contribution of a genetic disease to the understanding of vascular calcification. *Front Genet* 2013, 4, 4.
10. Kranenburg, G.; de Jong, P. A.; Mali, W. P.; Attrach, M.; Visseren, F. L.; Spiering, W., Prevalence and severity of arterial calcifications in pseudoxanthoma elasticum (PXE) compared to hospital controls. Novel insights into the vascular phenotype of PXE. *Atherosclerosis* 2017, 256, 7-14.
11. Leftheriotis, G.; Abraham, P.; Le Corre, Y.; Le Saux, O.; Henrion, D.; Ducluzeau, P. H.; Prunier, F.; Martin, L., Relationship between ankle brachial index and arterial remodeling in pseudoxanthoma elasticum. *J Vasc Surg* 2011, 54, (5), 1390-4.
12. Le Saux, O.; Bunda, S.; VanWart, C. M.; Douet, V.; Got, L.; Martin, L.; Hinek, A., Serum factors from pseudoxanthoma elasticum patients alter elastic fiber formation in vitro. *J Invest Dermatol* 2006, 126, (7), 1497-505.
13. Boutouyrie, P.; Germain, D. P.; Tropeano, A. I.; Laloux, B.; Carezzi, F.; Zidi, M.; Jeunemaitre, X.; Laurent, S., Compressibility of the carotid artery in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Hypertension* 2001, 38, (5), 1181-4.
14. Kauffenstein, G.; Pizard, A.; Le Corre, Y.; Vessieres, E.; Grimaud, L.; Toutain, B.; Labat, C.; Mauras, Y.; Gorgels, T. G.; Bergen, A. A.; Le Saux, O.; Lacolley, P.; Leftheriotis, G.; Henrion, D.; Martin, L., Disseminated arterial calcification and enhanced myogenic response are associated with abcc6 deficiency in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, 34, (5), 1045-56.
15. Martin, L.; Hoppe, E.; Kauffenstein, G.; Omarjee, L.; Navasiolava, N.; Henni, S.; Willoteaux, S.; Leftheriotis, G., Early arterial calcification does not correlate with bone loss in pseudoxanthoma elasticum. *Bone* 2017, 103, 88-92.
16. Persy, V.; D'Haese, P., Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends in molecular medicine* 2009, 15, (9), 405-16.
17. Plomp, A. S.; Bergen, A. A.; Florijn, R. J.; Terry, S. F.; Toonstra, J.; van Dijk, M. R.; de Jong, P. T., Pseudoxanthoma elasticum: Wide phenotypic variation in homozygotes and no signs in heterozygotes for the c.3775delT mutation in ABCC6. *Genet Med* 2009, 11, (12), 852-8.
18. Finger, R. P.; Charbel Issa, P.; Ladewig, M. S.; Gotting, C.; Szliska, C.; Scholl, H. P.; Holz, F. G., Pseudoxanthoma elasticum: genetics, clinical manifestations and therapeutic approaches. *Surv Ophthalmol* 2009, 54, (2), 272-85.
19. Prunier, F.; Terrien, G.; Le Corre, Y.; Apana, A. L.; Biere, L.; Kauffenstein, G.; Furber, A.; Bergen, A. A.; Gorgels, T. G.; Le Saux, O.; Leftheriotis, G.; Martin, L., Pseudoxanthoma elasticum: cardiac findings in patients and Abcc6-deficient mouse model. *PLoS One* 2013, 8, (7), e68700.
20. Klement, J. F.; Matsuzaki, Y.; Jiang, Q. J.; Terlizzi, J.; Choi, H. Y.; Fujimoto, N.; Li, K.; Pulkkinen, L.; Birk, D. E.; Sundberg, J. P.; Uitto, J., Targeted ablation of the abcc6 gene results in ectopic mineralization of connective tissues. *Molecular and cellular biology* 2005, 25, (18), 8299-310.
21. Gorgels, T. G.; Hu, X.; Scheffer, G. L.; van der Wal, A. C.; Toonstra, J.; de Jong, P. T.; van Kuppevelt, T. H.; Levelt, C. N.; de Wolf, A.; Loves, W. J.; Scheper, R. J.; Peek, R.; Bergen, A. A., Disruption of Abcc6 in the mouse: novel insight in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Hum Mol Genet* 2005, 14, (13), 1763-73.

22. Le Corre, Y.; Le Saux, O.; Froeliger, F.; Libouban, H.; Kauffenstein, G.; Willoteaux, S.; Leftheriotis, G.; Martin, L., Quantification of the calcification phenotype of Abcc6-deficient mice with microcomputed tomography. *Am J Pathol* 2012, 180, (6), 2208-13.
23. Kupetsky, E. A.; Rincon, F.; Uitto, J., Rate of change of carotid intima-media thickness with magnesium administration in Abcc6(-)/(-) mice. *Clin Transl Sci* 2013, 6, (6), 485-6.
24. Meng, H.; Vera, I.; Che, N.; Wang, X.; Wang, S. S.; Ingram-Drake, L.; Schadt, E. E.; Drake, T. A.; Lusis, A. J., Identification of Abcc6 as the major causal gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, (11), 4530-5.
25. Uitto, J.; Li, Q.; Jiang, Q., Pseudoxanthoma elasticum: molecular genetics and putative pathomechanisms. *J Invest Dermatol* 2010, 130, (3), 661-70.
26. Le Saux, O.; Urban, Z.; Tschuch, C.; Csiszar, K.; Bacchelli, B.; Quaglino, D.; Pasquali-Ronchetti, I.; Pope, F. M.; Richards, A.; Terry, S.; Bercovitch, L.; de Paepe, A.; Boyd, C. D., Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. *Nat Genet* 2000, 25, (2), 223-7.
27. Symmons, O.; Varadi, A.; Aranyi, T., How segmental duplications shape our genome: recent evolution of ABCC6 and PKD1 Mendelian disease genes. *Mol Biol Evol* 2008, 25, (12), 2601-13.
28. Pulkkinen, L.; Nakano, A.; Ringpfeil, F.; Uitto, J., Identification of ABCC6 pseudogenes on human chromosome 16p: implications for mutation detection in pseudoxanthoma elasticum. *Hum Genet* 2001, 109, (3), 356-65.
29. Aranyi, T.; Ratajewski, M.; Bardoczy, V.; Pulaski, L.; Bors, A.; Tordai, A.; Varadi, A., Identification of a DNA methylation-dependent activator sequence in the pseudoxanthoma elasticum gene, ABCC6. *J Biol Chem* 2005, 280, (19), 18643-50.
30. de Boussac, H.; Ratajewski, M.; Sachrajda, I.; Koblos, G.; Tordai, A.; Pulaski, L.; Buday, L.; Varadi, A.; Aranyi, T., The ERK1/2-hepatocyte nuclear factor 4alpha axis regulates human ABCC6 gene expression in hepatocytes. *J Biol Chem* 2010, 285, (30), 22800-8.
31. Douet, V.; VanWart, C. M.; Heller, M. B.; Reinhard, S.; Le Saux, O., HNF4alpha and NF-E2 are key transcriptional regulators of the murine Abcc6 gene expression. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1759, (8-9), 426-
- 36.
32. Ratajewski, M.; de Boussac, H.; Sachrajda, I.; Bacquet, C.; Kovacs, T.; Varadi, A.; Pulaski, L.; Aranyi, T., ABCC6 Expression Is Regulated by CCAAT/Enhancer-Binding Protein Activating a Primate-Specific Sequence Located in the First Intron of the Gene. *J Invest Dermatol* 2012.
33. Jiang, Q.; Matsuzaki, Y.; Li, K.; Uitto, J., Transcriptional regulation and characterization of the promoter region of the human ABCC6 gene. *J Invest Dermatol* 2006, 126, (2), 325-35.
34. Martin, L.; Douet, V.; VanWart, C. M.; Heller, M. B.; Le Saux, O., A mouse model of beta-thalassemia shows a liver-specific down-regulation of Abcc6 expression. *Am J Pathol* 2011, 178, (2), 774-83.
35. Fabbri, E.; Forni, G. L.; Guerrini, G.; Borgna-Pignatti, C., Pseudoxanthoma-elasticum-like syndrome and thalassemia: an update. *Dermatol Online J* 2009, 15, (7), 7.

36. Ilias, A.; Urban, Z.; Seidl, T. L.; Le Saux, O.; Sinko, E.; Boyd, C. D.; Sarkadi, B.; Varadi, A., Loss of ATPdependent transport activity in pseudoxanthoma elasticum-associated mutants of human ABCC6 (MRP6). *J Biol Chem* 2002, 277, (19), 16860-7.
37. Madon, J.; Hagenbuch, B.; Landmann, L.; Meier, P. J.; Stieger, B., Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* 2000, 57, (3), 634-41.
38. Beck, K.; Hayashi, K.; Dang, K.; Hayashi, M.; Boyd, C. D., Analysis of ABCC6 (MRP6) in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 2005, 123, (4-5), 517-28.
39. Kool, M.; van der Linden, M.; de Haas, M.; Baas, F.; Borst, P., Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res* 1999, 59, (1), 175-82.
40. Maher, J. M.; Cherrington, N. J.; Slitt, A. L.; Klaassen, C. D., Tissue distribution and induction of the rat multidrug resistance-associated proteins 5 and 6. *Life Sci* 2006, 78, (19), 2219-25.
41. Maher, J. M.; Slitt, A. L.; Cherrington, N. J.; Cheng, X.; Klaassen, C. D., Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice. *Drug Metab Dispos* 2005, 33, (7), 947-55.
42. Matsuzaki, Y.; Nakano, A.; Jiang, Q. J.; Pulkkinen, L.; Uitto, J., Tissue-specific expression of the ABCC6 gene. *J Invest Dermatol* 2005, 125, (5), 900-5.
43. Pomozi, V.; Le Saux, O.; Brampton, C.; Apana, A.; Ilias, A.; Szeri, F.; Martin, L.; Monostory, K.; Paku, S.; Sarkadi, B.; Szakacs, G.; Varadi, A., ABCC6 is a basolateral plasma membrane protein. *Circ Res* 2013, 112, (11), e148-51.
44. Beck, K.; Hayashi, K.; Nishiguchi, B.; Le Saux, O.; Hayashi, M.; Boyd, C. D., The distribution of Abcc6 in normal mouse tissues suggests multiple functions for this ABC transporter. *J Histochem Cytochem* 2003, 51, (7), 887-902.
45. Belinsky, M. G.; Kruh, G. D., MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *British journal of cancer* 1999, 80, (9), 1342-9.
46. Scheffer, G. L.; Hu, X.; Pijnenborg, A. C.; Wijnholds, J.; Bergen, A. A.; Scheper, R. J., MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2002, 82, (4), 515-8.
47. Li, Q.; Kingman, J.; van de Wetering, K.; Tannouri, S.; Sundberg, J. P.; Uitto, J., Abcc6 Knockout Rat Model Highlights the Role of Liver in PPI Homeostasis in Pseudoxanthoma Elasticum. *J Invest Dermatol* 2017, 137, (5), 1025-1032.
48. Jiang, Q.; Endo, M.; Dibra, F.; Wang, K.; Uitto, J., Pseudoxanthoma elasticum is a metabolic disease. *J Invest Dermatol* 2009, 129, (2), 348-54.
49. Jiang, Q.; Oldenburg, R.; Otsuru, S.; Grand-Pierre, A. E.; Horwitz, E. M.; Uitto, J., Parabiotic heterogenetic pairing of Abcc6^{-/-}/Rag1^{-/-} mice and their wild-type counterparts halts ectopic mineralization in a murine model of pseudoxanthoma elasticum. *Am J Pathol* 2010, 176, (4), 1855-62.

50. Li, Q.; Grange, D. K.; Armstrong, N. L.; Whelan, A. J.; Hurley, M. Y.; Rishavy, M. A.; Hallgren, K. W.; Berkner, K. L.; Schurgers, L. J.; Jiang, Q.; Uitto, J., Mutations in the GGCX and ABCC6 genes in a family with pseudoxanthoma elasticum-like phenotypes. *J Invest Dermatol* 2009, 129, (3), 553-63.
51. Vanakker, O. M.; Martin, L.; Gheduzzi, D.; Leroy, B. P.; Loeys, B. L.; Guerci, V. I.; Matthys, D.; Terry, S. F.; Coucke, P. J.; Pasquali-Ronchetti, I.; De Paepe, A., Pseudoxanthoma elasticum-like phenotype with cutis laxa and multiple coagulation factor deficiency represents a separate genetic entity. *J Invest Dermatol* 2007, 127, (3), 581-7.
52. Jiang, Q.; Li, Q.; Grand-Pierre, A. E.; Schurgers, L. J.; Uitto, J., Administration of vitamin K does not counteract the ectopic mineralization of connective tissues in *Abcc6* (-/-) mice, a model for pseudoxanthoma elasticum. *Cell Cycle* 2011, 10, (4), 701-7.
53. Brampton, C.; Yamaguchi, Y.; Vanakker, O.; Van Laer, L.; Chen, L. H.; Thakore, M.; De Paepe, A.; Pomozi, V.; Szabo, P. T.; Martin, L.; Varadi, A.; Le Saux, O., Vitamin K does not prevent soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum. *Cell Cycle* 2011, 10, (11), 1810-20.
54. Jansen, R. S.; Duijst, S.; Mahakena, S.; Sommer, D.; Szeri, F.; Varadi, A.; Plomp, A.; Bergen, A. A.; Oude Elferink, R. P.; Borst, P.; van de Wetering, K., *ABCC6*-mediated ATP secretion by the liver is the main source of the mineralization inhibitor inorganic pyrophosphate in the systemic circulation-brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014, 34, (9), 1985-9.
55. Jansen, R. S.; Kucukosmanoglu, A.; de Haas, M.; Saphu, S.; Otero, J. A.; Hegman, I. E.; Bergen, A. A.; Gorgels, T. G.; Borst, P.; van de Wetering, K., *ABCC6* prevents ectopic mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110, (50), 20206-11.
56. Abraham, E. H.; Prat, A. G.; Gerweck, L.; Seneveratne, T.; Arceci, R. J.; Kramer, R.; Guidotti, G.; Cantiello, H. F., The multidrug resistance (*mdr1*) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90, (1), 312-6.
57. Al-Awqati, Q., Regulation of ion channels by ABC transporters that secrete ATP. *Science* 1995, 269, (5225), 805-6.
58. Rutsch, F.; Ruf, N.; Vaingankar, S.; Toliat, M. R.; Suk, A.; Hohne, W.; Schauer, G.; Lehmann, M.; Roscioli, T.; Schnabel, D.; Epplen, J. T.; Knisely, A.; Superti-Furga, A.; McGill, J.; Filippone, M.; Sinaiko, A. R.; Vallance, H.; Hinrichs, B.; Smith, W.; Ferre, M.; Terkeltaub, R.; Nurnberg, P., Mutations in *ENPP1* are associated with 'idiopathic' infantile arterial calcification. *Nat Genet* 2003, 34, (4), 379-81.
59. St Hilaire, C.; Ziegler, S. G.; Markello, T. C.; Brusco, A.; Groden, C.; Gill, F.; Carlson-Donohoe, H.; Lederman, R. J.; Chen, M. Y.; Yang, D.; Siegenthaler, M. P.; Arduino, C.; Mancini, C.; Freudenthal, B.; Stanescu, H. C.; Zdebik, A. A.; Chaganti, R. K.; Nussbaum, R. L.; Kleta, R.; Gahl, W. A.; Boehm, M., *NT5E* mutations and arterial calcifications. *N Engl J Med* 2011, 364, (5), 432-42.
60. Fleisch, H.; Russell, R. G.; Straumann, F., Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966, 212, (5065), 901-3.
61. Lomashvili, K. A.; Narisawa, S.; Millan, J. L.; O'Neill, W. C., Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int* 2014, 85, (6), 1351-6.
62. Ziegler, S. G.; Ferreira, C. R.; MacFarlane, E. G.; Riddle, R. C.; Tomlinson, R. E.; Chew, E. Y.; Martin, L.; Ma, C. T.; Sergienko, E.; Pinkerton, A. B.; Millan, J. L.; Gahl, W. A.; Dietz, H. C., Ectopic calcification

in pseudoxanthoma elasticum responds to inhibition of tissue-nonspecific alkaline phosphatase. *Sci Transl Med* 2017, 9, (393).

63. Dedinszki, D.; Szeri, F.; Kozak, E.; Pomozi, V.; Tokesi, N.; Mezei, T. R.; Merczel, K.; Letavernier, E.; Tang, E.; Le Saux, O.; Aranyi, T.; van de Wetering, K.; Varadi, A., Oral administration of pyrophosphate inhibits connective tissue calcification. *EMBO molecular medicine* 2017.

64. Ho, A. M.; Johnson, M. D.; Kingsley, D. M., Role of the Mouse *ank* Gene in Control of Tissue Calcification and Arthritis. 2000.

65. Gorman, M. W.; Feigl, E. O.; Buffington, C. W., Human plasma ATP concentration. *Clin Chem* 2007,

53, (2), 318-25.

66. Mortensen, S. P.; Thaning, P.; Nyberg, M.; Saltin, B.; Hellsten, Y., Local release of ATP into the arterial inflow and venous drainage of human skeletal muscle: insight from ATP determination with the intravascular microdialysis technique. *J Physiol* 2011, 589, (Pt 7), 1847-57.

67. Lohman, A. W.; Billaud, M.; Isakson, B. E., Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. In *Cardiovascular research, 2012*; Vol. 95, pp 269-80.

68. Zhao, J.; Kingman, J.; Sundberg, J. P.; Uitto, J.; Li, Q., Plasma PPi Deficiency is the Major, But Not the Exclusive, Cause of Ectopic Mineralization in an *Abcc6*^{-/-} Mouse Model of PXE. *J Invest Dermatol* 2017.

69. Alem, A. M.; Sherrard, D. J.; Gillen, D. L.; Weiss, N. S.; Beresford, S. A.; Heckbert, S. R.; Wong, C.; Stehman-Breen, C., Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 2000, 58, (1), 396-9.

70. Stehman-Breen, C. O.; Sherrard, D. J.; Alem, A. M.; Gillen, D. L.; Heckbert, S. R.; Wong, C. S.; Ball, A.; Weiss, N. S., Risk factors for hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 2000, 58, (5), 2200-5.

71. Schulz, E.; Arfai, K.; Liu, X.; Sayre, J.; Gilsanz, V., Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89, (9), 4246-53.

72. Kiel, D. P.; Kauppila, L. I.; Cupples, L. A.; Hannan, M. T.; O'Donnell, C. J.; Wilson, P. W., Bone loss and the progression of abdominal aortic calcification over a 25 year period: the Framingham Heart Study. *Calcif Tissue Int* 2001, 68, (5), 271-6.

73. Vanholder, R.; Annemans, L.; Brown, E.; Gansevoort, R.; Gout-Zwart, J. J.; Lameire, N.; Morton, R. L.; Oberbauer, R.; Postma, M. J.; Tonelli, M.; Biesen, W. V.; Zoccali, C.; European Kidney Health, A., Reducing the costs of chronic kidney disease while delivering quality health care: a call to action. *Nat Rev Nephrol* 2017, 13, (7), 393-409.

74. Go, A. S.; Chertow, G. M.; Fan, D.; McCulloch, C. E.; Hsu, C. Y., Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004, 351, (13), 1296-305.

75. Stenvinkel, P., Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med* 2010, 268, (5), 456-67.

76. Agatston, A. S.; Janowitz, W. R.; Hildner, F. J.; Zusmer, N. R.; Viamonte, M., Jr.; Detrano, R., Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990, 15, (4), 827-32.
77. Budoff, M. J.; Shaw, L. J.; Liu, S. T.; Weinstein, S. R.; Mosler, T. P.; Tseng, P. H.; Flores, F. R.; Callister, T. Q.; Raggi, P.; Berman, D. S., Long-term prognosis associated with coronary calcification: observations from a registry of 25,253 patients. *J Am Coll Cardiol* 2007, 49, (18), 1860-70.
78. Braun, J.; Oldendorf, M.; Moshage, W.; Heidler, R.; Zeitler, E.; Luft, F. C., Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996, 27, (3), 394-401.
79. Mitsnefes, M. M., Cardiovascular disease in children with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2012, 23, (4), 578-85.
80. Moranne, O.; Froissart, M.; Rossert, J.; Gauci, C.; Boffa, J. J.; Haymann, J. P.; M'Rad M, B.; Jacquot, C.; Houillier, P.; Stengel, B.; Fouqueray, B., Timing of onset of CKD-related metabolic complications. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20, (1), 164-71.
81. Lomashvili, K. A.; Khawandi, W.; O'Neill, W. C., Reduced plasma pyrophosphate levels in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16, (8), 2495-500.
82. O'Neill, W. C.; Sigrist, M. K.; McIntyre, C. W., Plasma pyrophosphate and vascular calcification in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2010, 25, (1), 187-91.
83. Lau, W. L.; Liu, S.; Vaziri, N. D., Chronic kidney disease results in deficiency of ABCC6, the novel inhibitor of vascular calcification. *Am J Nephrol* 2014, 40, (1), 51-5.
84. Lomashvili, K. A.; Garg, P.; Narisawa, S.; Millan, J. L.; O'Neill, W. C., Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int* 2008, 73, (9), 1024-30.
85. Haarhaus, M.; Brandenburg, V.; Kalantar-Zadeh, K.; Stenvinkel, P.; Magnusson, P., Alkaline phosphatase: a novel treatment target for cardiovascular disease in CKD. *Nat Rev Nephrol* 2017, 13, (7), 429-442.
86. Chen, C. H.; Nien, C. K.; Yang, C. C.; Yeh, Y. H., Association between nonalcoholic fatty liver disease and coronary artery calcification. *Dig Dis Sci* 2010, 55, (6), 1752-60.
87. Assy, N.; Djibre, A.; Farah, R.; Grosovski, M.; Marmor, A., Presence of coronary plaques in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology* 2010, 254, (2), 393-400.
88. Targher, G.; Arcaro, G., Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007, 191, (2), 235-40.
89. Lazo, M.; Hernaez, R.; Bonekamp, S.; Kamel, I. R.; Brancati, F. L.; Guallar, E.; Clark, J. M., Nonalcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *Bmj* 2011, 343, d6891.
90. Stepanova, M.; Younossi, Z. M., Independent association between nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease in the US population. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012, 10, (6), 646-50.

91. Ishiba, H.; Sumida, Y.; Kataoka, S.; Kuroda, M.; Akabame, S.; Tomiyasu, K.; Tanaka, M.; Arai, M.; Taketani, H.; Seko, Y.; Okajima, A.; Hara, T.; Umemura, A.; Nishikawa, T.; Yamaguchi, K.; Moriguchi, M.; Mitsuyoshi, H.; Yasui, K.; Itoh, Y., Association of coronary artery calcification with liver fibrosis in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2016, 46, (11), 1107-1117.
92. Dogan, S.; Celikbilek, M.; Yilmaz, Y. K.; Sarikaya, S.; Zararsiz, G.; Serin, H. I.; Borekci, E.; Akyol, L.; Pirti, I.; Davarci, S. E., Association between liver fibrosis and coronary heart disease risk in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2015, 27, (3), 298-304.
93. You, S. C.; Kim, K. J.; Kim, S. U.; Kim, B. K.; Park, J. Y.; Kim, D. Y.; Ahn, S. H.; Han, K. H., Hepatic fibrosis assessed using transient elastography independently associated with coronary artery calcification. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2015, 30, (10), 1536-42.
94. Kim, D.; Kim, W. R.; Kim, H. J.; Therneau, T. M., Association between noninvasive fibrosis markers and mortality among adults with nonalcoholic fatty liver disease in the United States. *Hepatology* 2013, 57, (4), 1357-65.
95. Cortez-Pinto, H.; Chatham, J.; Chacko, V. P.; Arnold, C.; Rashid, A.; Diehl, A. M., Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 1999, 282, (17), 1659-64.
96. Koliaki, C.; Roden, M., Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Cell Endocrinol* 2013, 379, (1-2), 35-42.
97. Fleisch, H.; Bisaz, S., Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 1962, 195, 911.
98. Russell, R. G.; Hodgkinson, A., The urinary excretion of inorganic pyrophosphate by normal subjects and patients with renal calculus. *Clin Sci* 1966, 31, (1), 51-62.
99. Sorokin, I.; Mamoulakis, C.; Miyazawa, K.; Rodgers, A.; Talati, J.; Lotan, Y., Epidemiology of stone disease across the world. *World J Urol* 2017.
100. Legrand, A.; Cornez, L.; Samkari, W.; Mazzella, J. M.; Venisse, A.; Boccio, V.; Auribault, K.; Keren, B.; Benistan, K.; Germain, D. P.; Frank, M.; Jeunemaitre, X.; Albuissou, J., Mutation spectrum in the *ABCC6* gene and genotype-phenotype correlations in a French cohort with pseudoxanthoma elasticum. *Genet Med* 2017, 19, (8), 909-917.
101. Russell, R. G.; Bisaz, S.; Donath, A.; Morgan, D. B.; Fleisch, H., Inorganic pyrophosphate in plasma in normal persons and in patients with hypophosphatasia, osteogenesis imperfecta, and other disorders of bone. *J Clin Invest* 1971, 50, (5), 961-9.
102. Sherer, D. W.; Singer, G.; Uribarri, J.; Phelps, R. G.; Sapadin, A. N.; Freund, K. B.; Yanuzzi, L.; Fuchs, W.; Lebwohl, M., Oral phosphate binders in the treatment of pseudoxanthoma elasticum. *J Am Acad Dermatol* 2005, 53, (4), 610-5.
103. Yoo, J. Y.; Blum, R. R.; Singer, G. K.; Stern, D. K.; Emanuel, P. O.; Fuchs, W.; Phelps, R. G.; Terry, S. F.; Lebwohl, M. G., A randomized controlled trial of oral phosphate binders in the treatment of pseudoxanthoma elasticum. *J Am Acad Dermatol* 2011, 65, (2), 341-8.

104. LaRusso, J.; Li, Q.; Jiang, Q.; Uitto, J., Elevated dietary magnesium prevents connective tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum (Abcc6(-/-)). *J Invest Dermatol* 2009, 129, (6), 1388-94.
105. Pomozi, V.; Brampton, C.; van de Wetering, K.; Zoll, J.; Calio, B.; Pham, K.; Owens, J. B.; Marh, J.; Moisyadi, S.; Varadi, A.; Martin, L.; Bauer, C.; Erdmann, J.; Aherrahrou, Z.; Le Saux, O., Pyrophosphate Supplementation Prevents Chronic and Acute Calcification in ABCC6-Deficient Mice. *Am J Pathol* 2017, 187, (6), 1258-1272.
106. O'Neill, W. C.; Lomashvili, K. A.; Malluche, H. H.; Faugere, M. C.; Riser, B. L., Treatment with pyrophosphate inhibits uremic vascular calcification. *Kidney Int* 2011, 79, (5), 512-7.
107. Pomozi, V.; Brampton, C.; Szeri, F.; Dedinszki, D.; Kozak, E.; van de Wetering, K.; Hopkins, H.; Martin, L.; Varadi, A.; Le Saux, O., Functional Rescue of ABCC6 Deficiency by 4-Phenylbutyrate Therapy Reduces Dystrophic Calcification in Abcc6-/- Mice. *J Invest Dermatol* 2017, 137, (3), 595-602.
108. Pomozi, V.; Brampton, C.; Fulop, K.; Chen, L. H.; Apana, A.; Li, Q.; Uitto, J.; Le Saux, O.; Varadi, A., Analysis of pseudoxanthoma elasticum-causing missense mutants of ABCC6 in vivo; pharmacological correction of the mislocalized proteins. *J Invest Dermatol* 2014, 134, (4), 946-53.
109. Francis, M. D.; Russell, R. G.; Fleisch, H., Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 1969, 165, (3899), 1264-6.
110. Albright, R. A.; Stabach, P.; Cao, W.; Kavanagh, D.; Mullen, I.; Braddock, A. A.; Covo, M. S.; Tehan, M.; Yang, G.; Cheng, Z.; Bouchard, K.; Yu, Z. X.; Thorn, S.; Wang, X.; Folta-Stogniew, E. J.; Negrete, A.; Sinusas, A. J.; Shiloach, J.; Zubal, G.; Madri, J. A.; De La Cruz, E. M.; Braddock, D. T., ENPP1-Fc prevents mortality and vascular calcifications in rodent model of generalized arterial calcification of infancy. *Nat Commun* 2015, 6, 10006.
111. Vermeer, C.; Braam, L., Role of K vitamins in the regulation of tissue calcification. *J Bone Miner Metab* 2001, 19, (4), 201-6.
112. Fodor, D.; Albu, A.; Poanta, L.; Porojan, M., Vitamin K and vascular calcifications. *Acta Physiol Hung* 2010, 97, (3), 256-66.

© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).