



**HAL**  
open science

# Surface characterizations to investigate osteoarticular mesenchymal tissues : new insights to monitor the extracellular matrix remodeling at the supramolecular level

Ilhem Lilia Jaabar

► **To cite this version:**

Ilhem Lilia Jaabar. Surface characterizations to investigate osteoarticular mesenchymal tissues : new insights to monitor the extracellular matrix remodeling at the supramolecular level. Rhumatology and musculoskeletal system. Sorbonne Université, 2022. English. NNT : 2022SORUS145 . tel-04099571

**HAL Id: tel-04099571**

**<https://theses.hal.science/tel-04099571v1>**

Submitted on 17 May 2023

**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.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale 397 – Physique et Chimie des Matériaux

*Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS) – CNRS UMR 7197*

*Centre de Recherche Saint-Antoine – INSERM UMR\_S938 – Equipe du Pr. F. Berenbaum*

*« Pathologies articulaires associées aux maladies métaboliques et à l'âge »*

---

## **Surface characterizations to investigate osteoarticular mesenchymal tissues: new insights to monitor the extracellular matrix remodeling at the supramolecular level**

---

Par Ilhem Lilia JAABAR

Thèse de doctorat de Physique et Chimie des Matériaux

Dirigée par le Dr Jessem LANDOULSI et le Pr Xavier HOUARD

Présentée et soutenue publiquement le 16 Mai 2022

Devant un jury composé de :

<b>Pr Touria COHEN-BOUHACINA</b>	Professeur	Rapporteur
<b>Dr Frédéric MALLEIN-GERIN</b>	Directeur de Recherches	Rapporteur
<b>Pr Christine DUPONT</b>	Professeur	Examineur
<b>Pr Patricia ALBANESE</b>	Professeur	Examineur
<b>Dr Thibaud CORADIN</b>	Directeur de Recherches	Examineur
<b>Pr Francis BERENBAUM</b>	Professeur / Praticien	Invité
<b>Dr Jessem LANDOULSI</b>	Maître de Conférence	Directeur de thèse
<b>Pr Xavier HOUARD</b>	Professeur	Co-Directeur de thèse



## Résumé

Un tissu conjonctif est un ensemble coopératif de cellules différenciées enchevêtrées dans une matrice extracellulaire (ECM). Cette dernière, particulièrement abondante, se compose principalement de protéines, telles que les collagènes, et d'un gel visqueux constitué d'eau et de protéoglycanes chargés négativement. Tous les tissus conjonctifs subissent un renouvellement constant de leur ECM, préservant ainsi l'intégrité et les propriétés des tissus. Des perturbations dans le remodelage de l'ECM, en termes de composition ou de structure supramoléculaire, peuvent avoir un impact significatif sur l'intégrité du tissu et sur ses propriétés biomécaniques, entraînant ainsi des dysfonctionnements et le développement de pathologies. Cependant, le remodelage de l'ECM est souvent étudié par des techniques biochimiques standards qui ne permettent pas de fournir des informations à l'échelle supramoléculaire. Sonder l'organisation de l'ECM à cette échelle peut contribuer significativement à la compréhension de la nature des processus biologiques et physicochimiques impliqués dans le remodelage pathologique de l'ECM. Dans cet objectif, nous avons développé une approche méthodologique originale permettant la caractérisation de tissus biologiques par des techniques de caractérisation de surface telle que l'AFM et l'XPS.

Dans une première étude, l'AFM a été utilisé pour étudier l'effet de la procédure de réticulation UV/riboflavine sur la structure et les propriétés mécaniques de capsules d'épaule malades, qui sont principalement constituées de fibrilles de collagène de type I. Les résultats montrent que la procédure de réticulation a modifié les propriétés biomécaniques des capsules malades, en augmentant la rigidité des tissus sans modification de la structure et de la viabilité cellulaire.

Dans une deuxième étude, nous avons étudié le remodelage de l'ECM du cartilage articulaire humain au cours de l'arthrose. Pour ce faire, nous avons caractérisé la composition, la structure et les propriétés mécaniques à différents degrés de sévérité d'arthrose par XPS et AFM. Les résultats ont permis de mettre en évidence deux phases : (1) une tentative de réparation, et (2) une dégradation irréversible du cartilage. Par ailleurs, des modifications structurales similaires à celles observées dans le cartilage arthrosique ont été observées sur des échantillons non arthrosiques traités enzymatiquement. Nos travaux ont donc permis de souligner le rôle central de l'équilibre homéostatique sur la progression de l'arthrose.

Dans une troisième, un éventail de techniques de caractérisation moléculaire, biochimique et physicochimique a été utilisé pour déterminer la dynamique de minéralisation et les modifications de l'ECM au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Cette étude a permis de montrer que la différenciation hypertrophique des chondrocytes préhypertrophiques induit un remodelage de l'ECM qui précède la minéralisation. Les analyses chimiques ont, par ailleurs, révélé que les minéraux nouvellement formés sont de l'hydroxyapatite faiblement cristallisée. La cartographie chimique révèle également la présence de débris cellulaires riches en phosphore. Ces derniers semblent être générés par l'apoptose croissante des chondrocytes.



# Abstract

A connective tissue is a cooperative set of differentiated cells entangled in an extracellular matrix (ECM). The latter, which is particularly abundant, is composed mainly of proteins, such as collagens, and a viscous gel made up of water and negatively charged polysaccharides: proteoglycans. All connective tissues undergo a constant renewal of their ECM, thus preserving the integrity and properties of the tissue. Disturbances in ECM remodeling, in terms of composition or supramolecular structure, can have a significant impact on tissue integrity and biomechanical properties, leading to dysfunction and the development of pathologies. However, ECM remodeling is often studied by standard biochemical techniques that do not provide information at the supramolecular scale. Probing the organization of the ECM at this scale can contribute significantly to the understanding of the nature of the biological and physicochemical processes involved in pathological ECM remodeling. To this end, we have developed an original methodological approach allowing the characterization of biological tissues by surface characterization techniques such as AFM and XPS.

In a first study, AFM was used to study the effect of the UV/riboflavin cross-linking procedure on the structure and mechanical properties of diseased shoulder capsules, which are mainly composed of type I collagen fibrils. The results show that the cross-linking procedure modified the biomechanical properties of the diseased capsules, increasing tissue stiffness without altering the structure and cell viability.

In a second study, we investigated the remodeling of human articular cartilage ECM during OA. To do so, we characterized the composition, structure and mechanical properties at different degrees of OA severity by XPS and AFM. The results revealed 2 phases: (1) a repair attempt, and (2) an irreversible degradation of the cartilage. Moreover, structural modifications similar to those observed in osteoarthritic cartilage were observed on non-osteoarthritic samples treated with enzymes. Our work has thus highlighted the central role of homeostatic balance in the progression of OA.

In a third study, a range of molecular, biochemical and physicochemical characterization techniques were used to determine the mineralization dynamics and ECM modifications during hypertrophic differentiation of chondrocytes. This study showed that hypertrophic differentiation of prehypertrophic chondrocytes induces ECM remodeling that precedes mineralization. Chemical analyses further revealed that the newly formed minerals are weakly crystallized hydroxyapatite. Chemical mapping also reveals the presence of phosphorus-rich cellular debris. The latter seem to be generated by the increasing apoptosis of chondrocytes.



## Remerciements

Je tiens, avant toute chose, à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail pluridisciplinaire. Merci pour le temps et l'intérêt que vous avez consacré à mes travaux de recherche.

Je remercie chaleureusement le Pr Touria Cohen-Bouhacina et le Dr Frédéric Mallein-Gérin d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour avoir apporté toute leurs expertises lors de l'évaluation de ce manuscrit.

Je remercie également le Dr Thibaud Coradin pour nos différents échanges très instructifs durant mes 3 comités de suivi de thèse et d'avoir répondu favorablement à mon invitation pour être examinateur de mon travail de thèse.

Je remercie grandement les Pr Christine Dupont et Pr Patricia Albanese d'avoir accepté d'examiner ma thèse. Leurs expertises me seront précieuses.

Je tiens également à remercier le Dr Vincent Duprès pour ses conseils avisés et nos différents échanges durant mes 3 comités de suivi de thèse et nos différentes collaborations. Ce fut un grand plaisir de travailler avec toi.

J'adresse un grand merci aux Pr Hélène Pernot et Pr Francis Berenbaum pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe. Merci Francis pour votre enthousiasme et vos conseils avisés tout au long de ces 3 années de thèse. Merci également à Hélène pour sa gentillesse et sa bienveillance.

Je remercie chaleureusement mes directeurs de thèse, le Dr Jessem Landoulsi et le Pr Xavier Houard, pour m'avoir accompagné tout au long de ces 3 années (+ 7 mois) de thèse. Merci pour la confiance et l'estime que vous m'avez accordées, et ce, du premier au dernier jour. Merci de m'avoir poussé à me surpasser à chaque instant et pour tous vos conseils avisés. Merci à toi Jessem, pour avoir toujours su trouver les mots justes qui m'ont permis de murir aussi bien scientifiquement qu'humainement. Merci de m'avoir inculqué le goût de la rigueur et le dégoût des M&M's. Un grand merci également à toi Xavier, pour m'avoir toujours accompagné et challengé tout au long de ces années. Merci de m'avoir fait profiter de ton dynamisme et ton enthousiasme qui m'ont, plus d'une fois, remotivé.

Je tiens à remercier toutes ces personnes que j'ai pu rencontrer durant ces 3 années ( $\pm$  7 mois) sans qui cette sacrée aventure n'aurait pas été la même. Merci à Claire Attali pour tes paroles toujours rassurantes et ta grande bienveillance. Merci à Jérémie Sellam pour toujours avoir eu le bon mot, celui qui, en réunion d'équipe, nous fait soit rire soit réfléchir. Un énorme merci à vous, les 3 bouts de femme à qui je dois beaucoup : Kristell Wanherdrick, Audrey Pigenet et Laure Sudre. Au-delà du travail acharné de ces dernières années, je ne me suis jamais autant amusée. Je serais bien restée toute une vie à travailler à vos côtés, surtoit toi ma Krikri avec qui j'ai tant partagé.

Merci à Isabelle Vuillaume et Sonia Mbarek pour m'avoir accueilli si chaleureusement à mon arrivée et merci à Laetitia Valentin et Aurélien Chervalier d'avoir toujours répondu présent pour m'aider ou m'aiguiller.

Un immense merci à toutes celles et ceux qui ont égayé mes journées: Pauline, Indira, Charlène, Céline, Natalia, Yacine, Nadia, Sunny, Brittany et Jihye. Indira, Charlène et Pauline je ne vous remercierai jamais assez pour tout ces moments d'humanité partagés. Que les collègues d'un jour demeurent des amis de toujours. Céline et Yacine surtout ne changez jamais.

Aux anciennes et actuelles doctorantes et à toutes les étudiantes que j'ai eu la chance de cotoyer, Marion, Alice, Adeline, Marie, Coralie, Jaouhara, Juliette et Ines merci pour les bons moments passés. Je souhaite également bon courage aux nouvelles supers nanas fraîchement arrivées, Joanne et Fanny. Puisse le sort vous être favorable.

Merci également à toute l'équipe Le Bouc/Netchine avec qui nous partageons l'étage, plus particulièrement à Yves, Laurent, Clémence, Maud et Patricia.

Je remercie celles et ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail de thèse, François-Paul Ehkirch, Geoffroy Nourissat, Françoise Pillier, Romain Morichon, Antoine Miche, Christophe Méthivier, Vincent Humblot et l'ensemble de l'équipe de la PHEA.

Et enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien sans faille. Un grand merci à mes parents Elaïd et Moufida qui ont toujours cru en moi et à qui je dois tout, à ma sœur Sonia qui m'a encore et toujours encouragée et à mes frères Nizar et Malek qui se demandent encore ce que j'ai pu chercher durant ces trois dernières années mais qui n'ont jamais cessé de me motiver. Je finirai par remercier mon mari Rayan, toi, qui après ces quelques années, est devenu un de mes plus solides piliers.

إلى والديّ العيد ومفيدة جعبر ...

*A mes parents...*



*« Le véritable voyage de découverte  
ne consiste pas à chercher de nouveaux  
paysages, mais à avoir de nouveaux yeux. »  
Marcel Proust*





# Table des matières

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>9</b>
<b>Tableaux et figures .....</b>	<b>13</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre 1: Données Bibliographiques .....</b>	<b>21</b>
1.1. La matrice extracellulaire des tissus mésenchymateux.....	22
1.1.1. Composition de la matrice extracellulaire .....	23
1.1.1.1. Les différents types de collagènes présents dans l'ECM.....	23
1.1.1.2. Les différents types de protéoglycanes présents dans l'ECM .....	34
1.1.2. Influence des différents composés l'ECM sur la fibrillogenèse du collagène	39
1.1.3. Le remodelage de l'ECM .....	41
1.2. Le système ostéoarticulaire : une unité d'intérêt pour l'étude des tissus conjonctifs .....	44
1.2.1. La capsule articulaire .....	46
1.2.2.1. Le cartilage articulaire non calcifié .....	50
1.2.2.2. Le cartilage calcifié .....	55
1.3. La luxation et l'arthrose : deux affections ostéoarticulaires très rependues.....	56
1.3.1. La luxation d'épaule .....	56
1.3.2. L'arthrose.....	60
1.4. Caractérisations physico-chimiques et mécaniques de l'ECM .....	65
1.4.1. La microcopie avec marquage .....	66
1.4.2. La microscopie électronique.....	68
1.4.3. La microscopie sans marquage.....	70
1.4.4. La spectroscopie vibrationnelle .....	71
1.4.5. La spectroscopie de photoélectrons à rayons X.....	73
1.4.6. La microscopie à force atomique.....	78
1.5. Objectif de l'étude et stratégies d'investigation .....	83
<b>Chapitre 2 : Résultats .....</b>	<b>85</b>
Abstract.....	88
2.1. Introduction.....	89
2.2. Materials and methods .....	91
1.2.3. Sample preparation .....	91
1.2.4. Cell death detection .....	91
1.2.5. Atomic force microscopy .....	93
1.2.6. Data analysis.....	94
2.3. Results.....	97
2.3.1. Increased capsule stiffness after crosslinking procedure.....	97

2.3.2.	Increased capsule stiffness after crosslinking procedure.....	98
2.4.	Discussion .....	102
2.5.	Conclusion .....	104
<b>Chapitre 3 : Résultats .....</b>		<b>105</b>
Abstract....	.....	108
3.1.	Introduction.....	109
3.2.	Materials and methods .....	112
4.2.1.	Authorization .....	112
4.2.2.	Osteoarthritic human samples preparation .....	112
4.2.3.	Evaluation of OA grade by histology .....	112
4.2.4.	Enzymatic treatment .....	113
4.2.5.	X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).....	113
4.2.6.	Atomic force microscopy (AFM) .....	114
4.2.7.	Statistical Analysis .....	115
3.3.	Results.....	116
4.3.1.	Tissue chemical composition.....	116
4.3.2.	Tissue morphology .....	124
4.3.3.	Mechanical properties.....	128
4.3.4.	Tissue digestion .....	129
3.4.	Discussion .....	132
3.5.	Conclusion .....	137
<b>Chapitre 4 : Résultats .....</b>		<b>141</b>
Abstract....	.....	144
4.1.	Introduction.....	145
4.2.	Materials and methods .....	147
4.2.1.	Primary culture of murine articular chondrocytes .....	147
4.2.2.	RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR .....	148
4.2.3.	Protein extraction and protein assay .....	148
4.2.4.	Alkaline phosphatase activity assay .....	149
4.2.5.	Glycoaminoglycan assay .....	149
4.2.6.	MMP-13 enzymatic activity assay .....	149
4.2.7.	Cell calcification assay .....	149
4.2.8.	Western Blot (WB).....	150
4.2.9.	Cell death detection .....	150
4.2.10.	Immunofluorescence (IF) .....	150
4.2.11.	Atomic force microscopy (AFM).....	151
4.2.12.	Scanning electron microscopy – Energy- dispersive X-ray spectroscopy ...	151

4.2.13.	Infrared- Attenuated total reflectance spectroscopy (IR-ATR) .....	151
4.2.14.	X-ray powder diffraction (XRD) .....	152
4.2.15.	Statistical Analysis .....	152
4.3.	Results .....	153
4.4.1.	Progressive mineralization of chondrocyte matrix .....	153
4.4.2.	Increased alkaline phosphatase activity and cell death .....	157
4.4.	Discussion .....	163
4.4.1.	Mineralization of chondrocyte matrix .....	164
4.4.2.	Increase of Alkaline phosphatase activity .....	164
4.4.3.	Increase of chondrocyte death .....	164
4.4.4.	ECM remodeling .....	165
4.5.	Conclusion .....	168
	<b>Chapitre 5 : Discussion Générale et Perspectives .....</b>	<b>171</b>
	<b>Tableaux et Figures SI .....</b>	<b>186</b>
	<b>Appendices .....</b>	<b>209</b>
	<b>Communication orale et poster .....</b>	<b>209</b>
	Communication orale .....	209
	Communication poster .....	209
	<b>Activités annexes .....</b>	<b>210</b>
	Enseignement – Département de chimie UFR 926, Sorbonne Université .....	210
	Autres.....	210
	<b>Références .....</b>	<b>211</b>



## Liste des abréviations

*Dans un souci d'uniformisation, toutes les abréviations ont été définies en anglais.*

AC: Non-mineralized articular cartilage

Acan: Aggrecan

ACP: Amorphous calcium phosphate

Adamts: A Disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

AFM: Atomic force microscopy

ALP: Alkaline phosphatase

Ank: Ankylosis

ATR: Attenuated Total Reflectance

BMP: Bone morphogenetic protein

BSA: Bovine Serum Albumin

CLSM: Confocal laser scanning microscope

Comp: Cartilage Oligomeric Matrix Protein

Col2a1: Type II collagen alpha 1 chain

CS: Chondroitin sulfate

DDT: DL-Dithiothreitol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMMB: Dimethylmethylene blue assay

Dmp: Dentin matrix acidic phosphoprotein

DNA: Deoxyribonucleic acid

DS: Dermatan sulfate

EB: Binding energy

ECM: Extracellular matrix

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EDX: Energy dispersive X-ray spectroscopy

EK: Kinetic energy

FACIT: Fibril associated collagen with interrupted triple helixes

FGF: Fibroblast growth factors

FWHM: Full width at half maximum

FTIR: Fourier-transform infrared spectroscopy

GAG: Glycosaminoglycan

Glu: L-glutamine

GP: Growth plate  
HA: Hyaluronic acid  
HAP: Hydroxyapatite  
HAGL: Humeral Avulsion Glenohumeral Ligament  
Hprt: Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase  
HRP: Horseradish peroxidase  
HS: Herapan sulfate  
Hyal: Hyaluronidase  
Hyp: Hypertrophic  
IGF: Insulin growth factor  
Ihh: Indian hedgehog  
IMACs: Immature articular chondrocytes  
IL: Interleukin  
IR: Infrared  
ITS: Insulin-transferrin-selenium  
KS : Keratan sulfate  
MGP: Matrix Gla protein  
MMP: Metalloproteinase  
MV: Matrix Vesicle  
NAMPT: Nicotinamide phosphoribosyltransferase  
OA: Osteoarthritis  
OC: Osteocalcin  
OCP: Octacalcium phosphate  
PBS: Phosphate-buffered saline  
PCM: Pericellular matrix  
PCR: Polymerase chain reaction  
PFA: Paraformaldehyde  
PG: Proteoglycan  
PGE2: Prostaglandin E2  
Prehyp: Prehypertrophic  
PRELP: proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein  
PS: Penicillin-streptomycin  
PTHrP: Parathyroid hormone-related proteins  
pyAF: Python atomic force

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay  
RNA: Ribonucleic acid  
RT: Reverse Transcriptase  
RT: Room temperature  
Runxs: Runt-related transcription factors  
SIBLING: Small integrin-binding ligand N-glycosylated  
SEM: Scanning electron spectroscopy  
SNL: Silicon nitride lever  
SOX: Sry-type HMG box  
SPP: Secreted Phosphoprotein  
TBST: TBST Tris Buffered Saline with Tween 20  
TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase  
TGF $\beta$ : Transforming growth factor beta  
TiMPs: Tissue inhibitors of metalloproteinases  
TNF: Tumor necrosis factor  
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling  
Vcan: Versican  
VEGFs: Vascular endothelial growth factors  
WB: Western blot  
XPS: X-ray photoelectron spectroscopy  
XRD: X-ray diffraction





## Tableaux et figures

*Dans un souci d'uniformisation, tous les tableaux et les figures ont été réalisés en anglais.*

Table 1. A brief sum up of the different collagen types.....	25
Table 2. Location and composition of the different types of proteoglycans.....	35
Table 3. Different types of body synovial joint classified in function of their motion degree	45
Table 4. Treatment solution of each plate well according to the associated condition.....	93
Table 5. Procedures used for the preparation of human cartilage samples. ....	118
Figure 1. Supramolecular structures formed by collagens.....	26
Figure 2. Collagen fibril supramolecular pathway.....	28
Figure 3. The mechanism of lysyl oxidase collagen cross-linking. ....	29
Figure 4. Classification of o human SLRPs. ....	38
Figure 5. Schematic illustration of the involvement of FACIT collagen type IX, matrilin, COMP and SLRPs in the regulation collagen type II fibrillogenesis.....	41
Figure 6. Schematic representation of enzymatic and non-enzymatic collagen crosslinking..	42
Figure 7. Different types of body joint.....	44
Figure 8. General illustration of the synovial joint structure. ....	46
Figure 9. Joint capsule structure.....	47
Figure 10. Osteochondral junction organization and composition.....	50
Figure 11. Helium ion microscopy images of PCM baskets that house cartilage cells within the collagen network .....	54
Figure 12. Organization and composition of the matrix according to the radial distance from the chondrocytes.....	55
Figure 13. Illustration of the shoulder joint anatomy.....	57
Figure 14. Representation of the different types of shoulder dislocation .....	57
Figure 15. Frequency of osteoarthritis according to joint location .....	61
Figure 16. Illustration of joint tissue changes associated with osteoarthritis.....	62
Figure 17. Safranin O/Fast Green staining of human osteochondral junction.....	67
Figure 18. Polarized light images of picosirius red stained porcine articular cartilage .....	67
Figure 19. (A) TEM section of rat Achilles tendon (B) SEM images of rat Achilles tendon..	68
Figure 20. SEM images of normal cartilage .....	69
Figure 21. TEM of postnatal tendon. ....	69

Figure 22. FTIR images of collagen and proteoglycan in bovine articular cartilage.....	71
Figure 23. Raman spectroscopic imaging of articular cartilage.....	72
Figure 24. Schematic illustration of XPS analysis.....	75
Figure 25. Schematic illustration of AFM analysis.....	79
Figure 26. Experimental design.....	92
Figure 27. Atomic force microscopy analysis of human capsule elasticity.....	96
Figure 28. Increase tissue stiffness of human capsules by crosslinking treatment.....	98
Figure 29. Atomic force microscopy analysis of human capsule structure.....	100
Figure 30. Absence of cell death induction by crosslinking treatment.....	101
Figure 31. Schematic illustration of the main constituents and their supramolecular organization in the extracellular matrix of cartilage.....	109
Figure 32. Osteoarthritic human samples preparation.....	116
Figure 33. Representative O 1s, N 1s, C 1s and S 2p peaks recorded on a cartilage sample prepared using the F-d procedure.....	117
Figure 34. Representative (left) N 1s and (right) C 1s peaks recorded on native cartilage sample, as such or further submitted to PFA fixation and subsequent demineralization.....	119
Figure 35. Correlations between the indicated sums of molar concentrations measured by XPS.....	120
Figure 36. Evolution of the weight percentages (wt.%) of the main constituents of cartilage ECM.....	123
Figure 37. (A) Healthy osteochondral junction stained with Safranin O/Fast Green and analysed by AFM.....	125
Figure 38. AFM showing the evolution of ECM morphology with OA severity.....	127
Figure 39. Evolution of Young's modulus in different cartilage ECM zones with (A) OA severity and (B) in healthy cartilage treated with hyaluronidase, collagenase or both.....	129
Figure 40. Evolution of ECM (A-L) morphology and (N-P) mean fibril diameters due to enzymatic digestion of healthy articular cartilage, as indicated.....	131
Figure 41. Proposed mechanism of OA progress showing the evolution of supramolecular building blocks, namely collagen fibrils and aggrecans, and the imbalance between anabolic and catabolic activity of chondrocytes.....	133
Figure 42. (A) Schematic illustration of the Collagen II/IX/XI hetero-fibril constituents and their organization (B) Schematic illustration of the reorganization in the extracellular matrix of cartilage during osteoarthritis.....	135
Figure 43. Experimental design and analyses carried out.....	147

Figure 44. Matrix calcification during Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes.....	153
Figure 45. (A) Topographic imaging of the mineral expansion (SEM) and the associated chemical mapping (EDX) according to Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes.....	154
Figure 46. (A-C) IR spectra recorded on the matrices of Prehyp and Hyp chondrocytes and the quantification of relative mineral content throughout Hyp differentiation .....	156
Figure 47. (A) EDX mapping of this matrix showing that this population is phosphor rich. (B) SEM images of chondrocytes matrix recorded away from the mineral .....	156
Figure 48. (A-B) Measurement of ALP activity associated with Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes in lysate and conditioned media, respectively. (C-D) Apoptosis analysis. (C) Quantification of in situ cell death according to Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes. (D) CLSM images recorded at different matrix depth showing the predominant presence of apoptotic body in middle zone. ....	158
Figure 49. (A) AFM characterization of the matrix during hypertrophic differentiation of Prehyp chondrocytes: shift from the non-fibrillar to fibrillar matrix. (B) The collagen fibril mean diameter of the calcified matrix of Hyp chondrocytes is compared to that of osteoblast, since their also calcify their matrix. ....	159
Figure 50. (A-B and D-E) Variation in the gene expression of col2a1, col6a2, col10a1 and colla1 encoded for type II, VI, X and I collagens, respectively (C) Variation in the gene expression of Acan, the aggrecan encoded gene (F) Variation in the gene expression of Vcan, the versican encoded gene (G-H) Assaying GAG, constituent unit of proteoglycans, level associated with Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes in lysate and conditioned media, respectively.....	160
Figure 51. Collagenic matrix remodeling during Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes (A)CLSM images recorded on matrix of chondrocytes undergoing Hyp differentiation. Immunofluorescence labeling show the evolution of the different collagen type mentioned above. (B,C) Assaying the variation of type VI and type II collagen level in cell lysate, left and right WB panels respectively. ....	161
Figure 52. (A) Measurement of MMP-13 activity on lived cells (B,C) Assaying the variation of MMP-13 level in cell lysate and conditioned media. ....	162
Figure 53. Synthetic representation of dynamics of mineralization and collagenic matrix remodeling during the hypertrophic differentiation of articular chondrocytes .....	163



# Préambule

L'organisme comprend différents niveaux d'organisation structurale allant, du plus élémentaire au plus complexe, c'est-à-dire de l'organisation supramoléculaire des tissus aux organes, voire aux systèmes fonctionnels. Le système ostéoarticulaire, charpente du corps, est un assemblage complexe de différents tissus conjonctifs comprenant, entre autres, des cartilages, des os, des muscles, des tendons, des ligaments, des capsules articulaires et des tissus adipeux. Un tissu conjonctif est un ensemble coopératif de cellules différenciées enchevêtrées dans une matrice extracellulaire (ECM). Cette dernière, particulièrement abondante, se compose principalement de protéines, telles que les collagènes, et d'un gel visqueux constitué d'eau et de protéoglycanes chargés négativement.

Dans ce projet, un intérêt particulier est porté à l'articulation synoviale caractérisée par la présence d'une capsule articulaire, une enveloppe fibreuse et élastique qui contribue à la stabilité de l'articulation. L'ECM de la couche externe de cette dernière, appelée membrane fibreuse, est principalement composée de fibrilles de collagène de type I qui, orientées multiaxialement, confèrent à la capsule une grande résistance à la traction. Des modifications anormales de cette ECM à l'échelle supramoléculaire, autrement dit à la dimension de la fibrille de collagène, peuvent affecter le comportement mécanique de l'ensemble de la capsule articulaire, *e.g.* le degré de réticulation des fibrilles. **Dans une première étude**, nous avons étudié l'effet de la combinaison riboflavine/UV, une procédure de réticulation utilisée dans le traitement de troubles ophtalmiques, sur la structure et la réponse mécanique des capsules d'épaule issues de patients sujets à de fréquentes luxations d'épaules.

L'articulation synoviale se caractérise également par la présence de cartilage articulaire qui recouvre les extrémités osseuses encapsulées et dont la présence permet d'amortir les chocs mécaniques et de diminuer les frottements au cours du mouvement. Ce tissu hypocellulaire rigide mais souple présente une architecture stratifiée qui contribue à la réponse mécanique du tissu : une couche de cartilage non calcifiée repose sur une couche calcifiée. L'ECM du cartilage articulaire non calcifié est principalement composée de fibrilles de collagène de type II et d'agrégats d'agrécans chargés négativement. L'interaction de ces deux assemblages supramoléculaires confère au cartilage articulaire la capacité d'agir comme un amortisseur de chocs mécaniques. L'ECM du cartilage articulaire calcifié contient, quant à elle, principalement du collagène hexagonal de type X et une grande quantité de phosphate de calcium. Cette zone

d'encrage entre le cartilage articulaire et l'os sous-jacent permet également une transmission des contraintes mécaniques et des stimuli biologiques. Des modifications anormales de l'ECM du cartilage articulaire à l'échelle supramoléculaire, en termes de composition et de structure, peuvent affecter le comportement cellulaire et mécanique de l'ensemble du tissu aboutissant, *in fine*, à sa disparition.

L'arthrose est la maladie musculosquelettique la plus fréquente. Elle se caractérise, notamment, par une dégradation irréversible du cartilage articulaire. Cette pathologie est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déséquilibrent l'homéostasie du cartilage. Il convient de noter qu'il n'existe aucun traitement curatif de l'arthrose à ce jour. Par conséquent, des recherches actives pour le développement (1) de biomarqueurs de l'arthrose, permettant un diagnostic précoce et (2) un traitement curatif de l'arthrose et de ses symptômes associés. Pour relever ce défi, une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'arthrose est donc essentielle. **Dans une deuxième étude**, nous avons donc étudié le remodelage de l'ECM du cartilage articulaire humain au cours de l'arthrose. Pour ce faire, nous avons caractérisé la composition, la structure et les propriétés mécaniques à différents degrés de sévérité d'arthrose à l'échelle supramoléculaire.

L'amincissement et la disparition du cartilage articulaire sont dus à la fois à l'érosion de surface et à l'avancement du front d'ossification à la profondeur du cartilage. La différenciation hypertrophique des chondrocytes, qui a lieu au cours de l'arthrose, est soupçonnée d'orchestrer le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale en permettant la calcification anormale de l'ECM du cartilage articulaire. La séquence des événements de remodelage conduisant à la minéralisation du cartilage au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires n'est pas bien comprise. **Dans une troisième, et dernière, étude**, nous avons, donc, étudié la dynamique de la minéralisation et des modifications de la matrice au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires. Dans ce but, une cinétique de différenciation préhypertrophique à hypertrophique de chondrocytes articulaires murins a été réalisée afin de suivre la minéralisation et le remodelage de l'ECM associé par des approches immunohistochimiques, biochimiques, moléculaires et physicochimiques.

Ce projet interdisciplinaire résulte de la collaboration entre deux partenaires : (1) le Laboratoire de Réactivité de Surface (LRS), spécialisé dans l'étude et la caractérisation des biointerfaces par des techniques de science de surface adaptées, et qui permet de sonder

l'échelle supramoléculaire, et (2) l'équipe du Professeur Berenbaum du Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), qui travaille sur les maladies ostéoarticulaires, en particulier sur l'arthrose. Cette dernière dispose d'une biobanque de tissus arthrosiques humains qui représente un atout majeur pour étudier le remodelage pathologique de l'ECM au cours de l'arthrose. Un modèle cellulaire *in vitro* permettant de suivre le remodelage de l'ECM associé à la calcification de la matrice a également été développé par ce partenaire.

L'expertise complémentaire de ces deux partenaires a donc permis de développer une approche méthodologique originale qui apporte de nouvelles connaissances sur le remodelage pathologique de l'ECM des tissus ostéoarticulaires.

Le manuscrit de cette thèse se compose de quatre chapitres abordant des objectifs allant de l'étude de traitements de réticulation appliqués aux capsules articulaires humaines luxées à la compréhension fondamentale des événements caractéristiques du remodelage de l'ECM au cours de l'arthrose en utilisant à la fois des explants humains et un modèle murin *in vitro*.





# **Chapitre 1**

**Les tissus ostéoarticulaires mésenchymateux : des matériaux biologiques d'intérêt**

—

**Définition du projet et stratégies adoptées**

## 1.1. La matrice extracellulaire des tissus mésenchymateux : une structure composite complexe

Un tissu biologique est un ensemble de cellules ou de fibres exerçant une fonction définie. Cet ensemble coopératif forme une triple association, territoriale, fonctionnelle et biologique. Les tissus mésenchymateux désignent, quant à eux, les tissus issus du mésenchyme embryonnaire, un tissu se développant principalement à partir de la couche intermédiaire de l'embryon, le mésoderme. Ce tissu donne directement naissance à la plupart des tissus conjonctifs dont certains dits spécialisés tels que le cartilage et la capsule articulaire, deux tissus de soutien aux propriétés biomécaniques spécifiques. Contrairement aux tissus principalement composés de cellules, le principal constituant du tissu conjonctif est la matrice extracellulaire (ECM). Ce réseau dynamique tridimensionnel est principalement composé de protéines et d'un gel visqueux fait d'eau et de polysaccharides chargés négativement. Ces derniers sont majoritairement présents sous forme de protéoglycanes (PG), *i.e.* liés de manière covalente à une protéine centrale. Il convient de noter que l'ECM n'est pas seulement un support physique pour les cellules, mais qu'elle permet de renseigner en permanence les cellules sur leur environnement affectant ainsi leurs fonctions.<sup>1,2</sup> Les interactions cellule/matrice sont en effet modulées par divers facteurs de croissance et hormones stockés dans l'ECM.<sup>2</sup> Cette dernière participe activement à de nombreux processus cellulaires, tels que l'adhérence, la prolifération, la différenciation, la migration et l'autophagie des cellules.<sup>3-6</sup> L'ECM joue également un grand rôle dans l'absorption et la répartition des contraintes comme celles engendrées par les mouvements de l'articulation. Ces contraintes mécaniques agissent non seulement sur l'ECM mais aussi sur le métabolisme des cellules. Il est, en effet, admis que ces derniers utilisent les signaux mécaniques pour réguler leur activité métabolique. L'homéostasie de l'ECM est donc influencée, d'une part, par des facteurs solubles stockés dans la matrice (hormones, vitamines, cytokines, facteurs de croissance) et, d'autre part, par le microenvironnement des cellules, *i.e.* hydratation et niveau de pH,<sup>7</sup> et les contraintes mécaniques transmises par l'ECM.<sup>8</sup> Ces diverses fonctions sont assurées par l'interaction des assemblages macromoléculaires de l'ECM, dont la composition et la structure supramoléculaire sont spécifiques à chaque tissu. Globalement, les protéines structurelles, telles que les fibrilles de collagène, assurent la résistance à la traction, tandis que les PG assurent, entre autres, l'hydratation des tissus et la diffusion des nutriments.<sup>7,9</sup> Dans les paragraphes suivants, nous nous focaliserons sur les composants matriciels, la fibrillogenèse du collagène et les processus de régulation de l'ECM.

### 1.1.1. Composition de la matrice extracellulaire

L'ECM se compose de trois groupes de protéines : les collagènes, les protéoglycanes et une grande variété de glycoprotéines.<sup>10</sup> Ici, nous nous focalisons sur les collagènes et les protéoglycanes présents dans la matrice.

#### 1.1.1.1. Les différents types de collagènes présents dans l'ECM

Les collagènes représentent environ 30% de la masse protéique totale d'un organisme. La famille des collagènes comprend 28 types différents qui contiennent au moins un domaine à triple hélice constitué de chaînes  $\alpha$  identiques (homotrimères) ou différentes (hétérotrimères).<sup>11</sup> La taille de ces dernières varie entre 662 et 3152 acides aminés.<sup>12,13</sup> La triple hélice ainsi formée contient une ou plusieurs régions caractérisées par un motif répétitif Gly-X-Y, où X et Y sont le plus souvent la proline (28%) ou l'hydroxyproline (38%).<sup>14</sup> Avant la formation de la triple hélice, ces sous-unités sont modifiées par l'hydroxylation de la proline et de la lysine, et par la glycosylation de certains résidus d'hydroxylysine. L'étendue de cette dernière varie selon les types de collagène, le collagène de type IV est, par exemple, plus largement glycosylé que le collagène de type I et de type II.<sup>15,16</sup> En général, la glycosylation est plus importante dans les collagènes de la membrane basale que dans les collagènes fibrillaires.<sup>16</sup> La triple hélice formée est ensuite stabilisée par :

- la présence de la glycine comme troisième résidu : la majorité des mutations dommageables concernant des gènes codant du collagène implique le remplacement d'un résidu Gly au sein de la triple hélice. La nature de l'acide aminé remplaçant Gly et l'emplacement de cette substitution peuvent avoir un impact sur la pathologie, par exemple l'ostéogenèse imparfaite.<sup>17,18</sup>
- une teneur élevée en proline et hydroxyproline : l'hydroxylation des résidus Pro en position Y augmente la stabilité thermique de la triple hélice en permettant la formation de liaisons hydrogène assurées par l'eau entre les hydroxyprolines et les hétéroatomes des autres chaînes.<sup>19-23</sup> Cependant, la fréquence des hydroxyprolines dans la plupart des collagènes naturels est trop faible pour permettre la mise en place d'un réseau étendu de ponts hydrogènes. Les ponts d'eau ne semblent donc pas jouer un rôle déterminant dans la stabilité de la triple hélice. Des travaux étudiant le remplacement des hydroxyprolines en position Y par des résidus de (2S,4S)-4-fluoroproline (Flp)<sup>24,25</sup> et (2S,4R)-4-méthoxyproline (Mop)<sup>26</sup> ont montré que la présence des hydroxyprolines en position Y

stabilise le collagène via un effet stéréo-électronique et non via des ponts hydrogènes. Holmgren *et al.* ont montré que Flp, qui ne forme pas de liaison hydrogène<sup>27</sup>, apparaît plus stabilisant que l'hydroxyproline.<sup>24,25</sup> Le fluor ( $\chi_F \approx 4,0$ ) est, en effet, plus électro-négatif que l'oxygène ( $\chi_O \approx 3,5$ ), et un groupe fluoré ( $F_F = 0,45$ ) manifeste un effet inductif plus important qu'un groupe hydroxyle ( $F_{OH} = 0,33$ ).

Par ailleurs, l'étude de Kotch *et al.* a démontré que la réduction de l'hydratation par méthylation des résidus d'hydroxyproline améliore de manière significative la stabilité de la triple hélice, démontrant le rôle mineur des ponts hydrogènes dans la stabilité de la triple hélice.<sup>26</sup> De plus, des substitutions en position Y d'hydroxyproline par des résidus (2S,4S)-4-méthylproline (Mep)<sup>28</sup> et (2S,4R)-4-mercaptoproline (Mpc)<sup>29</sup> ont démontré que la stabilité de la triple hélice peut également être influencée par des effets stériques.

- des liaisons hydrogène : la structure à triple hélice présente une seule liaison hydrogène inter-chaine  $N-H_{(Gly)} \cdot O=C_{(X)}$  par triplet, dont la force a été estimée, par Boryskina *et al.*, à  $\Delta G^\circ = -1,4$  kcal/mol dans le collagène natif.<sup>30</sup> Bien que cette dernière soit la plus abondante, des liaisons hydrogène  $C_\alpha-H_{(Gly/Y)} \cdot O=C_{(X/Gly)}$  pourraient également stabiliser la triple hélice.<sup>31</sup>
- des interactions électrostatiques impliquant la lysine et l'aspartate<sup>32,33</sup> et des interactions  $n \rightarrow \pi^*$ . Dans une interaction  $n \rightarrow \pi^*$ , un nucléophile, l'oxygène, fait don de la densité électronique d'un doublet solitaire à l'orbitale  $\pi$  vide d'un groupe carbonyle voisin.<sup>34-36</sup>

Tous les types de collagène contiennent au moins un domaine à triple hélice : un domaine large à triple hélice pour les collagènes fibrillaires, *e.g.* collagène de type I et II, et de multiples pour les autres, *e.g.* les collagènes associés aux fibrilles avec triple hélice interrompue (FACIT), les multiplexines et les collagènes membranaires. Les domaines à triple hélice peuvent, en effet, être intercalés entre des domaines non collagéniques (NC) qui participent à l'assemblage structurel et confèrent des activités biologiques aux collagènes. Les NC les plus abondants sont de type fibronectine III, Kunitz, thrombospondine-1 et von Willebrand. Par ailleurs, la diversité moléculaire des chaînes  $\alpha$  et la possibilité de les combiner de manière alternative entraînent, pour certains types de collagène, la formation d'isoformes.

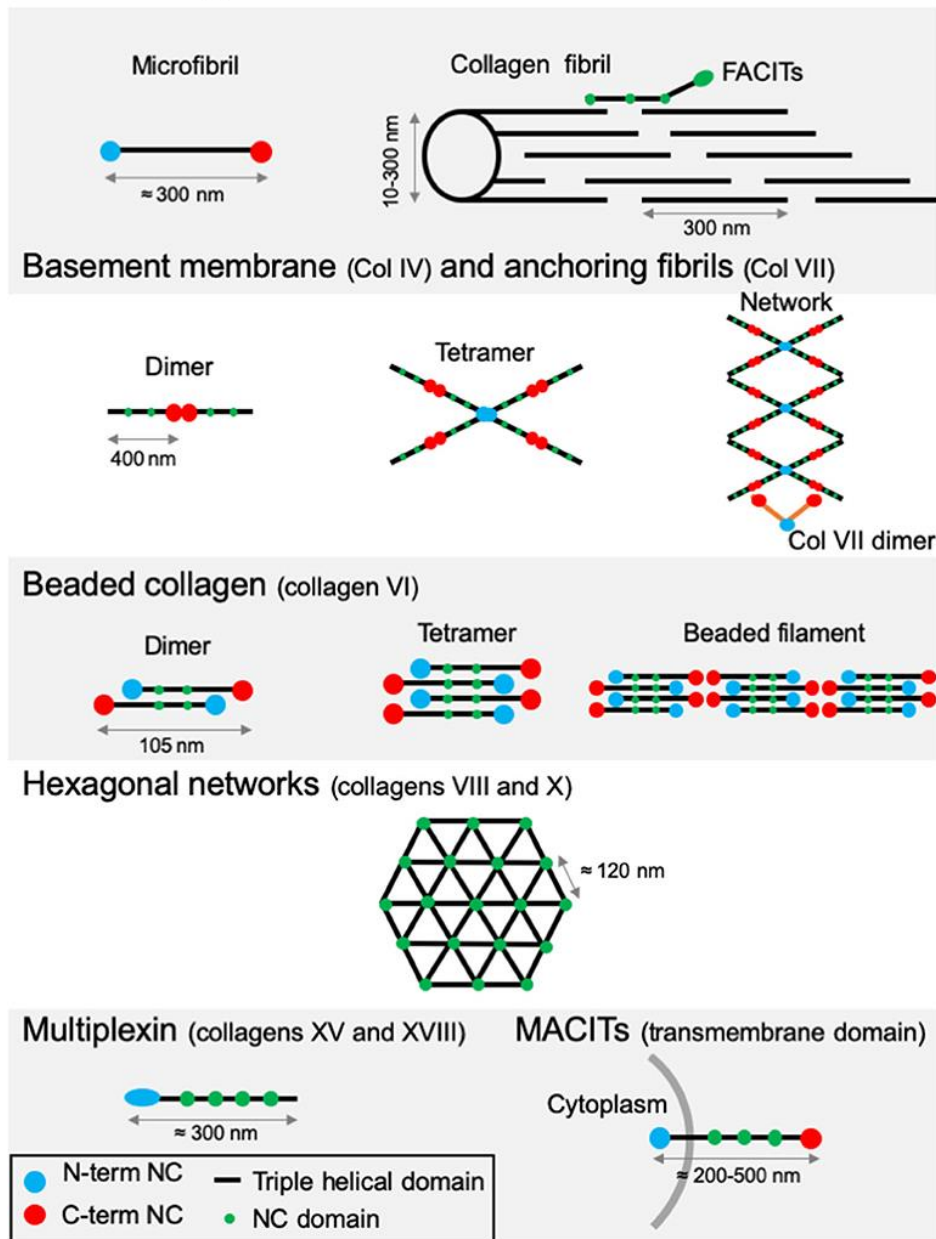
Les molécules de collagène sont soumises à un degré variable de modification post-traductionnelle et/ou de traitement protéolytique, modulant encore davantage leurs structures supramoléculaires et leurs propriétés de surface.

La famille des collagènes peut être sous-divisée en fonction de la structure supramoléculaire adoptée (**Figure 1**). On en distingue 8 catégories (**Table 1**) : les collagènes fibrillaires, les FACIT collagènes, les collagènes associés aux membranes avec triple hélice interrompue (MACIT), les collagènes de la membrane basale, les multiplexines et les collagènes formant des réseaux (filaments perlés, fibrilles d'ancrage, treillis hexagonaux).

**Table 1.** A brief sum up of the different collagen types

Collagen Type	Composition	Structure	Localisation
I	$[\alpha_1(I)]^2, [\alpha_2(I)]$	Fibril	Most connective tissue, e.g. bone, skin, tendon
II	$[\alpha_2(II)]^3$	Fibril	Cartilage, vitreous humour, intervertebral disc
III	$[\alpha_1(III)]^3$	Fibril	Most connective tissue e.g. skin, blood, vessels
IV	$[\alpha_1(IV)]^2, [\alpha_2(IV)];$ $[\alpha_3(IV)], [\alpha_4(IV)],$ $[\alpha_5(IV)];$ $[\alpha_5(IV)]^2, [\alpha_6(IV)]$	Polygonal lattice	Basement membrane
V	$[\alpha_1(V)]^2, [\alpha_2(V)];$ $[\alpha_1(V)], [\alpha_2(V)],$ $[\alpha_3(V)];$ $[\alpha_1(V)]^3$	Fibril	Tissue containing type I collagen, e.g. bone, dermis
VI	$[\alpha_1(VI)], [\alpha_2(VI)],$ $[\alpha_3(VI)]$	Beaded filament	Most connective tissue, e.g. muscle, cartilage
VII	$[\alpha_1(VII)]^3$	Anchoring fibril	Many tissues, e.g. skin and cornea
VIII	$[\alpha_1(VIII)]^2, [\alpha_2(VIII)]$	Hexagonal network	Many tissues, e.g. descemet's membrane in cornea
IX	$[\alpha_1(IX)], [\alpha_2(IX)],$ $[\alpha_3(IX)]$	FACIT	Tissue containing type II collagen
X	$[\alpha_1(X)]^3$	Hexagonal network	Hypertrophic cartilage
XI	$[\alpha_1(XI)], [\alpha_2(XI)],$ $[\alpha_3(XI)]$	Fibril	Tissue containing type II collagen
XII	$[\alpha_1(XII)]^3$	FACIT	Tissue containing type I collagen e.g. dermis
XIII	$[\alpha_1(XIII)]^3$	MACIT	Many tissue, in low amount
XIV	$[\alpha_1(XIV)]^3$	FACIT	Tissue containing type I collagen
XV	$[\alpha_1(XV)]^3$	Multiplexin	Basement membrane zones in many tissue
XVI	$[\alpha_1(XVI)]^3$	FACIT	Many tissues, e.g. kidney, dermis
XVII	$[\alpha_1(XVII)]^3$	MACIT	Hemidesmosome located between basal epithelial cells and the underlying basement membrane
XVIII	$[\alpha_1(XVIII)]^3$	Multiplexin	Basement membrane zones in many tissue
XIX	$[\alpha_1(XIX)]^3$	FACIT	Basement membrane zones in many tissue
XX	$[\alpha_1(XX)]^3$	FACIT	Basement membrane zones in many tissue
XXI	$[\alpha_1(XXI)]^3$	FACIT	Many tissues, e.g. kidney, stomach
XXII	$[\alpha_1(XXII)]^3$	FACIT	Tissue junctions
XXIII	$[\alpha_1(XXIII)]^3$	MACIT	Cornea, lung, cartilage, heart, retina and amnion that covers embryo
XXIV	$[\alpha_1(XXIV)]^3$	Fibril	Bone, cornea
XXV	$[\alpha_1(XXV)]^3$	MACIT	Brain, heart, testis
XXVI	$[\alpha_1(XXVI)]^3$	FACIT	Testis, ovary
XXVII	$[\alpha_1(XXVII)]^3$	Fibril	Cartilage, eye, ear, lung, colon
XXVIII	$[\alpha_1(XXVIII)]^3$	Beaded filament	Dermis, sciatic nerve

## Fibrillar collagens and FACITs fibril



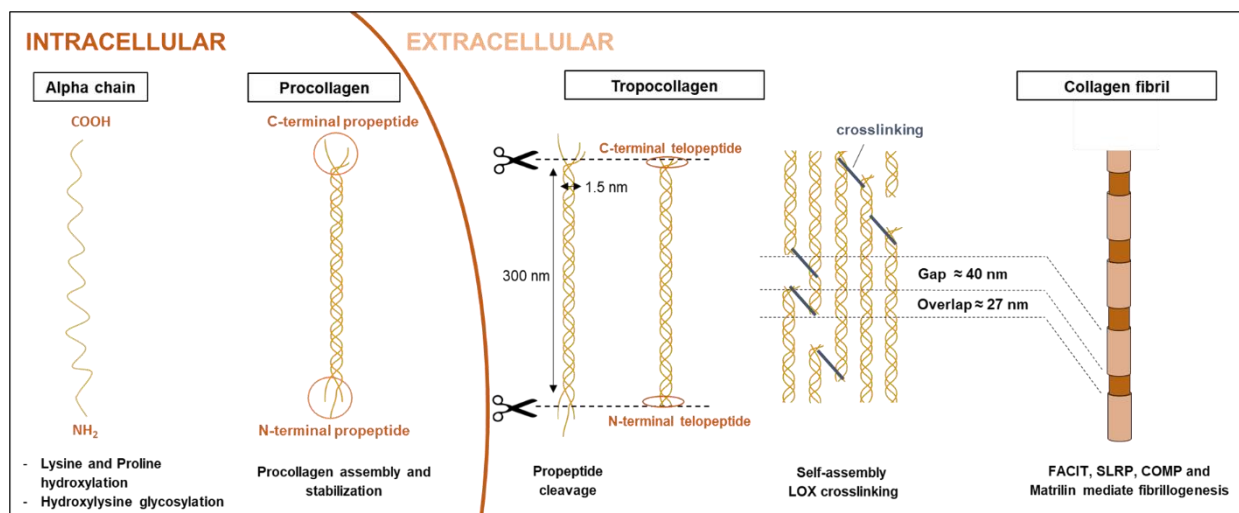
**Figure 1.** Supramolecular structures formed by collagens. *Fibrillar collagens and FACITs fibrils:* FACITs attach at the surface of fibrils with the C-terminal part protruding and regulate fibrillogenesis. *Basement membrane and anchoring fibrils:* formation of type IV collagen dimer occurs by the association of two protomers through their globular NC C-terminal domain. Dimers interact together through their N-terminal domains to constitute tetramers. Networks are the result of the two first steps linked to additional lateral interactions between the molecules. *Beaded collagen:* an association between the type VI collagen dimer and tetramer takes place inside the cells. Connection of tetramers leads to the formation of long filaments called “beaded filaments”. *Hexagonal networks:* collagens VIII and X form hexagonal networks in Descemet's membrane and in hypertrophic cartilage, respectively. *Multiplexin:* collagens XVIII and XV are found in basement membrane. *MACITs:* The N-terminal NC domain (N-terminal NC) is located inside the cell, whereas the triple helix region is extracellular. Abbreviation: NC, non-collagenous domain. Bourgot *et al.* 2020

## Les collagènes fibrillaires : I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII

Le collagène fibrillaire contient un large domaine à triple hélice (*ca.* 300 nm) constitué de 3 chaînes polypeptides, chaînes  $\alpha$ , contenant chacune 990 à 1020 acides aminés (**Figure 2**). Cette large triple hélice, appelé procollagène, est sécrétée dans l'ECM avant d'être soumise à un traitement protéolytique de ses télépeptides qui correspondent aux domaines N- et C-terminaux.<sup>37</sup> Les tropocollagènes obtenus s'auto-assemblent ensuite en structures supramoléculaires, appelées en fibrilles, avec un décalage séquentiel donnant lieu à une structure « gap/overlap » par le biais d'interactions intermoléculaires et de réticulations.<sup>11,38,39</sup> Le processus de réticulation est initiée par la conversion des résidus de lysine/hydroxylysine en résidus d'allysine/hydroxyallysine. Cette réaction est catalysée par la lysyl oxydase (LOX) qui oxyde l'amine terminal ( $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ) des résidus lysine en groupe aldéhyde ( $-\text{CHO}$ ) (**Figure 3A**).<sup>40</sup> Ces derniers sont ensuite soumis à diverses opérations de condensation : la condensation aldolique entre 2 allysines (**Figure 3B**).et la condensation de la lysine/ hydroxylysine avec l'allysine/l'hydroxyallysine pour former des bases de Schiff.<sup>41,42</sup> Cette dernière aboutit à la formation de liaisons stables, *e.g.* l'hydroxylysyl-pyridinoline (HP) et la lysyl-pyridinoline (LP) (**Figure 3C**).<sup>43</sup> Ces réticulations, discutées en détail par Bielajew *et al.*,<sup>42</sup> confèrent aux fibrilles de collagène leur stabilité et leur résistance à la traction.<sup>44-46</sup> Les interactions inter-moléculaires entre les résidus de charge opposée et les interactions hydrophobes entre les résidus de différents tropocollagènes jouent également un rôle dans la stabilisation de la fibrille.<sup>47</sup> En effet, des résidus chargés tels que Lys, Glu et Arg sont répartis de manière asymétrique le long de la molécule. 40 % des Gly-X-Y présentent au moins 3 charges positives ou négatives à pH =7,4, avec, le plus souvent, les résidus positifs en position Y et les résidus négatifs en position X.<sup>48</sup> Ces interactions intra- et intermoléculaires entre les tropocollagènes sont à l'origine du décalage séquentiel, appelé période D, caractéristique de 67 nm.<sup>39,49-55</sup>

La plupart des fibrilles de collagène sont composées de plusieurs types de collagène et sont dites hétérotypiques, aussi appelé les hétéro-fibrilles. Les collagènes fibrillaires types I et II représentant 80 à 90 % du collagène du corps humain.<sup>56</sup> Ces derniers sont associés aux collagènes de types III, V, IX et/ou XI par des réticulations qui renforcent le réseau de collagène et permettent sa maturation.<sup>46</sup> Les fibrilles de collagène sont constituées de collagènes de type II, XI et IX ou de collagènes de type II et III dans le cartilage hyalin,<sup>57</sup> de collagènes de type I, III et V dans la peau,<sup>58,59</sup> de collagènes de type I et V dans la cornée,<sup>60</sup> et de collagène de type I, III, V et XI dans l'os.<sup>61</sup> Cependant, il reste difficile de détecter et/ou visualiser les collagène

présents en petite proportion, *e.g.* le collagène de type III associé au collagène de type I. Le collagène de type III contient un domaine à triple hélice légèrement plus large que le collagène de type I (340 vs 338 acides aminés) qui semble affecter l'assemblage en fibrille de ce dernier. Cependant, la détection du collagène de type III reste difficile due (1) à la faible proportion du collagène de type III par rapport au collagène de type I et (2) à la présence de nombreuses réticulations le rendant insolubles.<sup>47</sup> Par ailleurs, il a été récemment démontré que de très faibles quantités de collagène de type XI (moins de 1/1000) peuvent modifier profondément l'organisation fibrillaire du collagène de type I. La formation de fibrilles par le collagène de type I pur *in vitro* est, en effet, remarquablement lente et incompatible avec les exigences de la fibrillogenèse *in situ* car la nucléation en l'absence de collagène de type V/XI présente une très forte barrière cinétique empêchant le processus d'assemblage. Ainsi, la fibrille de collagène de type I/XI est un composite contenant un noyau de collagène de type XI autour duquel le collagène de type I va croître en hétéro-fibrilles.<sup>62</sup>



**Figure 2.** Collagen fibril supramolecular pathway. Three collagen  $\alpha$ -chains associate specifically via their C-terminal domains to form a hereto/homotrimer. The latter is characterized by N- and C-terminal propeptide sequences. The helical collagens are then secreted into the extracellular matrix as precursor forms, called procollagens, with N- and C-terminal non-collagenous domains. These domains are removed by the action of specific proteases, and the formed tropocollagens are assembled into dense fibrils with a characteristic a D-banding pattern of about 67 nm. The fibril is stabilized by covalent lysine- and hydroxylysine-derived crosslinks. In addition to fibrillar collagen, other ECM components, such FACIT collagen, are clinged to the surface of the microfibril and work to stabilize higher order structures.





dans la chaîne  $\alpha 2(\text{IX})$  que dans les chaînes  $\alpha 1(\text{IX})$  et  $\alpha 3(\text{IX})$ .<sup>68</sup> Cette différence de longueur peut être à l'origine de la structure coudée du collagène de type IX dont le bras le plus long, comprenant les domaines COL1 et 2, est orienté parallèlement à la surface de la fibrille de collagène à laquelle le collagène de type IX est associé (**Figure 1**).<sup>69</sup> La localisation du collagène de type IX à la surface des fibrilles de collagène de type II dans le cartilage suggère fortement que ce dernier est impliqué dans l'interaction de fibrilles entre elles ou avec d'autres composants de l'ECM telles que les petits protéoglycanes à répétition riche en leucine (SLRP), *e.g.* les décorines, les biglycanes, les fibromodulines et les lumicanes. Ces derniers ont la capacité de réguler la fibrillogenèse, de la même manière que les collagènes de type V et XI évoqués précédemment.<sup>70-74</sup>

### **Les MACIT collagènes : XIII, XVII, XXIII et XXV**

Les collagènes XIII, XVII, XXIII et XXV sont des protéines transmembranaires composées d'une extrémité N-terminale située à l'intérieur de la cellule, d'un domaine transmembranaire hydrophobe à passage unique et de plusieurs domaines à triple hélices extracellulaires (**Figure 1**). Cet ectodomaine varie en longueur selon le type de collagène : les collagènes de type XIII, XXIII et XXV sont, en effet, constitués de 3 domaines à triple hélice tandis que le collagène de type XVII en contient 15. Par ailleurs, ces protéines collagéniques transmembranaires fonctionnent à la fois comme des récepteurs de surface cellulaire, via le domaine C-terminal, et comme des molécules extracellulaires solubles puisque leurs ectodomains sont libérés de la surface cellulaire par clivage sous l'action de protéase de type furine. Il convient de noter que contrairement aux 3 autres types de collagène, le collagène de type XVII est clivé par les protéases de type ADAM. Les ectodomains libérés se lient à d'autres composants de l'ECM, tels que la fibronectine et le perlécane pour le collagène XIII, l'héparine pour les collagènes XIII et XXIII et aux intégrines. Les ectodomains relargués semblent donc contribuer à la régulation du comportement cellulaire.<sup>11,75-79</sup>

### **Les collagènes de la membrane basale : IV**

Les membranes basales sont des composites constitués de plusieurs réseaux supramoléculaires indépendants, mais entrelacés (**Figure 1**). L'un de ces réseaux contient du collagène IV qui se présente sous plusieurs isoformes. Il existe, en effet, six gènes codant pour le collagène IV qui donnent naissance aux polypeptides correspondants  $\alpha 1(\text{IV})$  à  $\alpha 6(\text{IV})$ . Les molécules de collagène IV s'agrègent en réseaux grâce aux interactions entre leurs domaines N-

terminaux à triple hélice, appelés domaines 7S. À partir de ces nœuds formés par les domaines 7S, les longues triples hélices du collagène IV s'étirent dans toutes les directions de l'espace. Une telle flexibilité est permise par des interruptions dans les séquences typiques (Gly-X-Y)<sub>n</sub> qui, contrairement aux collagènes fibrillaires, sont présentes en abondance dans les molécules de collagène IV. De telles interruptions créent un point de flexibilité dans une molécule autrement rigide et en forme de tige. À leur extrémité C, les domaines NC1 non collagéniques interagissent tête à tête, créant, conjointement avec les interactions 7S, de grands agrégats supramoléculaires ressemblant à des réseaux entrelacés. Ainsi, des réseaux hétérotypiques apparaissent avec des structures supramoléculaires distinctes et des propensions à subir d'autres réactions d'agrégation. Ces réseaux subissent un assemblage supramoléculaire supplémentaire en s'agrégeant latéralement en réseaux polygonaux étendus avec des tailles de maille très variables (**Figure 1**). Les suprastructures formées par diverses combinaisons d'isoformes de collagène IV peuvent subir d'autres interactions moléculaires avec des macromolécules associées à la membrane basale.<sup>62,80,81</sup>

### **Les multiplexines : XV, XVIII**

Les collagènes de type XV et XVIII sont des homotrimères composés de multiples domaines à triple hélice et de chaînes de glycosaminoglycanes. En effet, le collagène de XV et XVIII possèdent 9 et 10 domaines à triple hélice en plus de chaînes de chondroïtine sulfate et d'héparane sulfate, respectivement. Ces deux types de collagènes sont donc également considérées comme des protéoglycanes.<sup>82,83</sup> Par ailleurs, les domaines C-terminaux de ces deux collagènes sont fortement homologues et contiennent des fragments libérés par protéolyse. Ces fragments protéolytiques appartiennent à une nouvelle classe de molécules collectivement appelées matricryptines ou matrikines.<sup>84</sup> Ces fragments (~18-30 kDa) sont également dérivés du domaine C-terminal des collagènes de type IV, VIII, XV et XVIII, qui sont associés aux membranes basales. Ces matricryptines modulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales, induisent l'apoptose des cellules endothéliales, inhibent l'angiogenèse et la croissance tumorale et interagissent avec la surface cellulaire via les intégrines.<sup>85-87</sup> Pour exemple, dans l'arthrose, la dégradation du cartilage engendre la génération de fragments de fibronectine qui ont un effet inflammatoire/catabolique. Les collagènes XV et XVIII sont présents dans les zones de la membrane basale épithéliale et endothéliale d'une grande variété de tissus, mais malgré leurs homologies structurales, leurs rôles biologiques sont distincts : (1) Les collagènes de type XV et de type XVIII jouent, respectivement, un rôle dans les muscles et

l'œil et (2) seules des compensations mineures sont observées chez les souris présentant une déficience en collagène de type XV ou XVIII.<sup>88</sup>

### **Les collagènes en filament perlé : VI, XXVIII**

Le collagène de type VI possède des domaines globulaires N- et C-terminaux et un domaine central à triple hélice, de 105 nm, composé des chaînes  $\alpha 1(\text{VI})$ ,  $\alpha 2(\text{VI})$  et  $\alpha 3(\text{VI})$  (**Figure 1**).<sup>89</sup> Le domaine N-terminal provient presque exclusivement de la chaîne  $\alpha 3(\text{VI})$  et a environ deux fois la masse moléculaire du domaine C-terminal. Ce domaine est exprimé sous plusieurs formes différentes, ce qui donne lieu à une hétérogénéité structurelle et fonctionnelle. Dans un premier temps, cet hétérotrimère s'autoassemble pour former un dimère par l'association latérale et antiparallèle de deux monomères, qui sont décalés de 30 nm et dont les domaines C-terminaux interagissent avec les domaines à triple hélice (**Figure 1**). Ces interactions sont stabilisées par des liaisons disulfure près des extrémités de la région overlap.<sup>90</sup> Les hélices superposées des deux monomères forment une grosse perle dans la région centrale.<sup>91</sup> Dans un deuxième temps, les dimères s'alignent 2 à 2 en cohérence pour former des tétramères avant d'être sécrétés (**Figure 1**).<sup>92</sup> Ces derniers s'assemblent de manière extracellulaire en filaments perlés (perles de 25 nm espacées de 100 nm),<sup>93-95</sup> en fibrilles à large bande et en treillis hexagonaux par interactions bout à bout et divers degrés d'associations latérales (**Figure 1**). Le collagène de type VI est un composant ubiquitaire des tissus conjonctifs, souvent enrichi dans les régions péricellulaires où il interagit avec un large éventail de molécules extracellulaires, notamment les collagènes de types I, II, IV et XIV, la glycoprotéine associée aux microfibrilles (MAGP-1), le perlécane, la décorine, le biglycane, l'hyaluronane, l'héparine et la fibronectine, ainsi que les intégrines et le protéoglycane de surface NG2. Par exemple, le biglycane et la décorine se lient au même site à triple hélice près de l'extrémité N-terminale.<sup>96</sup> Les interactions du biglycane avec le tétramère induisent la formation d'un réseau hexagonal plutôt qu'un filament perlé.<sup>97</sup> En revanche, la décorine, qui se lie au même site, est moins efficace pour induire la formation d'un réseau hexagonal. Dans le cartilage, l'expression du biglycane est enrichie dans l'environnement péricellulaire tandis que la décorine est enrichie dans la matrice territoriale. A l'instar des fibrilles, la présence des SLRP influence donc la structure supramoléculaire du collagène de type VI qui s'assemble donc différemment dans les matrices adjacentes ayant des fonctions différentes.<sup>62,96,97</sup> Des changements anormaux dans l'expression des SLRP pourraient donc modifier la structure du collagène de type VI spécifique à chaque matrice et pourrait conduire à un remodelage pathologique de l'ECM. Par ailleurs, la décorine

ou le biglycane associés au collagène VI peuvent former des complexes avec la matriline-1 qui assurent, dans la matrice du cartilage, les interactions entre le collagène de type VI, les fibrilles hétérotypiques de collagène de type II/IX/XI et les agrégats d'agrécanes.<sup>98</sup>

Le collagène VI peut également interagir avec les cellules qu'il entoure et ainsi influencer leur migration, leur différenciation et leur prolifération/apoptose. Cela implique aussi un ou plusieurs rôles dans le développement de matrices extracellulaires spécifiques aux tissus, dans les processus de réparation et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

### **Les collagènes en fibrilles d'ancrage : VII**

Le collagène de type VII comprend un large domaine à triple hélice (424 nm) interrompu par des domaines non collagéniques. Cet homotrimère possède une petite région globulaire éliminée pendant l'assemblage (domaine C-terminal) à une extrémité et une structure tridentée à l'autre extrémité (domaine N-terminal). Ces derniers se chevauchent pour former des dimères antiparallèles qui s'associent latéralement pour former des fibrilles d'ancrage. La formation de ponts disulfure intermoléculaires stabilise cet assemblage. Le collagène de type VII a pour fonction de renforcer la jonction dermo-épidermique.<sup>12,92,99-101</sup>

### **Les collagènes en réseau hexagonal : VIII et X**

Les collagènes de type VIII et X s'assemblent pour former des treillis hexagonaux dans les tissus (**Figure 1**). Ces collagènes sont étroitement liés avec des structures protéiques comparables.<sup>89,102</sup> Le collagène de type VIII est un homo- ou hétéro-trimère de chaînes  $\alpha 1$ (VIII) et  $\alpha 2$ (VIII) possédant une région à triple hélice de 135 nm de long, avec une région globulaire à l'extrémité C-terminale et une région globulaire plus petite à l'extrémité N-terminale.<sup>103,104</sup> Les triples hélices présentent des interruptions aux mêmes positions dans les chaînes  $\alpha 1$ (VIII) et  $\alpha 2$ (VIII). Le collagène de type VIII est un composant majeur des cellules endothéliales vasculaires et de la membrane de Descemet, qui sépare l'endothélium cornéen du stroma. Cette molécule présente des interruptions aux mêmes positions dans les chaînes  $\alpha 1$ (VIII) et  $\alpha 2$ (VIII).<sup>105,106</sup> Le collagène X, quant à lui, est homotrimère à liaison disulfure et localisé uniquement dans le cartilage calcifié. Sa structure moléculaire est similaire à celle du collagène de type VIII, notamment ses domaines à triple hélice et globulaires C-terminale.<sup>107</sup> Les molécules de collagène de type VIII et X forment un tétraèdre par l'interaction de quatre molécules qui s'assemblent, ensuite, en treillis hexagonaux tridimensionnels.<sup>108</sup>

#### 1.1.1.2. Les différents types de protéoglycanes présents dans l'ECM

Les PG sont constitués de glycosaminoglycanes (GAG) anioniques sulfatés liés de manière covalente à un squelette protéique central. Les GAG sont de longues chaînes de polysaccharides non ramifiées de disaccharides répétitifs, souvent sulfatés, formés par l'acide uronique et soit la N-acétylglucosamine, soit la N-acétylgalactosamine.<sup>109</sup> Quatre classes principales de GAG sont connues : l'acide hyaluronique, le sulfate de chondroïtine et le sulfate de dermatane, l'héparane sulfate/héparine et le kératane sulfate. Le sulfate de chondroïtine (CS), le sulfate de kératane (KS), le sulfate de dermatane (DS) et le sulfate d'héparane (HS) sont les principaux GAG sulfatés constitutifs des PG.<sup>110-112</sup>

Les PG ont des rôles à la fois structurels et biologiques, car ils sont responsables de la résistance à la compression et de l'hydratation des tissus et servent également à piéger les facteurs de croissance dans l'ECM.<sup>113</sup> La classification des PG est basée sur leur localisation et leurs fonctions biologiques (**Table 2**).<sup>114</sup>

**Table 2.** Location and composition of the different types of proteoglycans. Asterisk indicates small leucine-rich proteoglycans

LOCATION	PROTEOGLYCAN	PROTEIN CORE (kDa)	GAG
<b>Intracellular</b>	Serglycin	10–19	CS/DS HS/heparin
<b>Cell Surface</b>	Syndecan 1–4	22–43	HS/CS
	CSPG4(NG2)	251	CS
	Betaglycan	110	CS/HS
	Phosphacan	67–254	CS
	Glypicans 1–6	56–59	HS
	Thrombomodulin	58	CS
	CD44	37–81	CS/DS
	Neuropilin–1	130	HS/CS
<b>Pericellular</b>	Perlecan	400–450	HS
	Agrin	212	HS
	Collagen XVIII	180–200	HS
	Collagen XV	225–250	CS/HS
<b>Extracellular</b>	Aggrecan	208–220	CS/KS
	Versican	72–373	CS
	Neurican	145	CS
	Brevican	96	CS
	Mimecan	25	KS
	Endocan	50	DS
	* Biglycan	38	CS/DS
	* Decorin	36	CS/DS
	Lubricin	148	CS/KS
	* Asporin	42	
	* ECM2	36–42	
	* ECMX	36–42	
	* Fibromodulin	42	KS
	* Lumican	38	KS
	* PRELP	42	
	* Keratocan	37	KS
	* Osteoadherin	36–42	KS
	* Nyctalopin	36–42	DS/CS
	* Tsukushi	36–42	
	* Podocan	36–42	
	* Podocan-like 1	36–42	
	Testicans 1–3	45/48	HS/CS

## **Le PG intracellulaire**

Le serglycine favorise la sécrétion de régulateurs inflammatoires, la croissance et le développement des tumeurs.<sup>115-117</sup>

## **Les PG de surface cellulaire**

Les PG de surface cellulaire jouent un rôle plus direct dans la coordination de la signalisation, car ils agissent comme des corécepteurs via la liaison de ligands.<sup>118,119</sup> Les syndécanes, PG transmembranaires, se composent d'un noyau protéique transmembranaire à passage unique comprenant un ectodomaine, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire.<sup>120,121</sup> Ces PG contiennent également des chaînes HS et CS attachées à leur ectodomaine. Leonova *et al.* a montré que l'état désordonné de l'ectodomaine des syndécanes leur permet d'interagir avec une variété de protéines et de ligands, ce qui enrichit leur fonction biologique.<sup>122</sup> Les syndécanes sont impliqués dans plusieurs fonctions biologiques, *e.g.* l'adhérence, la prolifération et la migration cellulaire.<sup>121,123,124</sup> Les glypicanes sont quant à eux des protéoglycanes composés de chaînes de HS et liés à la membrane plasmique par une ancre GlycosylPhosphatidylinositol (GPI). Contrairement aux syndécanes, l'attachement de leurs chaînes HS est situé près de leur région juxtamembranaire. Cela permet aux trois chaînes HS linéaires de couvrir une grande partie de la surface de la membrane plasmique, présentant ainsi divers morphogènes et facteurs de croissance qui les lient dans une configuration active à leurs récepteurs correspondants. Par ailleurs, les glypicanes sont clivés par (1) des endoprotéases et (2) des lipases. Les protéases de type convertases telles que les furines, clivent, en effet, l'ectodomaine des glypicanes. Ce clivage endoprotéolytique génère deux sous-unités qui sont ensuite liées par des liaisons disulfures. Les lipases extracellulaires clivent, quant à elles, l'ancre GPI des glypicanes libérant la molécule de la membrane plasmique.<sup>114</sup>

## **Les PG péricellulaires**

Les PG péricellulaires incluent les collagènes multiplexines (collagène de type XVIII et XV) ainsi que le perlécane et l'agrine. Ces derniers sont principalement associés à la surface des cellules et peuvent faire partie de la membrane basale ou être présents dans la matrice péricellulaire.<sup>114,125,126</sup> Leurs charges négatives élevées leur permettent de se lier à d'autres protéines de l'ECM, par exemple les facteurs de croissance, et de réguler ainsi de nombreux processus cellulaires, y compris la croissance, l'adhérence et la migration cellulaires.<sup>125,127-130</sup>



## Les PG extracellulaires

Les PG, appelés hyaléctanes, qui se lient aux lectines et à l'acide hyaluronique, et les petits PG riches en leucine (SLRP) sont, tous deux, présents dans l'ECM où ils interagissent avec plusieurs composants matriciels.

### Les hyaléctanes

Les hyaléctanes comprennent quatre PG : le versicane, l'agrécan, le brevican et le neurocan. Les hyaléctanes se caractérisent par une structure à trois domaines : un domaine N-terminal qui se lie à l'acide hyaluronique, un domaine central composé de GAG anioniques sulfatés et une région C-terminale qui se lie aux lectines.<sup>131</sup> L'acide hyaluronique, ou hyaluronane, est un polysaccharide qui n'est pas un protéoglycane mais qui est capable d'interagir avec eux. L'interaction entre la protéine centrale des protéoglycanes et l'acide hyaluronique est stabilisée par la présence d'une protéine de liaison qui interagit avec les deux molécules.<sup>132</sup> L'acide hyaluronique est constitué d'unités disaccharidiques uniques répétées, à savoir l'acide D-glucuronique et la D-N-acétylglucosamine.<sup>133,134</sup> Dans des conditions physiologiques normales, l'acide hyaluronique est constitué de 2 000 à 25 000 disaccharides, ce qui correspond à un polymère linéaire d'une longueur de 2 à 25  $\mu\text{m}$  et d'un poids moléculaire d'environ 106 à 107 Da.<sup>134</sup>

L'agrécan, comme son nom l'indique, a la propriété de s'agréger avec l'hyaluronane en grands complexes supramoléculaires (> 200 MDa).<sup>135</sup> Les agrécans sont liés à l'acide hyaluronique par un module de liaison constitué de 2 domaines globulaires, G1 et G2. Le domaine G1 présente la même structure qu'une molécule de liaison. Une protéine de liaison participe, par ailleurs, à la stabilisation du complexe G1-hyaluronane. Les domaines G1 et G2 sont séparés par une région interglobulaire sensible aux protéases impliquées dans la dégradation de l'agrécan dans un contexte physiologique, *i.e.* homéostasie de l'ECM, et pathologique, *e.g.* l'arthrose. Le domaine G3 situé dans la région C-terminale permet, quant à elle, à l'agrécan de se lier aux sucres simples tels que le galactose présent sur le collagène de type II. Le domaine G3 interagit également avec les tenascines, les fibulines et les glycolipides sulfatés. Ainsi, l'agrécan peut relier et interconnecter divers constituants de la surface cellulaire et de l'ECM.<sup>114,136</sup> La protéine centrale des agrécans contient des chaînes KS (30-40%) et CS (60-70%) chargés négativement. Ces derniers permettent aux agrécans de retenir de grande quantité d'eau, offrant ainsi au tissu une résistance à la compression grâce à leur densité de charge fixe et à leur pression osmotique élevée.<sup>137</sup> Les agrécans sont essentiellement présents

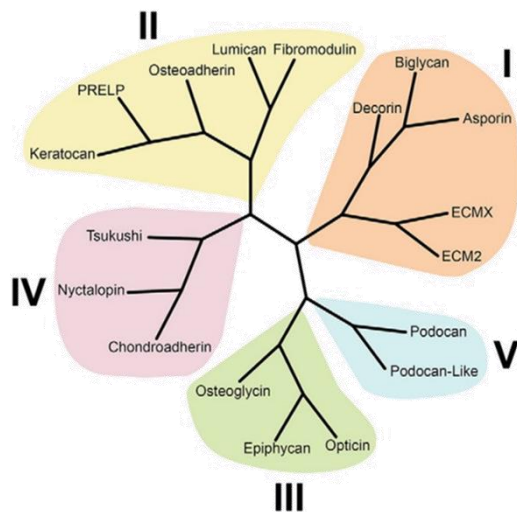
dans le cartilage articulaire. On les retrouve également en petite quantité dans le cerveau, l'œil et la moelle épinière.

Le versicane, comme son nom l'indique, possède des fonctions très variées et est localisé dans une grande variété de tissu. Il est notamment impliqué dans la régulation, l'adhérence, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi que l'inflammation. Ce PG également connu sous l'appellation, PG-M, présente une structure similaire à l'agrécan à quelques expressions près : la région N-terminale comprend un seul domaine globulaire et la protéine centrale contient uniquement des chaînes CS. Par ailleurs, ce domaine central riche en CS est divisé en deux domaines épissés alternativement, appelés CS $\alpha$  et CS $\beta$ . À la suite de l'épissage, 4 isoformes peuvent être générées, *i.e.* V0, V1, V2 et V3.<sup>114,138</sup>

### Les SLRP

Les SLRP désignent la plus grande classe de PG. Ces petites PG peuvent agir à la fois comme constituants structurels et comme molécules de signalisation. Ils contrôlent les propriétés spatiales des tissus puisqu'ils régulent la fibrillogenèse du collagène et immobilisent les facteurs de croissance dans l'ECM.<sup>114</sup> Les SLRP interagissent aussi avec les PG, les cytokines, les récepteurs tyrosine kinases (RTK) et les Toll-like receptors (TLR), régulant ainsi des processus vitaux comme le développement embryonnaire, l'homéostasie, la migration, la prolifération, l'angiogenèse, l'immunité innée, l'apoptose et l'autophagie.<sup>139</sup> Parmi les membres les plus étudiés de cette famille sont la décorine, le lumican, la fibromoduline et le biglycane.<sup>140-143</sup>

Par ailleurs, les 18 membres du SLRP sont regroupés en cinq classes : Cette classification est basée sur plusieurs considérations telles que la conservation et l'homologie au niveau des protéines et du génome et l'organisation chromosomique.<sup>114,144</sup> (Figure 4)



**Figure 4.** Classification of o human SLRP numbered and color-coded by Iozzo and Schaefer, 2015.

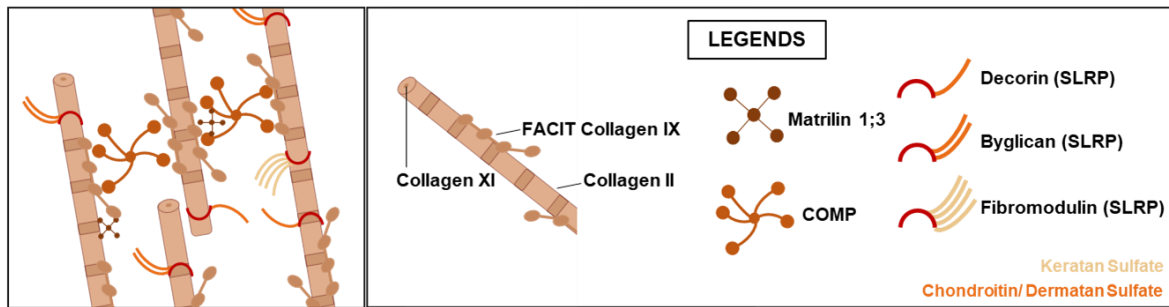
### 1.1.2. Influence des différents composés l'ECM sur la fibrillogenèse du collagène

Dans cette section, un intérêt particulier est accordé à la fibrillogenèse du collagène de type II dans le cartilage articulaire.

Les fibrilles de collagène trouvées dans le cartilage sont des fibrilles hétérotypiques constituées de filaments centraux de collagène de type XI entourés de fibrilles de collagène de type II (~90% de la masse de collagène) ainsi que du FACIT collagènes de type IX localisé au niveau de la couche externe des fibrilles. Ces deux types de collagène contrôlent le diamètre des fibrilles de collagène et assurent les interactions entre les fibrilles de collagène et les autres composants de l'ECM tels que les SLRP.<sup>145,146</sup> En effet, les domaines NC1 et NC3 du FACIT collagène type IX contiennent des résidus cystéinyl impliqués dans la formation de liaisons disulfure inter-chaines. Eyre *et al.* ont mis en évidence la présence de liaisons covalentes entre (1) le domaine NC1 du collagène de type IX et le domaine N-terminal du collagène de type II (réaction d'une hydroxyallysine avec une hydroxylysine) et (2) la chaîne  $\alpha 3(\text{IX})$  du domaine COL2 du collagène de type IX et le domaine C-terminal du collagène de type II.<sup>147-151</sup> Des liaisons entre (1) le domaine NC1, plus particulièrement le domaine C-terminal de la chaîne  $\alpha 3(\text{IX})$ , et la chaîne  $\alpha 1(\text{IX})$  du domaine COL2 et entre (2) la chaîne  $\alpha 3(\text{IX})$  du domaine COL2 et le domaine N-terminal de la chaîne  $\alpha 1(\text{IX})$  du domaine COL2 ont également été identifiées entre deux collagènes de type IX. Ces interactions semblent participer à la stabilisation du réseau de collagène de type II.<sup>147</sup> L'étude de Budde *et al.* a démontré que les souris déficientes en collagène de type IX (KO Col9a1) présentent un cartilage articulaire avec des fibrilles de collagène de type II plus larges que celles des souris « contrôle » (un diamètre moyen de 68.7 nm *versus* 61.9 nm).<sup>152</sup>

Le collagène de type IX assure également les interactions entre les fibrilles de collagène et les autres composants de l'ECM *via* (1) son domaine NC4 qui fournit des sites d'interaction avec d'autres composants de l'ECM comme la protéine de la matrice oligomérique du cartilage (COMP, thrombospondine-5),<sup>146,153</sup> la fibronectine,<sup>145</sup> la fibromoduline et l'ostéoadhérine,<sup>154</sup> (2) son domaine COL3 qui assure les interactions avec la matriline-3.<sup>155</sup> Les COMP interagissent avec plusieurs composants de l'ECM, notamment les collagènes de type I, II et IX, les matrilines et la fibronectine. Hecht *et al.* ont montré que les mutations des COMP engendrent une diminution de la sécrétion de collagène de type IX et de matriline-3 dans la matrice entraînant une désorganisation de l'ECM.<sup>156</sup> L'étude menée par Nicolae *et al* sur des

souris KO matrilin-3 a, quant à elle, démontré que cette protéine module la fibrillogenèse du collagène dans le cartilage. Une déficience matrilin-3 engendre, en effet, une augmentation le diamètre des fibrilles de collagène, démontrant que cette dernière est impliquée dans le contrôle de la croissance latérale des fibrilles.<sup>157</sup> Les COMP semblent, quant à elles, catalyser la formation des fibrilles en favorisant l'association précoce des molécules de collagène, ce qui entraîne une augmentation de la vitesse de fibrillogenèse et une organisation plus distincte.<sup>158</sup> Le collagène de type IX, la COMP et la matrilin-3 semblent donc agir de concert et jouer un rôle majeur dans le maintien du réseau fibrillaire de collagène de type II. Les SLRP telles que les décorines, les fibromodulines, les lumicanes et les biglycanes présentes dans l'ECM en petites concentrations, interagissent également avec les fibrilles de collagène en régulant leur diamètre ainsi que leur interaction avec les autres composants de la matrice.<sup>98,145,159-167</sup> Bien que leur fonction exacte et leur mode d'interaction soient encore mal connus, leur implication dans la fibrillogenèse du collagène de type I, II et/ou III est un fait établi dans la littérature.<sup>71,96,144,168-173</sup> En effet, tous les modèles de déficience en SLRP présentent une régulation dysfonctionnelle du diamètre des fibrilles et une structure altérée des fibrilles de collagène.<sup>70,170,174,175</sup> Les décorines et les biglycanes appartiennent, tous deux, aux SLRP de catégorie I tandis que les lumicanes et les fibromodulines appartiennent à la classe II. Les SLRP de la même classe ont une action compétitive puisqu'ils interagissent avec la fibrille de collagène par le même site d'interaction.<sup>176,177</sup> A titre d'exemple, les souris déficientes en décorine présentent une augmentation de l'expression du biglycane, suggérant une compensation fonctionnelle entre ces deux SLRP.<sup>174</sup> Les souris déficientes en lumicanes et fibromoduline présentent une fréquence anormalement élevée de fibrilles de petit et de grand diamètre, indiquant un dérèglement de la formation et de la maturation des fibrilles de collagène de type I.<sup>178</sup> Le rôle des lumicanes dans la fibrillogenèse du collagène de type II n'a pas encore été étudié tandis que la fibromoduline interagit avec les collagènes de type I et II à triple hélice.<sup>169,179</sup> Dans le cartilage, la quantité de fibromoduline est en corrélation avec la taille des fibrilles de collagène.<sup>179</sup> Les souris déficientes en fibromoduline présentent également des os et des dents sous-minéralisés,<sup>178,180</sup> révélant un rôle de la fibromoduline à la fois dans la fibrillogenèse du collagène et dans la minéralisation. Outre leur rôle dans la formation et l'organisation des fibrilles de collagène, les biglycanes et les décorines, les deux SLRP les plus abondantes du cartilage, interagissent avec le collagène non fibrillaire de type VI dont ils influencent aussi l'assemblage.



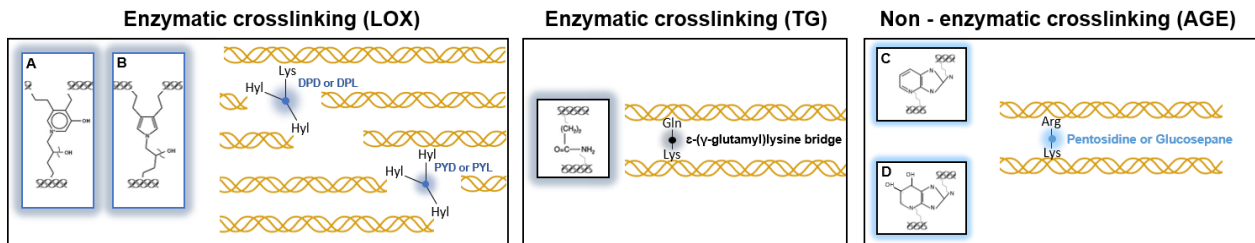
**Figure 5.** Schematic illustration of the involvement of FACIT collagen type IX, matrilin, COMP and SLRPs in the regulation collagen type II fibrillogenesis.

### 1.1.3. Le remodelage de l'ECM

Les composants structurels de l'ECM présentent une grande longévité *in vivo* souvent mesurée en année par opposition à celle des protéines intracellulaires qui n'est souvent que de quelques heures. A titre d'exemple, les collagènes de types I et II dans la peau humaine, le cartilage articulaire et le disque intervertébral présentent des demi-vies de 15, 95 et 117 ans, respectivement.<sup>181,182</sup> Toutefois, l'ECM est sujette à un remodelage constant au cours duquel les composants sont synthétisés, modifiés ou dégradés. La composition et la structure de l'ECM étant à l'origine des propriétés fonctionnelles de l'ECM, tout changement dans l'homéostasie de l'ECM affecte les propriétés biochimiques, biophysiques et biomécaniques de la matrice. Il est bien connu que la synthèse des composants de l'ECM et des enzymes dégradatives est en corrélation positive avec la modification de la charge mécanique.<sup>183,184</sup> Autrement dit, l'augmentation de la charge mécanique tend à accroître à la fois la production cellulaire et l'élimination des constituants structurels.<sup>185,186</sup>

Les propriétés biomécaniques de l'ECM sont étroitement contrôlées par la composition et la concentration spécifiques des composants de l'ECM, ainsi que par des modifications post-sécrétion, *e.g.* la réticulation du collagène. Le collagène est, en effet, sujet à deux type de réticulation : (1) les réticulations régulées enzymatiquement telles que celles régulées par les LOX et les transglutaminases (**Figure 6**)<sup>187-190</sup> et (2) les réticulations régulées non enzymatiquement qui se produisent généralement par glycation ou à la suite d'une hausse de la concentration en PG.<sup>98,191,192</sup> Les réticulations non enzymatiques participent à la rigidification de l'ECM mais dans une plus faible mesure que celles catalysées par les LOX.<sup>193</sup> Compte-tenu de la durée de vie des collagènes, l'effet de la glycation sur la réticulation est important. La glycation est le processus par lequel les lysines ou les hydroxylysines du collagène hélicoïdal réagissent avec des sucres comme le glucose ou le ribose pour former du glucosépane et de la

pentosidine par la réaction de Maillard. Ces liaisons croisées sont connues sous le nom de produits finaux de glycation avancée (AGE, **Figure 6**). Ces derniers sont associés au vieillissement et à des états pathologiques.<sup>194</sup> Il convient de noter que toutes les protéines sont sujettes à la glycation.



**Figure 6.** Schematic representation of enzymatic and non-enzymatic collagen crosslinking. (A,B) mature crosslinks (trivalent) mediated by LOX: Pyridinoline (PYD) /Deoxy-Pyridinoline (DPYD) and Pyrrololine (PYL)/Deoxy-Pyrrololine (DPL), respectively (more detail in Figure 3) (C,D) AGE products: Pentosidine and glucosepane, respectively. TG: Transglutaminase.

Les cellules sécrètent des enzymes dégradatives, telles que l'héparanase, les hyaluronidases, les matriptases, diverses protéases à sérine et à thréonine et la superfamille des métzincines qui sont des de métalloenzymes à zinc. Cette famille comprend les métalloprotéinases matricielles (MMP), les désintégrines et métalloprotéinases (ADAM), les ADAM à motifs thrombospondine (ADAMTS), responsables de la dégradation protéolytique des composants de l'ECM.<sup>195</sup> On recense chez les mammifères 24 MMP, 40 ADAM et 19 ADAMTS.<sup>196-199</sup> Alors que tous les ADMATS sont présentes chez l'homme, seules 23 MMP et 21 ADAM y ont été identifiées.<sup>200</sup> Les MMP sont pour la plupart synthétisées et sécrétées sous forme d'enzymes inactives et restent dans un état latent jusqu'à subir une activation catalytique par diverses protéases telles que les sérine protéases, *e.g.* la plasmine.<sup>201</sup> Cette activation peut également être réalisé par d'autres MMP déjà actives comme les MMP transmembranaires. Il convient de noter que certaines MMP, (MMP-11, 27 et transmembranaires), sont activées avant la sécrétion par des enzymes de type furine.<sup>202</sup> Contrairement aux MMP, l'activation catalytique des ADAM se produit principalement avant la sécrétion au niveau intracellulaire.<sup>203-205</sup> Les ADAMTS, quant à elles, peuvent être sécrétées, à la fois, sous une forme inactive ou active.<sup>206,207</sup> L'activité protéolytique de ces protéases est régulée par des inhibiteurs endogènes dont les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP).<sup>195,208,209</sup> Les TIMP, petites protéines de 21-28 kDa au nombre de 4 (TIMP1 à 4), se lient au site actif des métalloprotéinases dans un rapport stœchiométrique de 1:1, empêchant la liaison de celles-ci à leurs substrats. D'un point de vue fonctionnel, les MMP constituent le principal groupe d'enzymes responsables de la dégradation du collagène et des autres protéines

de l'ECM telles que l'élastine et la gélatine. Les MMP contribuent également à la libération d'une multitude de cytokines stockées dans l'ECM.<sup>201,208,210</sup> Sur la base de leur structure primaire et de leur spécificité vis-à-vis de certains substrats protéiques, les MMP peuvent être classées en 6 groupes.

- les matrilysines (MMP-7 et 26) spécifiquement exprimées par les cellules cancéreuses d'origine épithéliale dégradent la fibronectine et la gélatine<sup>211,212</sup>
- les collagénases interstitielles (MMP-1, 8 et 13) dégradent les collagène fibrillaire en collagène dénaturé (gélatine) qui sera par la suite dégradé par les gélatinase<sup>213</sup> La MMP-13 est la principale protéase du collagène de type II.
- les stromélysines (MMP-3, 10 et 11) clivent de nombreux glycoprotéines et protéoglycanes<sup>202</sup>
- les gélatinase (MMP-2 et 9) qui dégradent principalement la gélatine et les collagènes de type IV et V<sup>214</sup>
- les MMP transmembranaires (MMP-14, 15, 16, 17, 24 et 25) capables de se lier à la membrane cellulaire, dégradent de nombreux composants de l'ECM dont les facteurs de croissance. Ces protéases participent également à l'activation catalytique des autres MMP.<sup>215</sup>
- le groupe hétérogène (MMP-12, 18, 19, 20, 21, 23, 27 et 28) qui regroupe les MMP les plus récemment découvertes, dont leur rôle sont encore mal connu.

Les ADAM clivent et libèrent des facteurs solubles comme les chimiokines,<sup>216</sup> assurent la libération de protéines associées à la membrane dans leurs formes actives (comme le TNF- $\alpha$ )<sup>217</sup> ou régulent l'expression des gènes par la génération de molécules qui agissent potentiellement comme des facteurs de transcription après protéolyse intramembranaire et translocation vers le noyau.<sup>216</sup> Les ADAMTS sont classées en fonction de leurs substrats de clivage au sein de l'ECM. Ces substrats comprennent les protéoglycanes, les N-pro-peptides du procollagène, la protéine de la matrice oligomérique du cartilage (COMP) et des substrats inconnus ou "orphelins".<sup>206</sup> Un groupe d'enzymes ADAMTS (ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15 et -20) peut cliver l'agrécan, le versicane, le brévicane et le neurocane.<sup>218-221</sup>

## 1.2. Le système ostéoarticulaire : une unité d'intérêt pour l'étude des tissus conjonctifs spécialisés

Le système ostéoarticulaire, structure de soutien du corps, est un assemblage complexe de divers tissus conjonctifs, notamment des cartilages, des os, des muscles, des tendons, des ligaments, des capsules articulaires et des tissus adipeux. Une articulation désigne la jonction entre deux extrémités osseuses et permet le mouvement et la flexibilité du corps. Il existe trois types d'articulations, classées en fonction de leur structure et de leur degré de mobilité.<sup>222,223</sup> (Figure 7)

— **Les articulations fibreuses immobiles**, également appelées synarthroses, où les os sont maintenus ensemble structurellement par un épais tissu conjonctif fibreux riche en fibres de collagène. Ce type d'articulation se rencontre notamment au niveau de la suture coronale entre les os frontal et pariétal afin de maintenir les os du crâne ensemble et protéger le cerveau.<sup>224</sup>

— **Les articulations cartilagineuses semi-mobiles**, également nommées amphiarthroses, où les os sont reliés par un cartilage hyalin ou fibrocartilage. Le cartilage hyalin, très souple et élastique, se trouve entre certains os de la cage thoracique, tandis que le fibrocartilage, plus résistant mais moins souple, compose les disques intervertébraux de la colonne vertébrale.<sup>225</sup>

— **les articulations synoviales librement mobiles**, ou diarthroses, où les os reliés sont confinés dans une cavité remplie de liquide synovial. Ce liquide agit comme un lubrifiant visqueux réduisant la friction entre les os. Les articulations synoviales sont les plus abondantes du corps et peuvent être subdivisées en six types selon la morphologie des surfaces articulaires et le degré de mouvement.<sup>226</sup> (Table 3) .

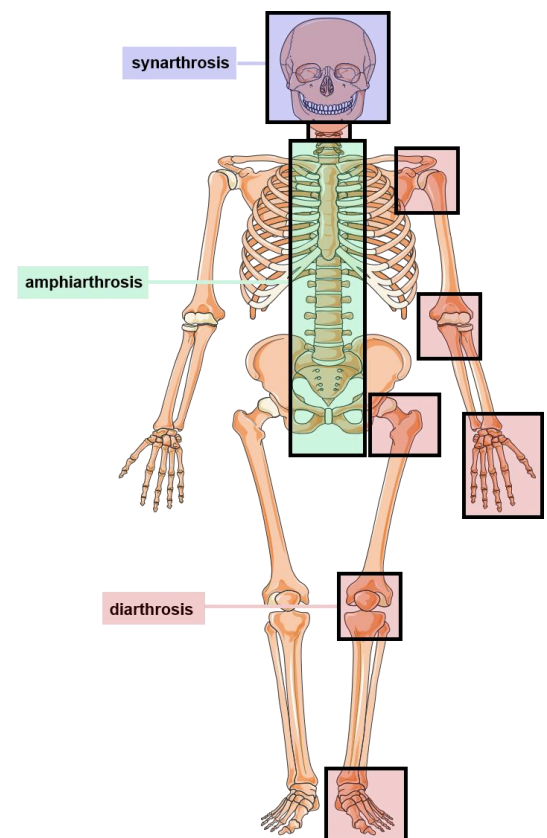
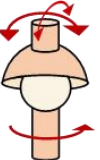
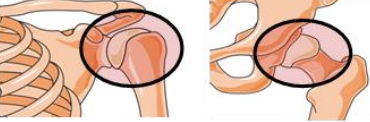


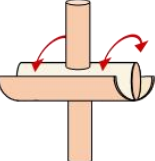
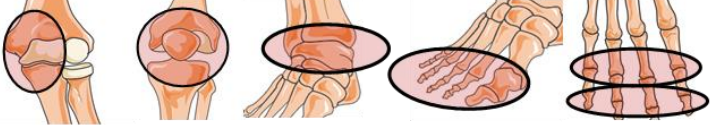
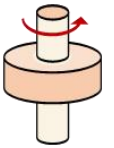
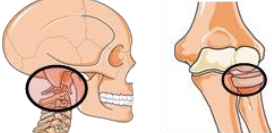


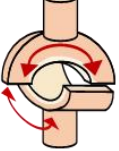



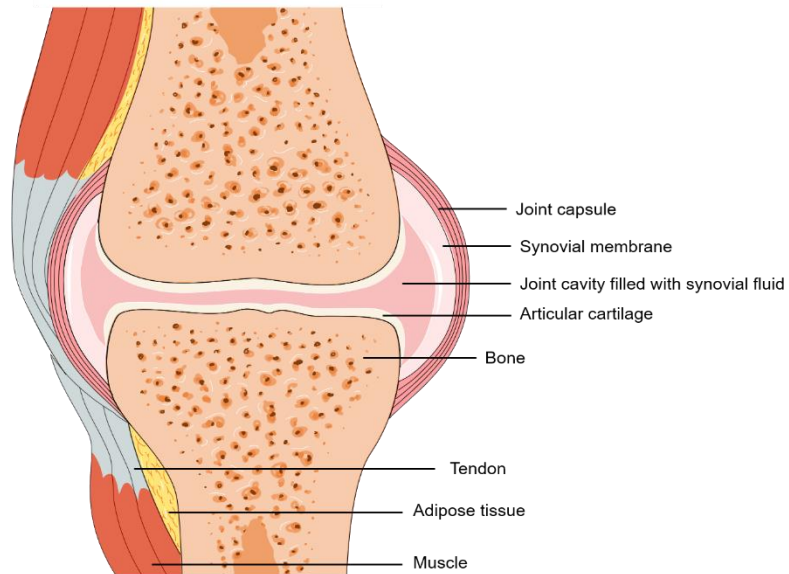
Figure 7. Different types of body joint



**Table 3.** Different types of body synovial joint classified in function of their motion degree

Synovial Joint Type <i>also named diarthrosis</i>	Motion	Localisation
Ball-and-socket		shoulder      hip 
Ellipsoid, also named condyloid		wrist      fingers      foot 
Hinge		elbow      knee      ankle      toes      fingers 
Pivot		skull      elbow 
Plane, also named gliding		thorax      hand      foot 
Saddle		inch 

Dans le présent travail, notre attention se focalisera sur la capsule articulaire et le cartilage articulaire, deux tissus conjonctifs souple de l'articulation synoviale. Leur structure et leur composition sont décrites en détail ci-dessous (**Figure 8**).



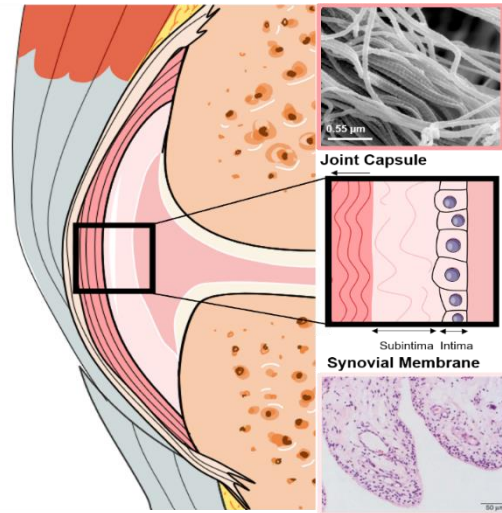
**Figure 8.** General illustration of the synovial joint structure. The latter comprise different tissues such as joint capsule, articular cartilage and bone.

### 1.2.1. La capsule articulaire

Comme le montre la **Figure 8**, la capsule articulaire est la structure qui délimite et maintient la cavité synoviale de l'articulation. En association avec les ligaments et les tendons, la capsule articulaire stabilise et protège l'articulation en limitant son amplitude de mouvement et en répartissant la charge biomécanique.<sup>227,228</sup> Cette enveloppe sert également d'attache à la membrane synoviale, un tissu conjonctif lâche hautement vascularisé et innervé impliqué dans la production du liquide synovial, un ultrafiltrat de plasma sanguin contenant de l'acide hyaluronique, des lipides, de la lubriline et d'autres produits des chondrocytes.<sup>229,230</sup> Ce lubrifiant contribue à la résistance aux forces de cisaillement et de compression générées par le mouvement tout en permettant la nutrition des cartilages articulaires avasculaires par pression osmotique.<sup>231</sup>

La membrane synoviale, partie interne de la capsule, est divisée en deux couches, l'intima et la sous-intima (**Figure 9**). L'intima, qui est en contact avec le liquide synovial, est composée de synoviocytes de type A (de type macrophagique) et de type B (de type fibroblastique). Les premiers ont pour fonction de nettoyer les débris produits résultant de l'usure de l'articulation et participent aux réponses immuno-inflammatoires en condition pathologique tandis que les seconds produisent le liquide synovial ainsi que les composants de l'ECM.<sup>232</sup> Par ailleurs, la sous-intima comporte différents types de cellules, dont des

fibroblastes, des cellules endothéliales et des mastocytes, réparties dans une ECM abondante. Cette dernière se compose de fibronectine, de laminine, de protéoglycanes, de collagènes de type III, IV, V, avec une petite quantité de type I et d'acide hyaluronique dont la concentration diminue à mesure qu'on progresse dans la sous-intima.<sup>232-236</sup>



**Figure 9.** Joint capsule structure: TEM images of collagen fibrils present in the joint capsule tissue that surrounds the knee (Magnified 140000x, Thermo Fischer image gallery), Photomicrographs of the synovial membrane (*c.f.* Bresnihan *et al.*)




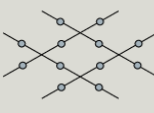


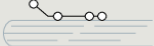
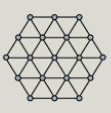
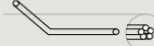
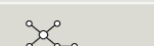



L'ECM de la capsule articulaire, qui correspond à la couche externe, est principalement composée de fibrilles de collagène de type I (83% des collagènes présents) organisés en fibres orientées multiaxialement qui confèrent à ce tissu ses propriétés biomécaniques. La résistance à la traction du tissu dépend, en effet, du diamètre moyen des fibrilles et des liaisons intermoléculaires, *e.g.* les réticulations, entre les fibrilles qui empêchent les glissements sous charge.<sup>237-241</sup> L'ECM comprend également de petites quantités de collagène de type III (17% des collagènes présents) et de protéoglycanes de type dermatane sulfate.<sup>237,238</sup>

### 1.2.2. Le cartilage articulaire

Le cartilage est un tissu conjonctif avasculaire et aneural, contenant un unique type de cellules, les chondrocytes, qui sont enchevêtrées dans une ECM hautement hydratée riche en protéoglycanes et en fibrilles de collagène. Cette dernière est produite, organisée et entretenue par les chondrocytes. On distingue trois types de cartilage : hyalin, fibreux et élastique. Cette classification est basée sur la présence d'élastine ou du type de collagène majoritaire, type I ou II, dans l'ECM. Il est important de noter que le cartilage comprend 13 autres types de collagène

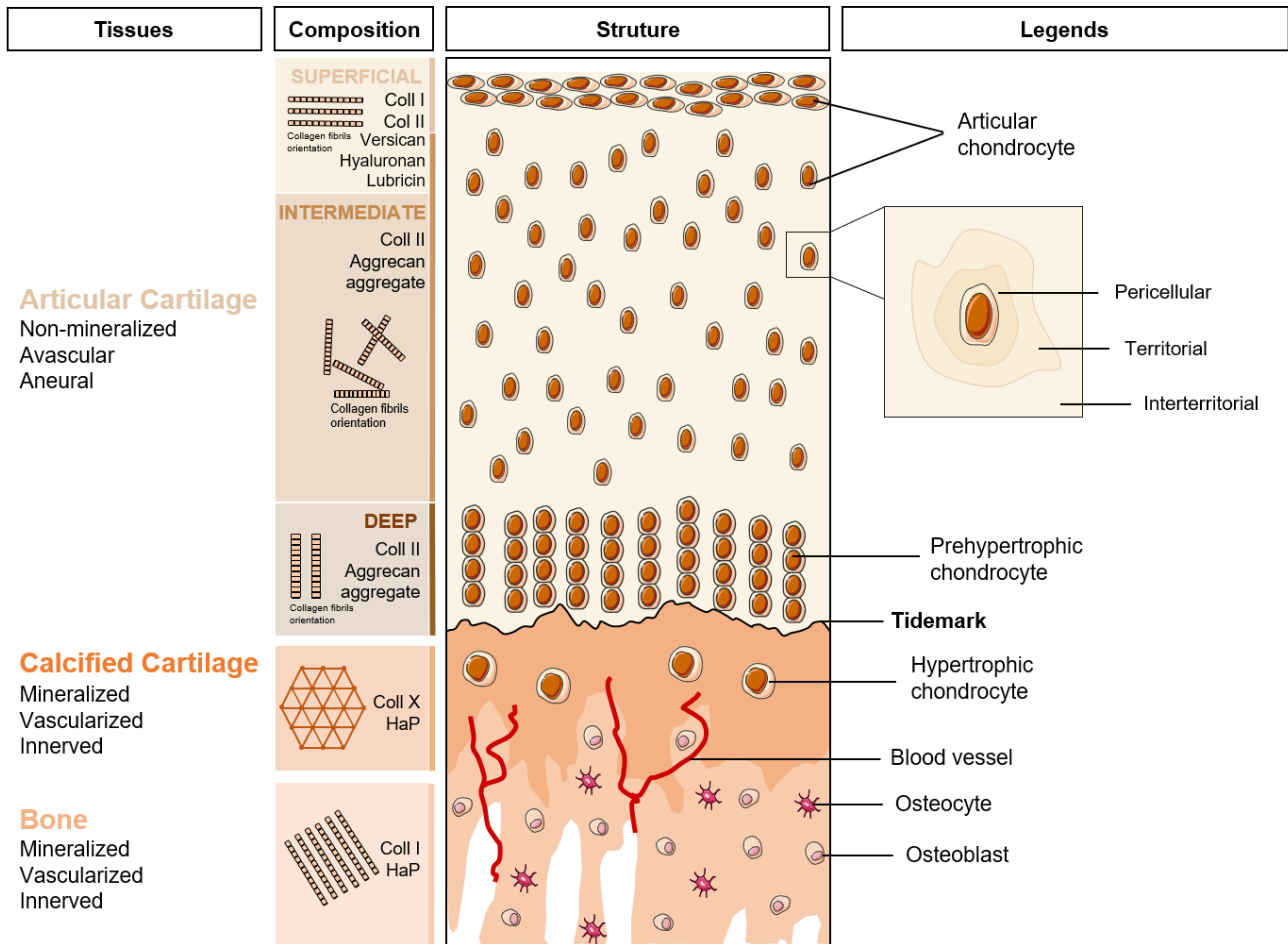
présents en proportion mineure ( $\leq 10\%$  du collagène présent dans le cartilage) dans l'ECM, *i.e.* du collagène de type III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XVI, XXII et XXVII. Bielajew *et al.* ont établi une classification de ces derniers en fonction de leur rôle dans le cartilage (Tableau 1).<sup>42</sup>

**Tableau 1.** The collagen subtypes of cartilage. Abbreviation: E, elastic cartilage; F, fibrocartilage; H, hyaline cartilage; PCM, pericellular matrix; TM, territorial matrix; ECM refers to interterritorial matrix also named extracellular matrix (*c.f.* Bielajew *et al.*)

Collagen subtype	Cartilage location	Description	Structure
I	ECM (E, F)	Main fibrillar type of fibrocartilage and elastic cartilages	
II	ECM (E, F, H)	Main fibrillar type of hyaline, fibrocartilage and elastic cartilages	
III	ECM (E, F, H)	Fibrillar type co-assembling with collagen type I Involved in repair response with collagen type II	
IV	PCM (H)	Tetrameric network in PCM of articular cartilage Potential involvement in chondrocyte homeostasis	
V	ECM (E, F)	Fibrillar type co-assembling with collagen type I	
VI	PCM (E, F, H)	Regulation of PCM properties and mechanotransduction	
IX	ECM (E, F, H)	Forms crosslinks with collagen type II; forms collagen type II-IX-XI heterofibrils	
X	Deep zone (H)	Produced by hypertrophic chondrocytes; marker of endochondral ossification	
XI	ECM (E, F, H)	Involved with fibrillogenesis of collagen type II; forms collagen type II-IX-XI heterofibrils	
XII	ECM (E, F, H)	Codistributed with collagen types I and II; may contribute to fibril alignment and stabilization	
XIII	Deep zone (H)	Involved with endochondral ossification	
XIV	ECM (E, F, H)	Involved in fibrillogenesis of collagen types I and II	
XVI	TM (H)	Associates with collagen type II fibrils; may stabilize larger collagen fibrils	
XXII	Synovial junction (H)	Associates with collagen type VI; role in cartilage understudied	Not yet determined
XXVII	Deep zone (H)	Associated with endochondral ossification; structural role in PCM of growth-plate cartilage	Not yet determined

Le cartilage fibreux, ou fibrocartilage, localisé dans les ménisques, les disques intervertébraux (annulus fibrosus) et les sites d'insertion des ligaments, tendons et des capsules articulaire, se compose essentiellement de fibres de collagène de type I orientées dans la direction de la force de traction exercée sur le tissu. L'organisation de ces fibres en couches denses confère au fibrocartilage une haute résistance à la traction et à la déformation, ce qui en fait le plus résistant des types de cartilage. Par ailleurs, les chondrocytes sont présents de manière dispersée entre les fibres de collagène et orientés dans le sens de la force exercée sur les fibres de collagène. Le cartilage élastique, riche en fibres élastiques et en chondrocytes est très résistant et hautement flexible. Ces fibres sont essentiellement composées d'élastine, chaîne polypeptidique très hydrophobe *ca.* 1000 fois plus flexibles que les fibrilles de collagènes de type I et II également présentes dans le tissu. On retrouve le cartilage élastique dans l'oreille externe, les ailes du nez et l'épiglotte. Le cartilage hyalin, type de cartilage le plus abondant dans le corps humain, est un tissu hypocellulaire essentiellement composé de fibrilles de collagène de type II. Ce cartilage est présent au niveau du nez, des côtes, du larynx, de la trachée et des bronches. Il est aussi celui retrouvé aux extrémités des os dans les articulations synoviales.<sup>42,242-247</sup>

Le cartilage articulaire est lisse avec une épaisseur moyenne de 2 à 4 mm chez l'Homme. Son rôle principal est de réduire la friction et de résister à des charges importantes pendant le mouvement.<sup>248</sup> Les chondrocytes qui ne représentent que 4% du poids <sup>248-250</sup> du cartilage articulaire se caractérisent par un faible renouvellement cellulaire et par un métabolisme quiescent. Ils assurent la production et l'organisation des composants de l'ECM.<sup>251,252</sup> Il convient de noter que les chondrocytes utilisent majoritairement le glucose comme substrat énergétique.<sup>253</sup> Par ailleurs, ces cellules hautement spécialisées vivent en hypoxie et privilégient un métabolisme anaérobie. En effet, il existe un gradient de teneur en oxygène décroissant en fonction de la profondeur du cartilage (5% en surface et 1% en profondeur).<sup>254-257</sup> Par ailleurs, les chondrocytes présentent une morphologie, un phénotype et une organisation/densité différents selon leur localisation dans le cartilage (**Figure 10**). Il existe en effet un continuum phénotypique des chondrocytes, de la surface du cartilage articulaire à la jonction ostéochondrale, qui correspond à une succession de stades de différenciation différents vers le stade terminal hypertrophique. Aussi, dans la zone la plus profonde du cartilage non calcifié, les chondrocytes présentent un phénotype préhypertrophique (Prehyp) tandis que dans le cartilage calcifié, les chondrocytes sont hypertrophiques (Hyp). La structure et la composition de la matrice synthétisée varient donc avec l'organisation zonale.<sup>248</sup>



**Figure 10.** Osteochondral junction organization and composition

### 1.2.2.1. Le cartilage articulaire non calcifié

L'ECM du cartilage articulaire non calcifié contient une quantité importante d'eau (65-85% en poids), et est principalement composée de fibrilles de collagène de type II (environ 20-30% en poids) et d'agrégats chargés négativement (environ 10-15% en poids) organisés en un réseau tridimensionnel particulier.<sup>248,249,258</sup> Plusieurs autres familles de molécules sont également présentes en plus faible proportions comme par exemple les lipides, les phospholipides, les protéines non collagéniques dont font parties notamment les glycoprotéines. D'autres collagènes tels que les types I, III, IV, V, VI, IX, XI et XIV sont également présents, mais en très faible concentration.<sup>259-261</sup>

Le collagène de type II est sécrété par les chondrocytes sous la forme de tropocollagènes solubles composés de trois chaînes alpha 2 identiques (triple hélice). Les tropocollagènes s'auto-assemblent en fibrilles par un processus de régulation cellulaire. Les agrécans, les

protéoglycanes les plus abondants dans le cartilage, sont constitués de GAG sulfatés anioniques, le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératane, liés de manière covalente à un squelette protéique central. Les agrécans n'existent que sous forme d'agrégats au sein de l'ECM, c'est-à-dire qu'ils sont attachés de manière non covalente à une autre longue chaîne de GAG, l'acide hyaluronique, via une "protéine de liaison" pour former un agrégat d'agrécans plus grand.<sup>262</sup> L'interaction de ces deux assemblages supramoléculaires, les fibrilles de collagène et les agrécans, confère au cartilage articulaire les remarquables propriétés biomécaniques requises pour le mouvement de l'articulation.<sup>248</sup> L'architecture stratifiée du cartilage articulaire semble également jouer un rôle majeur dans l'absorption et la dissipation des chocs mécaniques.<sup>259,263-265</sup>

### **Organisation stratifiée du cartilage articulaire**

Le cartilage articulaire est organisé en différentes couches successives qui diffèrent entre elles en termes de composition, d'organisation de l'ECM mais également par le phénotype et le profil d'expression génique des chondrocytes qui les composent.

#### La zone superficielle

La zone superficielle est la couche supérieure du cartilage articulaire, en contact avec la cavité articulaire remplie de liquide synovial. Cette zone, qui représente 10 à 20 % de l'épaisseur du cartilage articulaire, est caractérisée par la présence d'une grande proportion de petits chondrocytes aplatis et de fines fibrilles de collagène densément tassées, alignées parallèlement à la surface du cartilage articulaire. Cette organisation des fibrilles permet de diminuer les frictions et les contraintes de cisaillement lors du mouvement. Cette zone riche en eau et en collagène de type II contient également divers composants participant à la lubrification de l'articulation. Il est intéressant de noter que la zone la plus externe de la zone superficielle, qui est en contact direct avec le liquide synovial, est acellulaire et semble être principalement composée de fibrilles hétérotypique de collagène de type I et III, de lubricine, de décorine, de biglycane, d'asporine, de ténacine-C, de perlécane, de thrombospondin-4 et d'HA.<sup>259,263-274</sup>

#### La zone intermédiaire

La zone intermédiaire fait référence à la couche moyenne du cartilage articulaire, qui représente 40 à 60 % de son épaisseur. Cette zone est caractérisée par une plus faible densité de cellules de forme ronde et une orientation aléatoire des fibrilles de collagène de type II. Les chondrocytes de cette couche expriment une grande quantité de collagène de type II et

d'agrécan. Le mimécane et la trombospondine-1 semble, par ailleurs être plus présents dans l'ECM de cette zone. Fonctionnellement, la zone intermédiaire est la première couche impliquée dans la résistance aux forces de compression.<sup>259,266,268-270,274-276</sup>

### La zone profonde

La zone profonde correspond à la couche la plus profonde du cartilage articulaire et représente 30% de son épaisseur. Dans la zone profonde, les chondrocytes sont organisés en colonnes le long des fibrilles de collagène orientés, tous deux, perpendiculairement à la tidemark, ligne de démarcation basophile entre la zone profonde et le cartilage calcifié. Cette organisation des fibrilles de collagène de type II semble conférer à la zone profonde une plus grande résistance aux forces de compression. La zone profonde du cartilage articulaire est, par ailleurs, enrichie en agrécan, fibromoduline, matrix gla protein (MGP), ostéopontine et ostéonectine (protéine SPARC).<sup>274</sup> Ces quatre protéines sont impliquées dans la régulation de la minéralisation.<sup>178,180,277-281</sup>

Il est à noter que le diamètre des fibrilles de collagène de type II augmente de la zone superficielle à la zone profonde du cartilage articulaire, de même que la teneur en agrécan.<sup>259,266,269,270,282</sup> Changoor *et al.* ont en effet mesuré un diamètre moyen de  $55.8 \pm 9.4$  nm,  $87.5 \pm 1.8$  nm et  $108.2 \pm 1.8$  nm en zone superficielle, intermédiaire et profonde à partir de cartilage articulaire humain analysé par microscopie à balayage (SEM).<sup>283</sup> La composition et l'organisation du cartilage articulaire, en termes de fibrilles de collagène et d'agrécan, varient donc avec la profondeur du cartilage tout comme les propriétés mécaniques,<sup>159,284-289</sup> e.g. le module élastique augmente de  $0.52 \pm 0.05$  MPa à  $1.46 \pm 0.11$  MPa chez le lapin et de  $0.08 \pm 0.04$  MPa à  $1.14 \pm 0.44$  MPa chez le bovin.<sup>159,160</sup> Ce gradient permet d'optimiser la réponse du cartilage aux contraintes mécaniques engendrées lors des mouvements. Il est également nécessaire à la diffusion dans le cartilage des nutriments nécessaires aux chondrocytes et au maintien de leur métabolisme.<sup>290-297</sup>

Bien que le cartilage articulaire s'organise en différentes couches qui présentent de différences en termes de phénotypes chondrocytaires, d'organisation des fibres de collagène et de composition matricielle, il est à noter que certaines protéines comme la décorine et le biglycane ne semblent pas avoir une concentration qui varie selon la zone du cartilage articulaire considérée.<sup>274</sup>



## Organisation radiale du cartilage articulaire selon la distance aux chondrocytes

La matrice du cartilage peut également être subdivisée en trois régions définies en fonction de la distance radiale des chondrocytes (**Figure 12**) : la région péricellulaire (PCM), territoriale<sup>294</sup> et interterritoriale. Bien qu'il soit établi que la matrice présente un gradient de composition, de structure et de réponse biomécanique, la définition/distinction entre la matrice PCM et territoriale varie selon les études. La PCM du cartilage articulaire discutée ici fera référence à la matrice péricellulaire et territoriale (2 à 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) tandis que l'ECM se référera à la matrice interterritoriale. En effet, bien qu'il soit admis qu'il y ait une variation radiale de la composition et de l'organisation de la matrice, la délimitation entre la zone péricellulaire et territoriale ne fait pas l'objet d'un consensus dans la littérature.

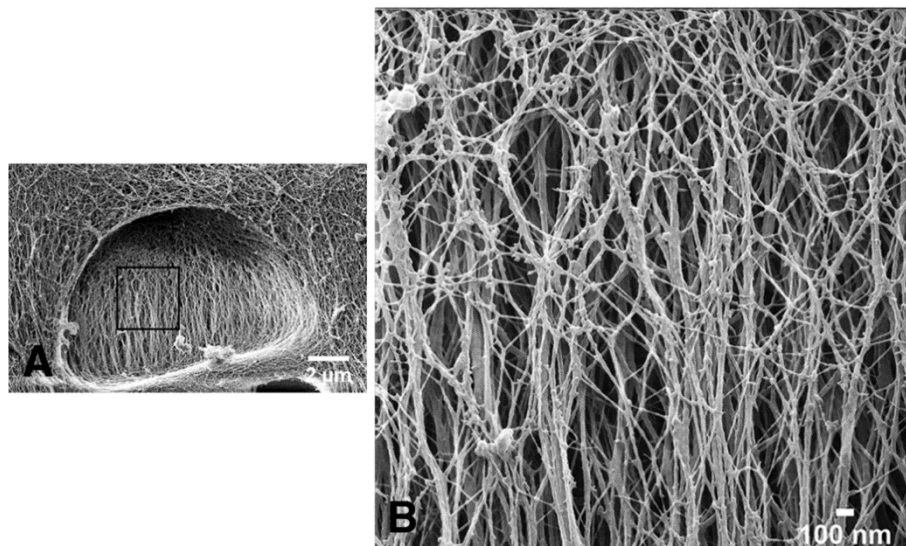
La PCM se distingue de l'ECM par sa composition, sa structure et ses propriétés biomécaniques.<sup>298-301</sup> La PCM semble contenir des collagènes de types IV, VI et IX,<sup>302-304</sup> des perlécane,<sup>305-307</sup> des hyaluronanes,<sup>308,309</sup> des monomères d'agrécanes,<sup>310</sup> des biglycanes,<sup>311</sup> des decorines,<sup>312</sup> des fibronectines<sup>313</sup>, des laminines<sup>314</sup> et d'autres protéines non collagéniques comme les matrilines et la COMP. Ces macromolécules semblent conférer à la PCM entourant les cellules la capacité de transduire des signaux biomécaniques et biochimiques aux chondrocytes.<sup>260,273,298,300,315-319</sup> Ce microenvironnement permet également de protéger les chondrocytes pendant la charge de compression. Peters *et al.* ont en effet démontré que le collagène de type VI, localisé exclusivement dans la PCM, joue un rôle fonctionnel important puisqu'il protège les chondrocytes du stress environnant et les empêche ainsi d'entrer en apoptose.<sup>320</sup> En effet, l'étude réalisée par Alexopoulos *et al.* sur des souris KO col6a1 a démontré que cette déficience engendre une diminution des deux tiers du module élastique de la PCM.<sup>319</sup> Darling *et al.* ont montré, par analyse AFM (spectroscopie de force), que le module élastique de l'ECM est significativement plus élevé que celui mesuré dans la PCM dans les tissus humains, porcins et murins, *e.g.*  $306 \pm 133$  kPa *versus*  $104 \pm 51$  kPa chez l'humain.<sup>318</sup> Bien que la valeur du module de Young varie selon l'espèce étudiée, la technique d'analyse utilisée et des conditions expérimentales, cette tendance est également observée dans la littérature *via* l'utilisation d'autres techniques d'analyse telles que par aspiration à la micropipette.<sup>166,167,294,298,301,319,321-323</sup>

Il est intéressant de noter que la structure et la composition de la PCM semblent également lui conférer une résistance à la dégradation enzymatique. L'étude de Wilusz et Guilak utilisant une digestion ciblée avec l'aggrécanase-1 (ADAMTS-4), la hyaluronidase

bactérienne et la chondroïtinase ABC a démontré que les propriétés mécaniques de la PCM présentent une résistance élevée à la digestion ciblée d'agrecane, malgré des altérations significatives des propriétés de l'ECM.<sup>324</sup> Cette résistance peut être une propriété importante de la PCM puisqu'elle permet le transport des enzymes des chondrocytes vers l'ECM et donc l'homéostasie de cette dernière tout en préservant la structure et les propriétés de la PCM.

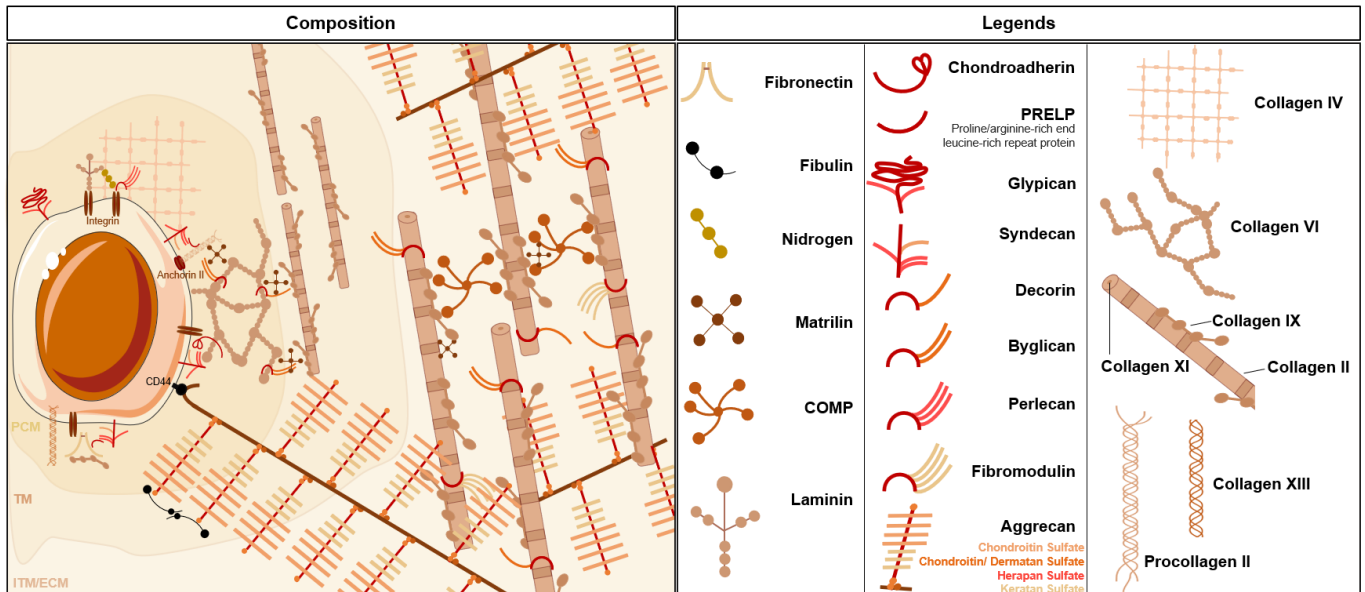
La PCM est également le lieu où les composants matriciels nouvellement synthétisés s'autoassemblent. Comme évoqué précédemment le collagène de type II est sécrété sous forme de tropocollagènes avant d'être soumis à un traitement protéolytique de ses télépeptides<sup>37</sup> Les tropocollagènes matures s'auto-assemblent ensuite en fibrilles sous l'influence entre autres du collagène de type IX, des SLRP, de la matrilines 3 et de la COMP.

Yingst *et al.* y ont constaté la présence de fines fibrilles de collagène nouvellement sécrétées.<sup>325</sup> Une augmentation du diamètre des fibrilles de collagène en fonction de la distance aux chondrocytes est observée. En effet, les chondrocytes sont encastrés dans la PCM/matrice territoriale riche en fines fibrilles de collagène de type II (20 nm) orientées parallèlement à la surface des chondrocytes (**Figure 11**).<sup>289,298,325,326</sup> Lorsqu'on s'éloigne des cellules (matrice interterritoriale), le diamètre des fibrilles augmente (jusqu'à 500 nm).<sup>325,327</sup>



**Figure 11.** Helium ion microscopy images of PCM baskets that house cartilage cells within the collagen network (A). The interior layer of collagen that surrounds the cell (B) is a microfibrillar mesh that differs in morphology from the banded collagen fibrils more distant from the cell (background, ECM). (*c.f.* Vanden Berg-Foels *et al.*)

Il convient de noter que la composition globale de la matrice du cartilage articulaire n'est pas encore complètement élucidée en raison de sa complexité et de son hétérogénéité, *i.e.* la fonction et le mode d'interaction de l'ensemble des composants.



**Figure 12.** Organization and composition of the matrix according to the radial distance from the chondrocytes

#### 1.2.2.2. Le cartilage calcifié

La zone la plus profonde du cartilage qui représente 3-10% de l'épaisseur du cartilage correspond à la couche intermédiaire entre le cartilage articulaire non calcifié, et l'os sous-jacent minéralisé et vascularisé. Contrairement au cartilage non calcifié, le cartilage calcifié est vascularisé et innervé ; les vaisseaux sanguins et les nerfs proviennent de l'os sous-chondral.<sup>328</sup> Le cartilage calcifié est séparé de la couche profonde du cartilage non calcifié par une ligne de démarcation basophile, appelée tidemark, qui délimite le front de minéralisation de la matrice cartilagineuse.<sup>329,330</sup> L'ECM du cartilage calcifié contient principalement du collagène hexagonal de type X et une grande quantité d'hydroxyapatite (HAP), qui représente 65 % de son poids.<sup>331,332</sup> Les analyses menées par diffraction à rayon X (XRD) par Zhang *et al.* sur les cartilage calcifiés humains, ont révélé que l'HAP est très faiblement cristallisé. On y trouve également une faible proportion de collagène de type II (20%).<sup>331</sup> En outre, le cartilage calcifié est caractérisé par la présence d'une petite proportion de gros chondrocytes ronds, présentant un phénotype hypertrophique (Hyp).<sup>275</sup>

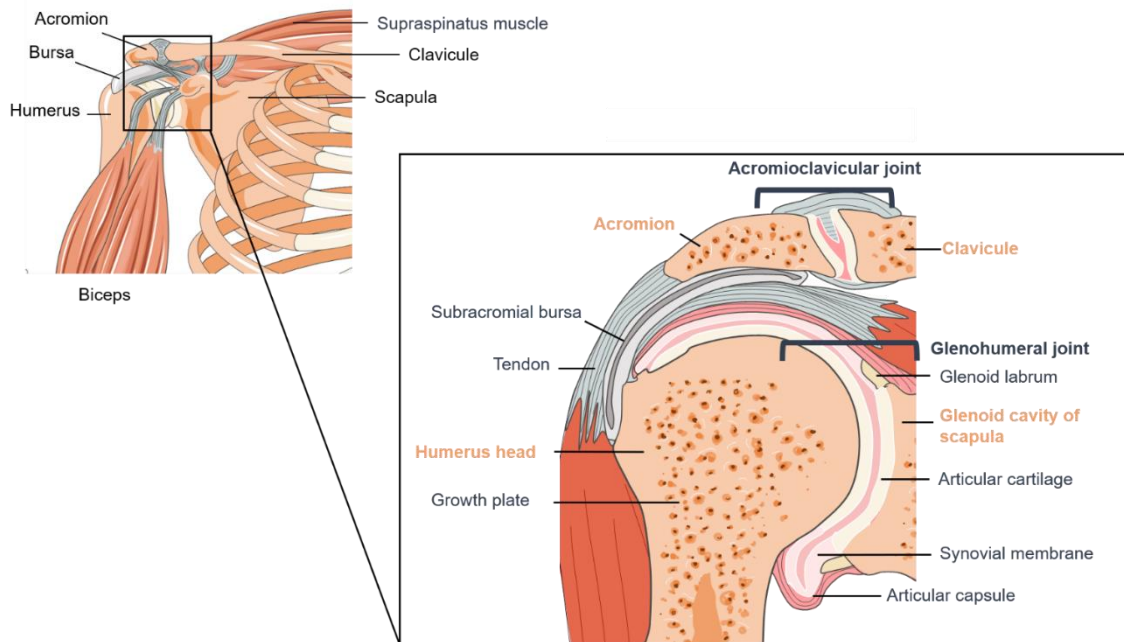
### **1.3. La luxation et l'arthrose : deux affections ostéoarticulaires très répandues impliquant un remodelage pathologique de l'ECM.**

Tous les tissus conjonctifs de l'articulation synoviale subissent un renouvellement constant de leur ECM, préservant ainsi l'intégrité et les propriétés des tissus. Des perturbations dans le remodelage de l'ECM, en termes de composition ou de structure supramoléculaire, peuvent entraîner des troubles des tissus conjonctifs. Nous nous concentrons ici sur la luxation des articulations et l'arthrose.

#### *1.3.1. La luxation d'épaule*

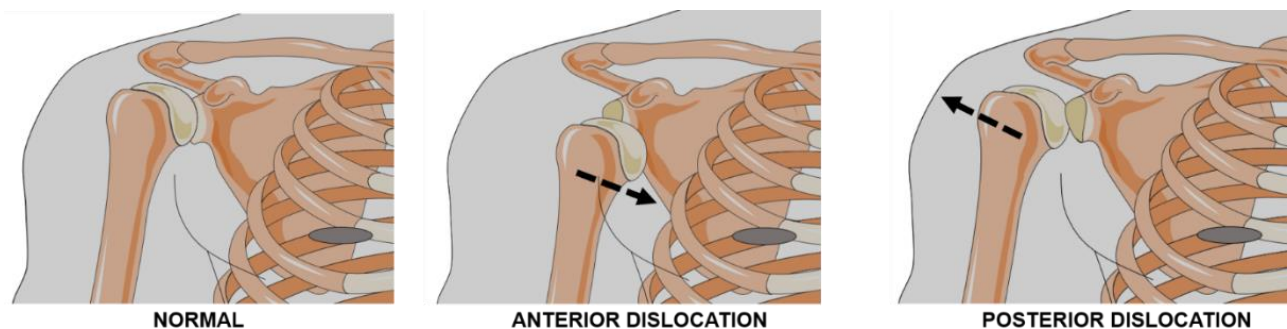
La luxation désigne le déplacement anormal d'un des os formant une articulation, autrement dit l'os sort de sa position habituelle et glisse hors de l'articulation. L'os peut également rester partiellement en contact ; cette dislocation partielle est appelée subluxation. La luxation d'une articulation se caractérise par une douleur intense et peut entraîner un gonflement, une contusion, une déformation de l'articulation et une immobilité. Les épaules sont les articulations les plus mobiles du corps, ce qui en fait les articulations les plus fréquemment luxées avec ~50 % de toutes les luxations articulaires majeures.<sup>333,334</sup>

L'épaule est une articulation synoviale composée de trois os, à savoir l'humérus, l'omoplate et la clavicule (**Figure 13**). Même si l'épaule est anatomiquement constituée de quatre articulations, à savoir l'articulation glénohumérale, l'articulation acromio-claviculaire, l'articulation scapulothoracique et l'articulation sternoclaviculaire, l'articulation de l'épaule fait communément référence à l'articulation glénohumérale. L'articulation glénohumérale est une articulation à rotule, c'est-à-dire que la tête de l'humérus (rotule) est contenue dans la cavité glénoïde de l'omoplate.



**Figure 13.** Illustration of the shoulder joint anatomy. The glenohumeral joint is structurally a ball-and-socket joint which involves the humeral head with the glenoid cavity of the scapula. This joint, which is the most mobile joint of the human body, is stabilized by joint capsule, tendon muscle and labrum (meniscus of the shoulder).

Les luxations de l'épaule peuvent donc se produire dans de nombreuses directions (**Figure 14**).<sup>334</sup> La luxation vers l'avant, connue sous le nom de luxation antérieure, est la plus fréquente et représente plus de 95% de toutes les luxations de l'épaule.<sup>334</sup> Ce type de luxation, dans lequel la tête de l'humérus est forcée hors de la glène vers l'avant, se produit lorsque le bras est étendu avec une violente rotation externe en abduction.



**Figure 14.** Representation of the different types of shoulder dislocation

Même si le traumatisme est la cause la plus fréquente des luxations, celles-ci peuvent également être favorisées par l'affaiblissement des ligaments, tendons, muscles et capsule articulaire qui maintiennent l'articulation en place.<sup>335</sup> Cet affaiblissement peut avoir pour origine :

- **L'hérédité**, par exemple, certaines personnes naissent avec des ligaments plus lâches et plus sujets aux blessures que ceux d'autres personnes.<sup>336</sup>
- **La maladie**, par exemple (1) le syndrome d'Ehlers-Danlos, une maladie héréditaire rare du tissu conjonctif qui rend les articulations anormalement souples en raison de défauts génétiques dans la biosynthèse des composants de la ECM, par exemple des mutations dans les gènes codant pour les collagènes de type I, III et VI. (2) Le syndrome de Marfan, qui affaiblit la capsule et les ligaments autour de l'articulation. Ce syndrome est causé principalement par des mutations dans le gène codant la fibrilline1 (FBN1).<sup>337,338</sup> Ce gène produit la protéine fibrilline, qui joue un rôle important dans l'incorporation de l'élastine dans les fibres élastiques.<sup>339</sup> Il convient de noter que d'autres mutations peuvent gènes peuvent être impliqués telles que des mutations du gène codant le récepteur 2 du TGF- $\beta$  (TGFB2). Les TGF- $\beta$  sont des facteurs de croissance qui régulent un large éventail de processus cellulaires, notamment la prolifération, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la formation de la matrice extracellulaire. La mutation du récepteur de TGF- $\beta$  provoque donc une défaillance des voie de signalisation et entraîne le développement de ce syndrome.<sup>340,341</sup>
- **Les activités physiques**, par exemple les activités sportives ou professionnelles, qui provoquent une usure répétée et/ou une surutilisation des articulations.
- **L'âge**, par exemple le ramollissement des ligaments et des capsules articulaires lié à l'âge, entraîne un nombre accru de blessures causées par des traumatismes à faible énergie ou par l'utilisation des articulations.<sup>342</sup>

La stabilité de l'articulation glénohumérale est avant tout assurée par la capsule articulaire qui s'étend de l'omoplate à l'humérus. Cette stabilité est renforcée par la présence de tendons, ligaments et muscles. Pour rappel, l'ECM de la capsule articulaire externe est principalement composée de fibrilles de collagène de type I à orientation multiaxiale qui lui confère sa rigidité et sa résistance à la traction. Par conséquent, l'altération de la structure et de la composition de l'ECM au niveau supramoléculaire, c'est-à-dire l'altération de la structure fibrillaire du collagène de type I, peut entraîner un ramollissement de la capsule articulaire et donc une instabilité de l'articulation.<sup>343</sup> Le maintien de la structure des fibrilles est assuré par

les réticulations décrites dans les sections précédentes et remodelage de l'ECM). Ces réticulations déterminent les propriétés élastiques des fibrilles de collagène. Les travaux scientifiques étudiant ce lien ont pour objet d'étude du tendon.<sup>344</sup> Des modifications de type Ehlers-Danlos sont observées chez les souris déficientes en décorine et en biglycane,<sup>345</sup> ainsi que chez les souris déficientes en lumican et en fibromoduline.<sup>346</sup> En effet comparées aux souris « contrôle », les souris déficientes en lumican et fibromoduline présentent un dérèglement de la formation et de la maturation des fibrilles de collagène de type I qui résultent en une diminution de la rigidité des tendon de 61%,  $p < 0.001$ .<sup>178</sup> L'expression altérée des SLRP a également été observée dans le syndrome de Marfan.<sup>347</sup>

Les instabilités de l'articulation glénohumérale sont les troubles les plus fréquents chez les jeunes sportifs. Les luxations de l'articulation de l'épaule sont presque systématiquement associées à des troubles de la capsule articulaire. Rodeo *et al.*<sup>348</sup> ont rapporté que la luxation modifie la structure supramoléculaire de l'ECM de la capsule articulaire. Des différences significatives dans les caractéristiques des fibrilles de collagène (réticulation, diamètre, densité des fibrilles, composition en acides aminés) entre les capsules d'épaule saines et luxées ont été montrées. Il convient de noter que les procédures chirurgicales ne peuvent pas traiter efficacement l'instabilité articulaire. Des traitements alternatifs modifiant l'ensemble de l'ECM de la capsule articulaire ont donc été développés :

- **la capsulorrhaphie** thermique dont l'efficacité ne peut être confirmée,<sup>349,350</sup>
- **la rétraction thermique** qui induit des complications rares mais néfastes et dont le manque d'études cliniques pertinentes l'a rendu moins populaire.<sup>351</sup>

Une description détaillée de ces traitements est fournie dans les références citées.

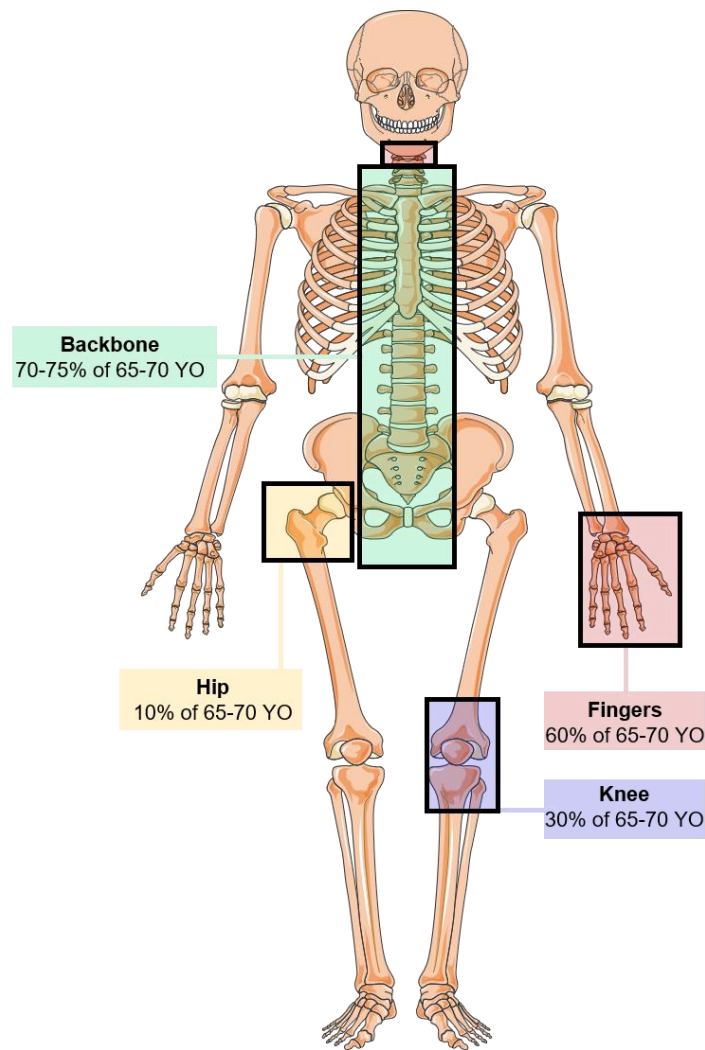
A ce jour, il existe donc un réel besoin non satisfait pour traiter efficacement l'instabilité de l'épaule.

### 1.3.2. L'arthrose

L'arthrose est la maladie musculosquelettique la plus fréquente, touchant environ 528 millions de personnes dans le monde et constituant le 15<sup>ème</sup> handicap mondial.<sup>352-354</sup> Si l'arthrose est liée au vieillissement, elle est également associée à divers facteurs de risque comme l'obésité,<sup>355</sup> la sédentarité, une prédisposition génétique<sup>356</sup> telle que la mutation du gène codant pour le collagène de type II et de type IX,<sup>357</sup> la densité osseuse, les mauvaises géométries articulaires comme les genu valgum et varum,<sup>358-360</sup> les traumatismes articulaires<sup>361-363</sup> et le genre.<sup>364-366</sup> Il convient de noter que l'arthrose augmente d'environ 1,55 la mortalité des personnes souffrant d'une perte de mobilité.<sup>352</sup> A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif de l'arthrose. En effet, la prise en charge de la maladie se concentre uniquement sur le soulagement de la douleur avec des injections intra-articulaires d'acide hyaluronique, de corticostéroïdes et la prescription d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).<sup>367</sup> Au stade terminal de la maladie, le seul traitement est de procéder à une chirurgie de remplacement de l'articulation et uniquement pour les articulations les plus grandes comme le genou ou la hanche. L'arthrose est déjà l'un des problèmes de santé les plus coûteux et sa prévalence augmente en raison du vieillissement de la population et de l'épidémie d'obésité.<sup>352</sup> Par conséquent, il existe une recherche active pour le développement (1) de biomarqueurs de l'arthrose, permettant un diagnostic précoce et (2) un traitement curatif de l'arthrose et de ses symptômes associés. Pour relever ce défi, une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'arthrose est donc essentielle.

L'arthrose concerne toutes les articulations du corps (**Figure 15**) et affecte l'ensemble des tissus articulaires.<sup>368</sup> Il convient de noter que la prévalence de la maladie varie en fonction de sa localisation et que plusieurs localisation peuvent être atteinte en même temps. L'arthrose vertébrale, digitale, du genou (gonarthrose) et de la hanche (coxarthrose) représentent respectivement *ca.* 70-75%, 60%, 30% et 10% des personnes âgées entre 65 et 75 ans. Contrairement à l'arthrose vertébrale qui reste souvent silencieuse, la gonarthrose et la coxarthrose représentent les formes les plus invalidantes.<sup>367</sup>

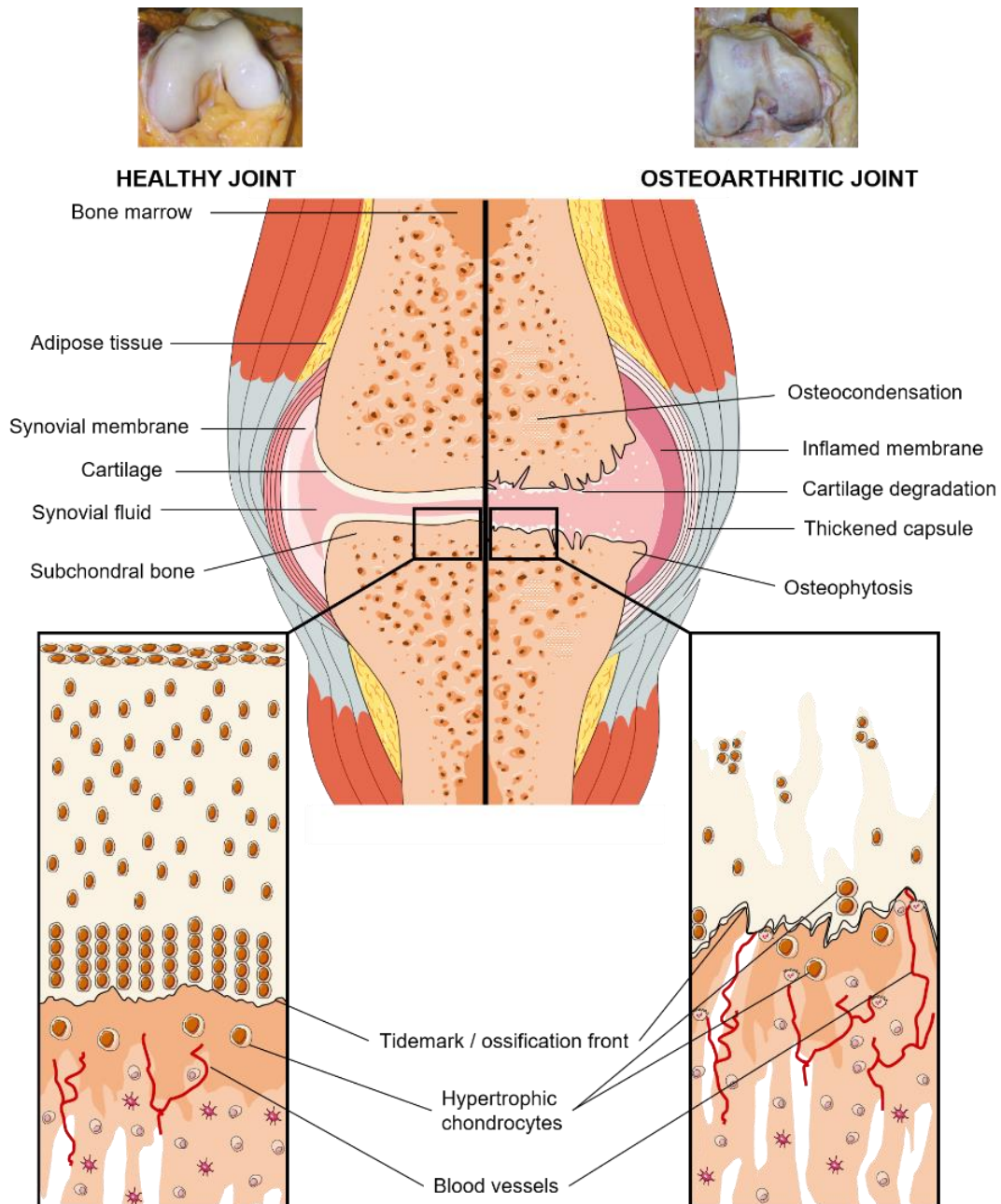




**Figure 15.** Frequency of osteoarthritis according to joint location

Au cours de l'arthrose, le cartilage articulaire s'érode progressivement jusqu'à exposer l'os sous-chondral. L'amincissement et la disparition du cartilage articulaire sont dus à la fois à l'érosion de surface et à l'avancement du front d'ossification à la profondeur du cartilage.<sup>369</sup> Outre cette dégradation irréversible du cartilage articulaire, il existe un remodelage pathologique de l'os sous-chondral qui inclut une sclérose et la formation d'ostéophytes en marge de l'articulation et une inflammation modérée de la membrane synoviale (**Figure 16**).

Nous nous concentrerons ici sur le remodelage pathologique du cartilage.



**Figure 16.** Illustration of joint tissue changes associated with osteoarthritis: (A) Macroscopic appearance of the articular cartilage of the knee femoral condyles at an early (left) and advanced (right) OA stage (B) Joint tissue modifications (C) Osteochondral junction remodeling. D'après Aigner *et al.* 2006 and Mahjoub *et al.* 2012

Le chondrocyte, le seul type de cellules du cartilage, est responsable du développement, de l'entretien et de la réparation de l'ECM. Cependant, l'activité métabolique et la survie des chondrocytes dépendent fortement des conditions chimiques et mécaniques environnantes. On assiste au cours de l'arthrose à un déséquilibre métabolique. Dans les premiers stades de la maladie, les chondrocytes prolifèrent et forment des clusters afin de s'adapter au microenvironnement changeant.<sup>257,370</sup> Cette première phase est également caractérisée par une

augmentation de la production de composants de l'ECM en réponse aux lésions du cartilage. Cependant, la tentative de réparation du cartilage endommagé conduit à la formation d'une matrice de moins bonne qualité, composée de composants matriciels différents de ceux produits par les chondrocytes en condition physiologique. En effet, l'analyse des agrécanes provenant du cartilage arthrosique montre un modèle de sulfatation du CS similaire à ceux observés dans le cartilage non mature,<sup>371</sup> ce qui suggère la présence de chondrocytes immatures qui expriment la forme fœtale du collagène de type II et des agrécanes.<sup>372,373</sup> Ces chondrocytes aux phénotypes altérés proviendraient de la prolifération et de la différenciation des cellules progénitrices initialement présentes dans le cartilage articulaire.<sup>374</sup> La tentative de réparation n'est donc pas efficace et le déséquilibre métabolique va progressivement tourner en faveur d'événements cataboliques.<sup>375</sup> La production d'enzymes dégradant la matrice, telles que les protéases MMP et ADAMTS, entraîne la dégradation des principaux composants de l'ECM. Les fibrilles de collagène de type II et les agrégats d'agrécane semblent, en effet, être principalement dégradés au cours de l'arthrose par, respectivement, les MMP-13 et les ADAMTS4 et ADAMTS5. L'acide hyaluronique est quant à lui sensible aux hyaluronidases, des hydrolases de type endoglycosidase qui clivent l'acide hyaluronique en oligosaccharides plus petits.<sup>376</sup> Par ailleurs, les fibrilles de collagène de type II et les agrécanes subissent tous deux des modifications par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui peuvent entraîner une fragmentation des chaînes protéiques. Les débris de cartilage résultant de la protéolyse des composants de l'ECM sont ensuite libérés dans le liquide synovial de la cavité articulaire. A titre d'exemple, le clivage des protéines centrales des agrécanes génèrent 2 fragments : l'un qui réside dans l'ECM en restant attaché à la chaîne d'acide hyaluronique et l'autre qui diffuse dans l'ECM.<sup>262</sup> De plus l'endommagement du réseau fibrillaire de collagène de type II accélère ce relargage.<sup>377</sup> La présence de tels débris dans le liquide synovial peut activer les synoviocytes et les macrophages de la synovie qui, à leur tour, vont produire des facteurs pro inflammatoires et pro cataboliques.<sup>378,379</sup> Ces facteurs sont connus pour amplifier le processus de dégradation du cartilage. La production de protéases, telles que MMP-13 et ADAMTS4, est également associée à une maturation inappropriée des chondrocytes, de type hypertrophique. Le cartilage arthrosique est en effet caractérisé par de profondes modifications phénotypiques des chondrocytes, qui incluent une dédifférenciation en fibroblastes caractérisée par l'expression de collagène de type I, III et V et une différenciation hypertrophique.<sup>372,373,380-382</sup> L'expression de plusieurs marqueurs caractérisant les chondrocytes hypertrophiques est observée dans le cartilage de l'arthrose, notamment l'ALP, l'ostéocalcine, Runx2 et le collagène de type X.<sup>383-387</sup> En condition physiologique, les chondrocytes hypertrophiques sont situés dans le cartilage

calcifié. Leur présence dans le cartilage non calcifié arthrosique est associée à la minéralisation de la matrice.<sup>383,388,389</sup> De plus, une avancée du front de calcification, révélée par la duplication de la tidemark, qui délimite le cartilage non calcifié du cartilage calcifié, est une caractéristique du cartilage arthrosique dans sa partie profonde.<sup>390,391</sup> Elle correspond en effet au remplacement progressif du cartilage non calcifié et calcifié par de l'os selon un mécanisme biologique similaire au processus d'ossification endochondrale. La vascularisation accrue de l'interface os/cartilage et la sclérose de la plaque osseuse sous-chondrale plaident également pour la réactivation pathologique de ce processus de développement de l'os long dans l'arthrose.<sup>392-396</sup>

Il convient de noter que l'ECM confère au cartilage articulaire les propriétés biomécaniques requises pour le mouvement de l'articulation. Ainsi, toute altération de la composition et de la structure de l'ECM affecte les propriétés mécaniques du cartilage articulaire, rendant ce dernier moins résistant aux contraintes mécaniques. Au cours de l'arthrose, on assiste à un épaissement et une rigidification des fibrilles de collagène.<sup>397-400</sup> Wen *et al.* ont montré que le module élastique des fibrilles de collagène de type II de la zone superficielle augmente de  $2.65 \pm 0.31$  GPa à  $3.11 \pm 0.91$  GPa et de  $3.70 \pm 0.44$  GPa à  $5.64 \pm 1.10$  GPa dans la zone profonde.<sup>399</sup> La PCM est également sujette à des changements structuraux et biochimiques au cours de l'arthrose.<sup>401</sup> Il convient de noter que dans un 1<sup>er</sup> temps, la PCM s'élargit en raison de l'augmentation de la biosynthèse des composants de l'ECM, notamment du collagène de type VI. Cependant la structure de ce dernier est altérée ce qui contribue à un gonflement anormal.<sup>402-405</sup> Ces changements structuraux sont associés à un changement des propriétés biomécaniques de la PCM. L'étude d'Alexopoulos *et al.* a révélé que les PCM isolées de cartilage humain arthrosique présentent des modules de Young inférieurs de 30 à 40 % à celles des PCM isolées à partir de tissus sains.<sup>166,319</sup> La rigidification de la PCM a également été observée *in situ* par Wilutz *et al.* sur des cartilage humain sain et arthrosique.<sup>401</sup> Ces altérations de la PCM modifient la réponse des chondrocytes aux médiateurs solubles et aux protéines de l'ECM.<sup>320,406,407</sup> Ces modifications chimiques, structurelles ou mécaniques du microenvironnement des chondrocytes peuvent conduire à leur nécrose/apoptose.<sup>408-411</sup>

Il existe donc un lien réciproque entre les chondrocytes, l'ECM du cartilage et les propriétés biomécaniques, ce qui entraîne un cercle vicieux de dégradation du cartilage au cours de l'arthrose. À ce jour, le lien de causalité entre ces différents protagonistes n'est toujours pas élucidé.

#### **1.4. Caractérisations physico-chimiques et mécaniques de l'ECM en tant que structure biologique**

Comme cela a été décrit précédemment, l'ECM des tissus conjonctifs est très complexe, que ce soit en termes de composition ou de structure. L'organisation et l'interaction des assemblages supramoléculaires de l'ECM confère au tissu ses multiples fonctions. L'ECM est sujette à un constant remodelage. Bien que les changements dans la composition et la structure de l'ECM soient considéré comme décisifs, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce remodelage ne sont pas encore complètement élucidés. Un changement mineur dans l'organisation supramoléculaire du tissu peut engendrer des modifications majeures de sa fonction entraînant ainsi des dysfonctionnements et le développement de pathologies, *e.g.* la luxation et l'arthrose. La caractérisation des tissus à l'échelle supramoléculaire apparait donc cruciale pour déchiffrer les événements de remodelage que subit l'ECM, et leur impact en termes de composition, d'organisation supramoléculaire et de réponse mécanique.

Des nombreux travaux ont permis la caractérisation des tissus musculosquelettiques à travers un éventail de techniques biochimiques, physicochimiques et mécaniques.

Les procédures traditionnellement utilisées pour l'analyse de la composition de l'ECM, sont basées sur des méthodes biochimiques telles que les analyses protéomiques. Ces dernières permettent l'identification et la quantification des protéines présentes dans l'ECM.

La teneur en hydroxyproline est fortement corrélée à la teneur en collagène. Le dosage de l'hydroxyproline est donc fréquemment utilisé pour quantifier le collagène dans les échantillons biologiques. Cependant, cette méthode ne permet pas de distinguer les différents types de collagène et les autres protéines contenant de l'hydroxyproline, telles que l'élastine.<sup>412</sup> En effet, bien que la teneur en hydroxyproline varie entre les différents types de collagène, le dosage de l'hydroxyproline ne permet pas de les distinguer les uns des autres. Ces derniers peuvent être identifiés et quantifiés grâce à leurs interactions spécifiques avec des anticorps dans des techniques comme le western blot (WB), l'immunohistochimie, le RIA (radioimmunoassay) ou l'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Cependant, ces analyses semblent être limitées par la spécificité des anticorps, leur disponibilité.

D'autres techniques biochimiques semi quantitatives telles que la chromatographie et la spectrométrie de masse sont également utilisées pour l'analyse de la composition des tissus biologiques.<sup>413-421</sup> Les techniques de spectrométrie de masse permettent notamment l'identification et la quantification des différents types de collagène et des différentes réticulations.<sup>422-424</sup> Ces dernières sont également identifiables et quantifiables par chromatographie, notamment par chromatographie en phase liquide haute performance avec détecteur de fluorescence (HPLC-FLD).<sup>425,426</sup> Bien que toutes ces techniques permettent la séparation et l'identification de protéines spécifiques, elles nécessitent toutes la digestion des tissus. Cette dernière peut être source de dommages et/ou de perte de matériel biologique limitant l'accès à des informations pertinentes sur la composition de l'ECM et sa structure. Une alternative pour éviter la digestion des tissus et d'utiliser des techniques de caractérisation physicochimique. Ces analyses *in situ* nous renseignent sur l'organisation supramoléculaire des tissus et donnent accès à des informations complémentaires à celles obtenues par analyses biochimiques. Il convient de noter que la liste des techniques de caractérisation physicochimique citées dans cette section n'est pas exhaustive. L'objectif, ici, est de fournir une idée globale des différentes techniques de caractérisation appliquées aux tissus biologiques.

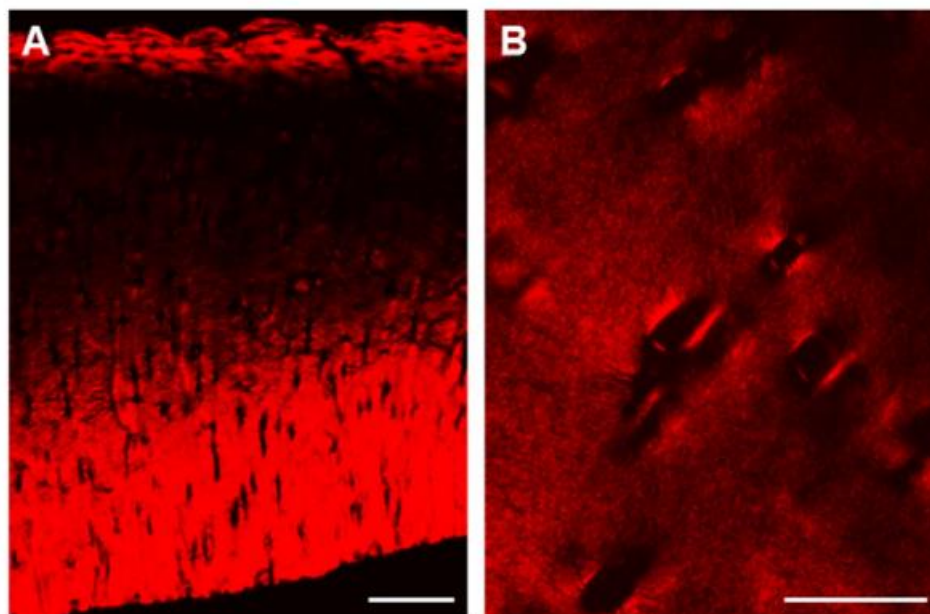
#### 1.4.1. La microscopie avec marquage

Il existe de nombreuses techniques d'imagerie qui, en association aux techniques histochimiques, permettent (1) de visualiser la morphologie globale des tissus et (2) d'identifier des composants de l'ECM. A titre d'exemple, une coloration à la Safranin O permet de mettre en évidence la présence de GAG, le vert lumière permet une coloration du collagène, l'huile rouge O et le rouge alizarine colorent, respectivement, les lipides neutres et le précipité de calcium tissulaire. Ces colorations histologiques permettent de renseigner sur la distribution des composés au sein de l'ECM dans un état physiologique et pathologique : l'intensité de la coloration étant corrélée à la teneur du composé coloré. La coloration à la Safranin O/Fast Green des sections histologiques de cartilage articulaire sain et arthrosique a permis de mettre en évidence les différentes modifications pathologiques de l'organisation du cartilage (**Figure 17**). Mankin *et al.* ont établi une grille d'évaluation permettant de déterminer un score semi quantitatif de ces modifications. Ce score, appelé score de Mankin, varie de 0 (sain) à 14 (arthrose sévère) et permet d'estimer la sévérité des atteintes du cartilage humain.<sup>427</sup> En plus de l'architecture globale du tissu, une coloration permet également de renseigner sur l'organisation du collagène. L'orientation des fibrilles peut, en effet, être mise en évidence par une coloration

au rouge Sirius, également appelée picosirius, qui augmente la biréfringence des fibrilles de collagène visualisées sous microscope à lumière polarisée (**Figure 18**).<sup>428–431</sup> Il convient de noter que le rouge picosirius colore également d'autres composants de la matrice, tels que la tenascine et l'amyloïde.<sup>432,433</sup> De plus, les colorations histologiques des tissus permettent uniquement de mettre en évidence les différentes familles de composants (protéines, glucides, lipides, ADN...) et non de différencier deux composés d'une même famille.



**Figure 17.** Safranin O/Fast Green staining of human osteochondral junction: GAGs are stained in red and proteins in green. CC: Calcified cartilage. *Personal collection*



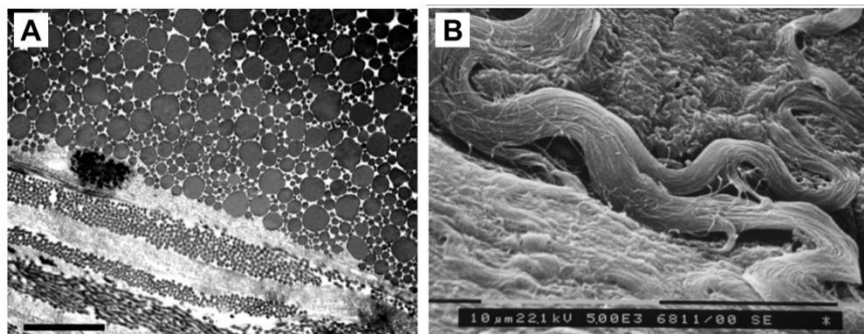
**Figure 18.** Polarized light images of picosirius red stained porcine articular cartilage sections. (A) Distinct ECM collagen alignment was observed through the tissue depth. Scale bar = 200  $\mu$ m (B) Collagen alignment in the PCM was highly variable site-to-site and complicated by edge effects associated with circular cell-sized voids. Scale bar = 50  $\mu$ m. McLeod *et al.* 2013



L'immunohistochimie (IHC) et l'immunofluorescence (IF) permettent un marquage ciblé des différents types de collagène par la liaison d'anticorps.<sup>434-439</sup> Cependant, l'immunomarquage présente trois limitations majeures : (1) la spécificité et la disponibilité des anticorps utilisés (2) la quantification de l'intensité du signal qui peut ne pas être fiable. Il est à noter que la concentration locale de la molécule d'intérêt doit être suffisante afin que le signal ne soit pas trop diffus et soit donc exploitable. (3) Ces analyses renseignent sur la présence d'un composant d'intérêt mais ne fournissent aucune information fiable sur son organisation supramoléculaire.

#### 1.4.2. La microscopie électronique

La microscopie électronique est largement utilisée pour étudier la structure de l'ECM à l'échelle cellulaire et supramoléculaire. Cette technique permet d'obtenir des images à haute résolution de la structure des tissus en utilisant des électrons comme source de rayonnement. En raison de leurs très courtes longueurs d'onde, la résolution optimale atteignable pour les images de microscopie électronique est meilleure de plusieurs ordres de grandeur que celle générée par un microscope optique. Il existe deux principaux types de microscopie électronique : la microscopie électronique à balayage (SEM) et la microscopie électronique à transmission (TEM) qui génèrent tous deux des images contrastées. Il convient de noter que les échantillons doivent passer par de nombreuses étapes de préparation avant de pouvoir être visualisé par SEM ou TEM. En effet, contrairement au microscope optique, l'imagerie électronique nécessite une condition de vide pour effectuer l'analyse de la structure.

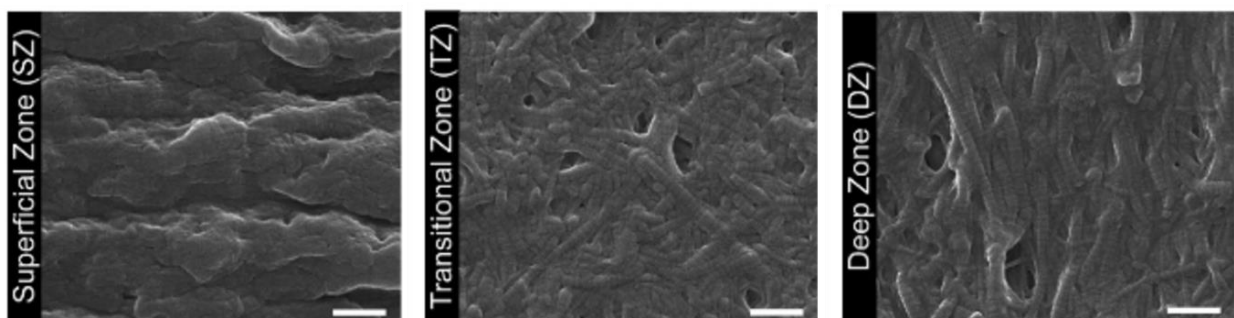


**Figure 19.** (A) TEM section of rat Achilles tendon. Transversally sectioned tendon including plurimodal collagen fibrils (top) and unimodal fibrils of paratenon (bottom). Scale bar = 1 $\mu$ m (B) SEM images of rat Achilles tendon sheath. Scale bar = 10 $\mu$ m. Franchi *et al.* 2006

Le contraste de l'image formée au SEM résulte de la détection d'électrons secondaires provenant de la surface de l'échantillon. Ces derniers sont produits par l'interaction des électrons

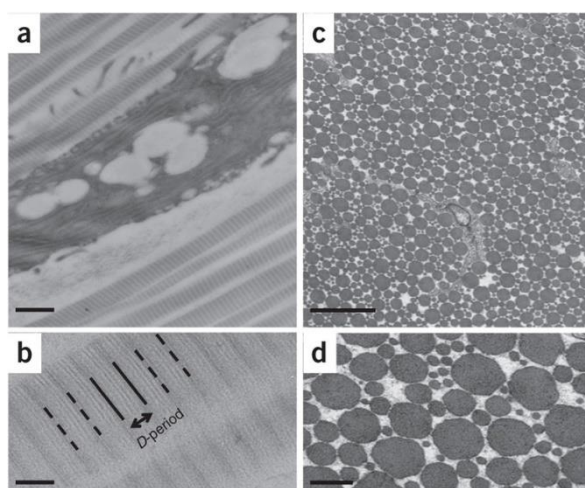


incidents avec les atomes présents à la surface de l'échantillon. La détection des électrons émis à un angle rasant spécifique permet de reconstituer une image très contrastée de la topographie du tissu qui donne une impression visuelle en trois dimensions.<sup>44,440,441</sup> La SEM a notamment été utilisée par Changoor *et al.* pour mesurer le diamètre des fibrilles de collagène dans le cartilage articulaire humain normal et dégradé (**Figure 20**).<sup>283</sup> Il convient de noter que l'imagerie par SEM nécessite un revêtement métallique de la surface, généralement en or, afin de rendre l'échantillon biologique conducteur. Cette fine couche conductrice inhibe l'effet de charge, réduit les dommages thermiques et améliore le signal des électrons secondaires nécessaire à la génération de l'image.



**Figure 20.** SEM images of normal cartilage from the superficial, transitional and deep zones. Scale bar = 500 $\mu$ m. Changoor *et al.* 2011

Le contraste de l'image formée en TEM est dû aux collisions inélastiques rencontrées par les électrons incidents lorsqu'ils traversent l'échantillon pour générer une image de projection. Il est à noter que l'imagerie TEM nécessite de nombreuses étapes de préparation de l'échantillon. En effet, les sections des tissus analysés doivent être suffisamment fines pour transmettre suffisamment d'électrons pour former une image avec une perte d'énergie minimale, *i.e.* moins de *c.a.* 150 nm. Par ailleurs, les tissus biologiques sont principalement composés d'éléments de densités électroniques similaires. Il est donc nécessaire de traiter les tissus avant



**Figure 21.** TEM of postnatal tendon. (A) A tendon fibroblast flanked by D-periodic collagen fibrils, Scale bar = 500 nm. (B) Enlarged view of (A) showing fibril D-periods. Scale bar = 100 nm. (C) Tendon sectioned transversely to the long axis of the tissue. Scale bar = 1  $\mu$ m. (D) Enlarged view of (c) showing near-circularity of fibril profiles. Scale bar = 200 nm. Starborg *et al.* 2013

analyse par un agent contrastant, *e.g.* coloration négative à l'acétate d'uranyle, pour renforcer les faibles variations locales de densité et donner un contraste détectable. L'imagerie TEM peut ainsi révéler les détails les plus fins de la structure interne des tissus, tels que la structure et l'organisation des fibrilles de collagène.<sup>343,377,440,442-446</sup> La TEM a notamment été utilisée par Starborg *et al.* pour visualiser l'organisation 3D des fibrilles de collagènes dans différents tissus conjonctifs dont les tendons humains et murins (**Figure 21**). Dans cette étude, la haute résolution des images TEM a permis de visualiser les périodicités du collagène et de mesurer la taille des fibrilles, *i.e.* leur diamètre apparent.<sup>446</sup>

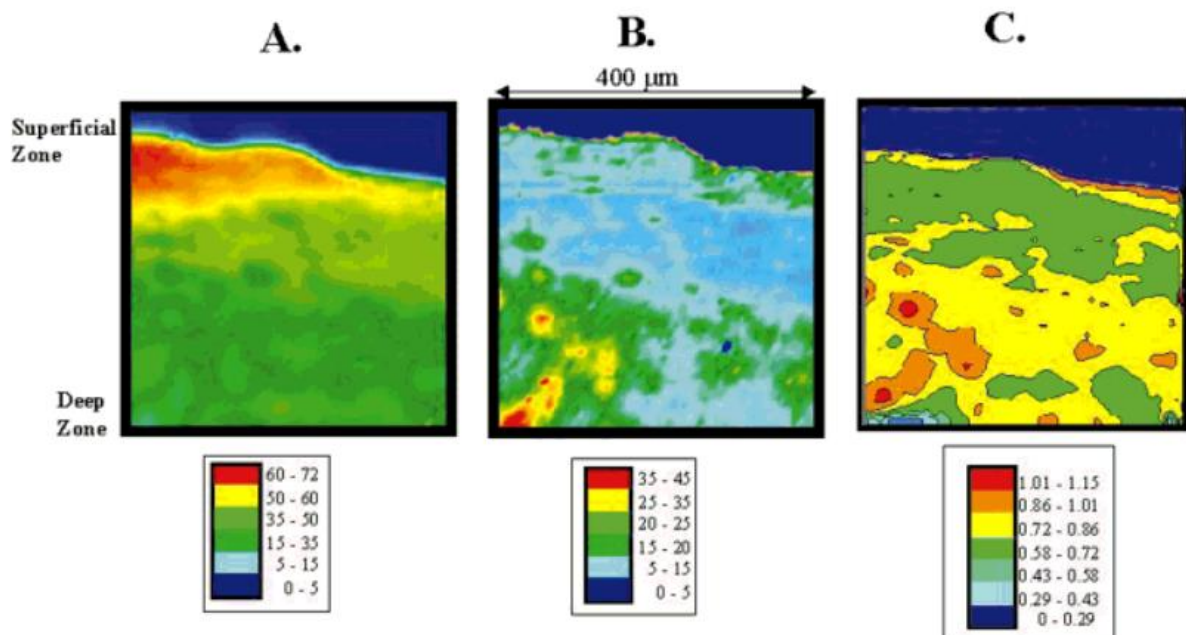
Il convient de noter que la TEM offre une résolution spatiale plus élevée que la SEM (grossissement: 50 *versus* 2 millions de fois), ce qui permet de visualiser la structure fine des composants de l'ECM, *e.g.* la structure des fibrilles de collagène.<sup>447-449</sup> Par ailleurs, le développement de méthodes d'analyse d'image permet la quantification des paramètres morphologiques du collagène visualisé par imagerie TEM.<sup>450,451</sup> Il est intéressant de noter que la microscopie électronique peut être utilisée en association avec un immunomarqueur (nanoparticules d'or revêtues d'anticorps) pour détecter et visualiser l'emplacement de molécules d'intérêt, *e.g.* la fétuine A,<sup>452</sup> et distinguer différents types de collagène, *e.g.* les types XIII, XV et XXVII.<sup>453-455</sup> La SEM et la TEM peuvent également être couplées à la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX), ce qui permet de renseigner sur la composition élémentaire des échantillons analysés, *e.g.* la nature du minéral présents dans les tissus calcifiés.<sup>388,456,457</sup> Il convient de noter que l'EDX permet également un suivi des processus de minéralisation dans les tissus *via* le ratio Ca/P.<sup>456-459</sup>

### 1.4.3. La microscopie sans marquage

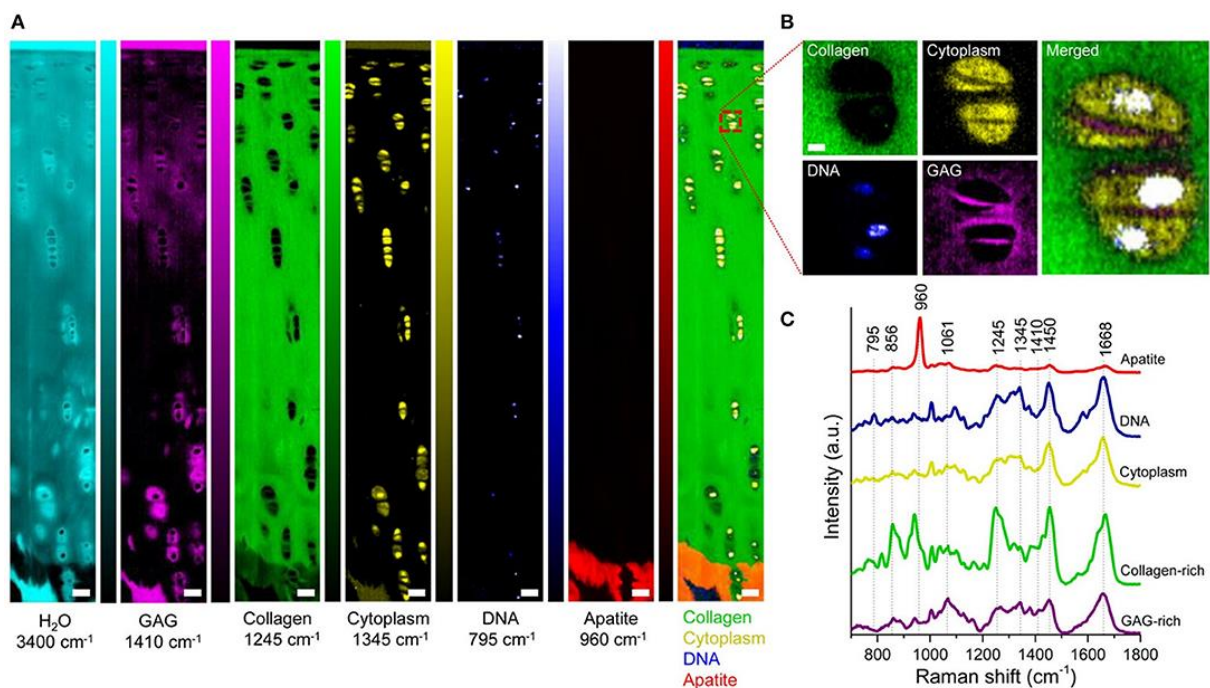
D'autres techniques d'imagerie ne nécessitant pas de marquage telles que la microscopie par génération de second harmonique,<sup>460-467</sup> la microscopie de polarisation à base de cristaux liquides,<sup>468</sup> et la microscopie en lumière polarisée à transmission,<sup>469</sup> sont également utilisées pour examiner l'architecture et l'organisation du collagène, *e.g.* l'orientation des fibrilles de collagène. Des méthodes d'analyse d'image incluant les transformations de fourrier, des filtres gaussiens et de fréquences sont, par ailleurs, appliquées pour mettre en évidence cette orientation et extraire des informations quantitatives à partir des images obtenues.<sup>470-472</sup> En revanche, ces techniques présentent souvent des limites en termes de résolution spatiale ou de spécificité biochimique.

#### 1.4.4. La spectroscopie vibrationnelle

Les techniques spectroscopiques vibrationnelle, telles que la spectroscopie infrarouge (IR) et la spectroscopie Raman sont également utilisées pour caractériser la structure du collagène fibrillaire, et discriminer les différents types de collagène.<sup>473-478</sup> Par exemple, Belbachir *et al.* ont démontré que les spectres IR des collagènes de type I, III, IV et V présentent des bandes d'absorption discriminantes.<sup>475</sup> La spectroscopie IR et Raman permettent également de caractériser l'ECM des tissus musculosquelettiques tels que le cartilage et l'os.<sup>473,479-487</sup> La spectroscopie IR a, par exemple, été utilisée par Spalazzi *et al.* pour étudier la distribution des protéoglycans, des minéraux, et du collagène ainsi que l'orientation de ce dernier, à l'interface entre un tissu mou (les ligaments) et un tissu dur (l'os).<sup>488</sup> Camacho *et al.* ont, quant à eux, identifié les absorbances spectrales qui proviennent du collagène et des PG et visualisé la distribution de ces derniers en fonction de la profondeur dans le cartilage articulaire bovin (**Figure 22**).<sup>484</sup> Cependant l'imagerie en IR est de faible résolution. Contrairement à la spectroscopie IR, le Raman permet la génération d'image à haute résolution de tissus hydratés tels que le cartilage articulaire. Bergholt *et al.* ont, en effet, développé une approche d'imagerie par spectroscopie Raman qui a permis l'étude de la distribution et de l'orientation des principaux composants de l'ECM du cartilage articulaire, *i.e.* l'eau, le collagène et les GAG (**Figure 23**).<sup>473</sup>



**Figure 22.** FTIR images of collagen and proteoglycan in bovine articular cartilage. (A) The collagen image was created based on the area of the amide I absorbance, and the images of the proteoglycan/collagen ratio were created based on the area of the 960–1185  $\text{cm}^{-1}$  absorbance ratioed to the area of the (B) 1338  $\text{cm}^{-1}$  and (C) amide I absorbances. The scale shows the range of the integrated area for each color. Camacho *et al.* 2000



**Figure 23.** Raman spectroscopic imaging of articular cartilage. (A) Univariate Raman spectroscopy images of articular cartilage showing the band intensity associated with H<sub>2</sub>O (3400 cm<sup>-1</sup>), GAG (1410 cm<sup>-1</sup>), collagen (1245 cm<sup>-1</sup>), cytoplasm (1345 cm<sup>-1</sup>), DNA (795 cm<sup>-1</sup>), apatite (960 cm<sup>-1</sup>), and the overlay. Scale bar = 50 μm. (B) High-resolution (~0.3 μm) Raman spectroscopy image of chondrocytes and pericellular matrix obtained by imaging the GAG (1410 cm<sup>-1</sup>), cytoplasm (1345 cm<sup>-1</sup>), and DNA (795 cm<sup>-1</sup>) against collagen (1245 cm<sup>-1</sup>). Scale bar = 3 μm. (C) Representative Raman spectra measured from articular cartilage with marked signatures for specific tissue components. Bergholt *et al.* 2016

Ces techniques de spectroscopies vibrationnelles permettent de fournir des informations pertinentes sur la distribution spatiale des éléments de l'ECM. En revanche, ces techniques présentent une limitation commune : elles ne peuvent sonder les changements que de manière semi-quantitative. A titre d'exemple, la spectroscopie Raman n'est pas en mesure de fournir des informations biochimiques spécifiques et quantifiables tandis que la quantification des aires des bandes IR permet d'avoir une indication sur la proportion relative d'une molécule par rapport à une autre mais pas sur sa concentration dans le tissu d'intérêt.

#### 1.4.5. La spectroscopie de photoélectrons à rayons X

La spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) offre une analyse chimique quantitative directe des échantillons analysés. Bien que l’XPS soit particulièrement pertinente pour explorer les interfaces d'intérêt biologique,<sup>489,490</sup> y compris les biomatériaux,<sup>491–493</sup> les couches de protéines absorbées et les micro-organismes,<sup>494,495</sup> elle n'a jamais été utilisée, à notre connaissance, pour la caractérisation des tissus biologiques mous.

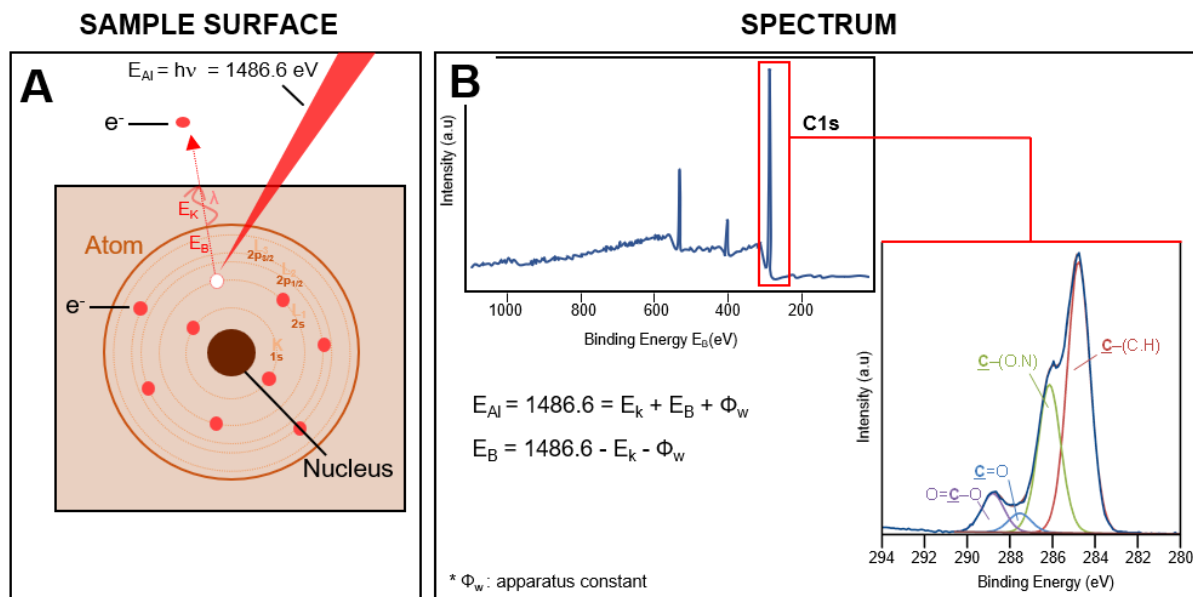
#### Principe général

L’XPS est une technique quantitative qui est couramment utilisée pour fournir la composition élémentaire de la surface d'un matériau. Il est à noter que tous les éléments peuvent être détectés à l'exception de l'hydrogène et de l'hélium. Cette technique d’analyse est basée sur le principe de photoémission. Comme le montre la **Figure 24A**, l’XPS implique des mesures d'énergie cinétique des photoélectrons émis par la surface proche (1-10 nm) sous irradiation. En effet, les atomes de surface irradiés par les rayons X éjectent des électrons de cœur, *i.e.* des électrons des niveaux K et L, avec une certaine énergie cinétique. Ces électrons photoémis subissent des collisions inélastiques avec les atomes de l'échantillon lorsqu'ils se déplacent vers la surface. À chaque collision inélastique, leur énergie cinétique diminue. Seuls ceux provenant de la surface proche, *i.e.* < 10 nm, ne subissent pas de collision inélastique et contribuent donc aux pics (**Figure 24**). Le libre parcours moyen inélastique,  $\lambda$ , dépend de l'énergie cinétique de l'électron photoémis et la densité de la matrice. La contribution à l'intensité diminue exponentiellement avec la profondeur : 63 % du signal provient d'une couche d'épaisseur égale à  $\lambda \cos\theta$ , 86 % d'une couche d'épaisseur  $2\lambda \cos\theta$ , 95 % d'une couche d'épaisseur  $3\lambda \cos\theta$ , avec  $\theta$  l'angle entre le détecteur et la normal à la surface. Le libre parcours moyen inélastique étant généralement compris entre environ 1,5 et 3,3 nm, l’XPS sonde une couche superficielle dont l'épaisseur peut atteindre  $3\lambda \cos\theta$ , *c.a.* environ 5-10 nm. En fonction de la profondeur, certains électrons photoémis qui subissent une collision inélastique atteignent également le détecteur mais avec une énergie cinétique plus faible. Ils contribuent ainsi au fond du spectre. De plus, dans le cas d'un matériau isolant, tel qu'un tissu biologique, la photoémission d'électrons depuis la surface de l'échantillon crée une charge positive sur la surface de l'échantillon. L'attraction de la surface chargée diminue donc l'énergie cinétique de l'électron émis, ce qui entraîne un élargissement des pics. Pour surmonter cet effet de charge, un canon à électrons de faible énergie est utilisé pour neutraliser la surface et maintenir une charge de surface relativement stable durant l'analyse. Les électrons émis sont ensuite collectés par un analyseur

hémisphérique. Le nombre d'électrons éjectés est représenté en fonction de leur énergie cinétique, ce qui donne un spectre d'énergie des photoélectrons (**Figure 24B**). En fait, les électrons de différentes énergies suivent des chemins différents à travers le détecteur, ce qui permet de les différencier en fonction de leur énergie cinétique. Chaque élément présente ainsi des pics caractéristiques dans le spectre XPS qui peuvent être traduits en énergie de liaison. Cette dernière est déterminée selon l'équation de conservation de l'énergie :  $E_B = E_{Al} - (E_K + \Phi_w)$  avec  $E_{Al} = h\nu = 1486,6 \text{ eV}$ ,  $E_K$  l'énergie cinétique mesurée par le détecteur et  $\Phi_w$  la fonction de travail de l'instrument. Cette dernière correspond à l'énergie minimale requise pour amener un électron du niveau zéro d'attraction par l'échantillon à l'entrée de l'analyseur hémisphérique.

La composition élémentaire et l'identification et l'environnement chimique d'un élément peuvent être obtenues à partir de la mesure exacte de la position des pics et de leurs séparations en énergie de liaison,  $E_B$  (**Figure 24B**). L'intensité des pics enregistrés permet de quantifier les éléments de surface et les environnements chimiques. Comme l'énergie de liaison des photoélectrons est influencée par la densité électronique, les déplacements de la position du pic,  $E_B$ , reflètent des changements dans l'environnement chimique de l'élément d'intérêt. La décomposition des pics permet, ainsi, de fournir des informations sur la nature chimique des composés organiques et offre une certaine sélectivité dans l'analyse des tissus biologiques.





**Figure 24.** Schematic illustration of XPS analysis (A) The photoemission of electron from the near surface. XPS probe a surface layer with a thickness up to  $3\lambda \cos\theta$ , *i.e.* about 5-10 nm. (B) XPS spectrum. C 1s peak decomposition and assignment of the components to chemical functions (C) Schematic diagram of the components of an XPS Instrument

### Instrumentation

Pour l'analyse XPS, l'échantillon est monté sur un support adapté permettant de l'introduire successivement d'une chambre d'introduction à la chambre d'analyse ( $10^{-10}$  Pa, **Figure 24C**). Pour certains équipements, il existe une chambre intermédiaire adjacente aux deux chambres citées. La réalisation de l'analyse sous ultra-haut vide (UHV) permet d'éviter la collision des électrons photoémis avec des molécules de gaz qui peuvent réduire leur énergie cinétique. Dans ce travail, la source de rayons X est une anode d'aluminium, Al. L'émission de rayons X  $K\alpha$  utilisés, qui correspond à une énergie de 1486.6 eV, résulte du processus de relaxation de l'atome d'Al sous le bombardement d'électrons. Ce processus de relaxation

implique deux électrons, l'un est retiré du niveau 1s, également appelé coquille K, tandis que l'autre subit une transition du niveau 2p au niveau 1s, également appelée transition  $K\alpha$ . Ces rayons passent ensuite dans un monochromateur qui permet d'isoler et de produire une radiation à 1486.6 eV. Le spot de rayons X qui en résulte irradie une surface d'environ 1 mm de diamètre et pénètre l'échantillon sur une épaisseur d'environ 1  $\mu\text{m}$  sans atténuation appréciable.

Pour permettre la séparation des électrons photoémis et leur comptage individuel par le détecteur, les électrons passent à travers un analyseur hémisphérique, qui consiste en deux hémisphères concentriques entre lesquels une différence de potentiel  $V$  est appliquée. Pour un réglage donné de la différence de potentiel, seuls les électrons ayant une énergie égale à l'énergie de passage atteignent le détecteur, ce qui permet d'améliorer la résolution des spectres obtenus.

### Traitement des données

Chaque élément donnera un spectre unique. Pour les surfaces d'intérêt biologique, les pics suivants sont généralement observés sur les spectres à balayage large : O1s, N1s et C1s. Le spectre de chaque élément présente un épaulement en arrière-plan à faible énergie cinétique, c'est-à-dire à haute énergie de liaison, en raison de la contribution des photoélectrons qui s'échappent de la surface après avoir subi des collisions inélastiques aléatoires. Pour atteindre une sensibilité suffisante et améliorer le rapport signal/bruit, il est souvent nécessaire de balayer de manière répétitive les pics qui doivent être analysés en détail. La position du pic sur l'échelle d'énergie permet d'identifier l'élément présent à la surface de l'échantillon tandis que l'intensité du pic reflète la concentration de cet élément. Cependant, pour obtenir la valeur absolue de l'énergie de liaison des pics XPS de l'échantillon, la valeur de l'énergie de charge doit être déterminée et déduite. Ici, tous les pics sont calibrés selon la composante C1s due au carbone uniquement lié au carbone,  $\underline{\text{C}}$ -(C,H), en considérant une position de pic à une énergie de liaison de *c.a.* 284,8 eV. L'utilisation de cette valeur de référence permet d'effectuer une comparaison quantitative entre les différents échantillons. Un léger décalage de la position des pics d'un même élément reflète les changements des groupes chimiques dans lesquels l'élément considéré est impliqué. En effet, l'énergie de liaison d'un électron dépend également de son environnement chimique. Il apparaît sur la **Figure 24B** que chaque liaison du carbone avec l'oxygène déplace la position C1s vers une énergie élevée. L'énergie de liaison est en effet plus élevée lorsque la densité électronique diminue. Cette dernière résulte à la fois de l'état d'oxydation et de la nature des atomes liés. En conséquence, la décomposition du pic C 1s fournit des informations sur la



nature chimique des composés organiques et offre une certaine sélectivité dans l'analyse, *i.e.* une discrimination entre les contaminants et les composés d'intérêt.

L'analyse XPS fournit des informations quantitatives pertinentes sur la composition élémentaire de la surface. Cependant, il est nécessaire de procéder à une décomposition des pics fiable pour quantifier les différentes contributions de chaque liaison chimique. Dans cet objectif, deux points sont à considérer :

- La taille de l'échantillonnage : il est, en effet, primordial de travailler sur un nombre d'échantillons statistiquement significatif de manière à ce que les ensembles de spectres puissent être comparés de manière fiable. La décomposition des pics peut être réalisée en imposant des contraintes raisonnables (la largeur à mi-hauteur FWHM, la position des composantes et la distance entre elles...). La méthodologie développée ici est basée sur l'approche utilisée pour les bio-surfaces et adaptée aux interfaces (bio)organiques-inorganiques.<sup>489,492,496,497</sup>
- La prise en compte de la pertinence chimique des données spectrales, qui peut être intéressante à trois niveaux différents : guider la décomposition des pics en sélectionnant des contraintes adéquates, valider la décomposition et l'identification des composants, et exprimer les informations nouvellement générées en termes chimiques appropriés. La cohérence des données spectrales, générées par la quantification élémentaire, la décomposition et l'estimation de certains composés spécifiques, *e.g.* le collagène, peut être évaluée au moyen de corrélations statistiques simples si un nombre significatif d'échantillons est disponible.

La spectroscopie XPS renseigne sur la composition élémentaire de l'ECM située en extrême surface, c'est-à-dire à une profondeur maximale de *c.a.* 10 nm. Il est à noter que la composition fournie peut différer de celle de l'ensemble du tissu en raison, par exemple, de la présence d'une contamination en surface. Bien qu'inévitable, la contamination peut être contrôlée et estimée.<sup>498</sup> Les données générées par les analyses de surface peuvent donc différer de celles obtenues par une analyse en profondeur et ne pas être parfaitement comparables aux données recueillies déjà décrites dans la littérature. Des études complémentaires concernant la structure et les propriétés mécaniques de l'ECM doivent donc être réalisées à l'échelle nanométrique afin d'être raisonnablement liées à la composition de l'ECM déterminée par l'analyse XPS.

#### 1.4.6. La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est un microscope à sonde locale, inventé par Binnig et al. en 1986,<sup>499</sup> qui permet d'observer la topographie des surfaces. Cette technique de microscopie en champ proche consiste à balayer la surface de l'échantillon à l'aide d'une pointe qui, par l'intermédiaire des interactions établies, détecte les différentes propriétés topographiques de la surface.

Ce microscope permet d'effectuer des mesures précises et non destructives à l'échelle nanométrique, ce qui permet d'accéder aux propriétés topographiques, électriques, magnétiques, chimiques, optiques et mécaniques de la surface d'un échantillon sur une vaste plage de températures et dans divers environnements, à savoir l'air, les liquides ou l'ultra-haut vide. La possibilité d'effectuer des mesures dans des environnements liquides et à température ambiante fait de l'AFM un outil puissant pour sonder les systèmes biologiques.

L'AFM est réalisée à l'aide d'une pointe (sonde) fixée à un levier microfabriqué en nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) et dont le rayon de courbure peut varier de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres. Ainsi, en AFM la résolution latérale (en  $x$ ,  $y$ ) dépend du rayon de courbure de la pointe, et est de l'ordre du nanomètre, alors que la résolution spatiale (en  $z$ ) est de l'ordre du dixième de nanomètre. Un faisceau laser focalisé sur le levier permet de suivre la position de la pointe par rapport à la surface par l'intermédiaire de la position du laser dans une photodiode (**Figure 25A**). Pendant l'analyse, l'échantillon se déplace grâce à un scanner céramique piézoélectrique qui contrôle la position latérale ( $x$ ,  $y$ ) et verticale ( $z$ ) de la pointe. Comme le montre la **Figure 25A**, le mouvement de ce dernier est mesuré en suivant la position du faisceau laser, réfléchis via le levier puis un miroir, dans une photodiode.

L'AFM peut être utilisée en imagerie ou en spectroscopie de force, en fonction de l'application spécifique requise.

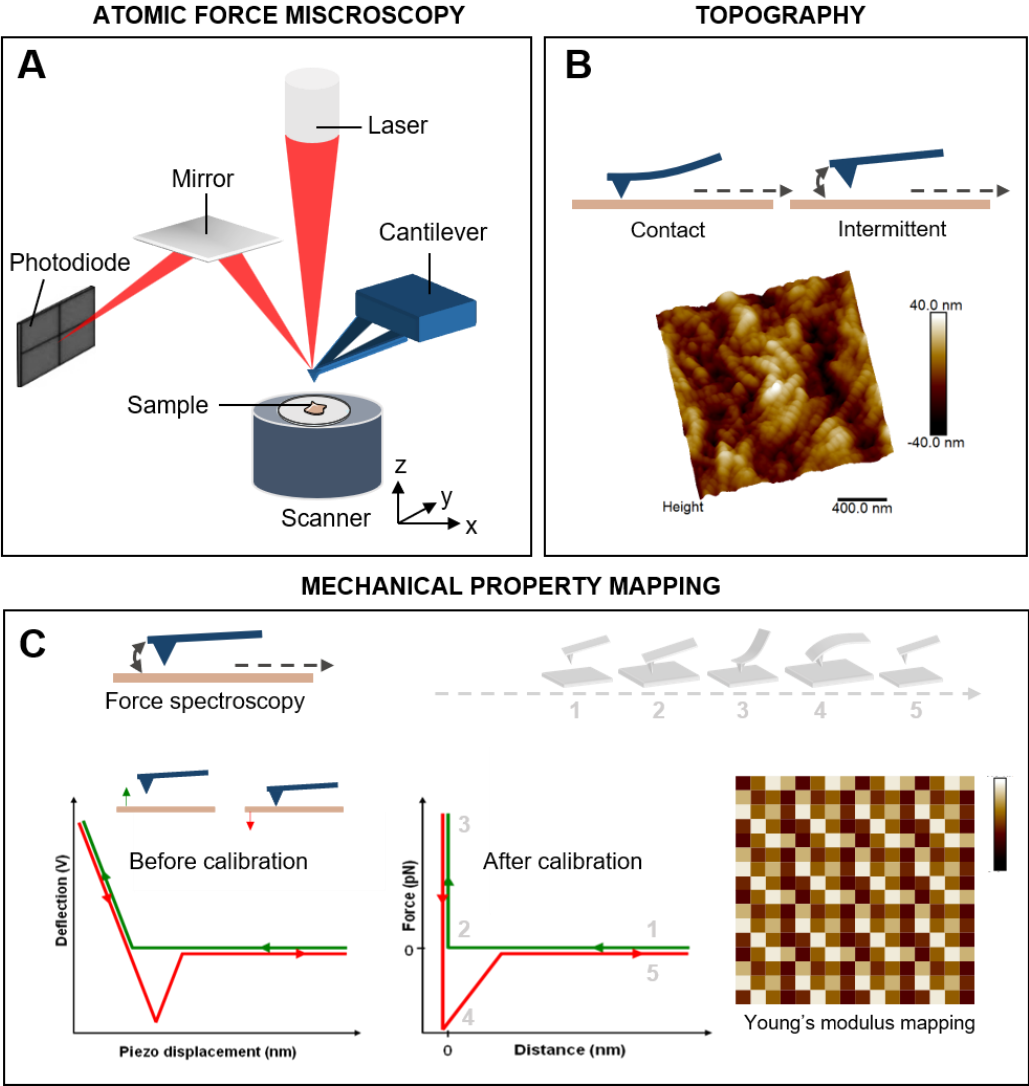
#### **Imagerie**

En imagerie, on peut distinguer (**Figure 25B**) :

(1) le mode contact, dans lequel la pointe est en contact permanent avec la surface de l'échantillon avec une force d'appui maintenue constante durant le balayage,

(2) le mode intermittent, dans lesquels le cantilever oscille à une fréquence donnée, comme, par exemple, dans le mode Tapping<sup>®</sup> ( $\sim$  fréquence de résonance) ou le mode peak force tapping<sup>®</sup> ( $<$  fréquence de résonance).

Il convient de noter que le mode contact peut conduire à une détérioration de l'échantillon ou à une déformation des images (mouvement de friction). Le mode intermittent permet de résoudre ce problème puisque la pointe est en contact intermittent avec la surface de l'échantillon. Dans les différents travaux menés dans le cadre de ce projet de thèse, aucune différence notable n'a été observée en termes de qualité d'image entre le mode contact et intermittent. L'ensemble des échantillons a donc été imagé en mode contact en raison de la stabilité de la mesure qu'offre ce mode.<sup>500,501</sup>



**Figure 25.** Schematic illustration of AFM analysis (A) Instrumentation (B) Imaging mode (C) Force spectroscopy mode

## Spectroscopie de force

Pendant la mesure mécanique en mode spectroscopie de force, la pointe de la sonde AFM est approchée et retirée de la surface de l'échantillon (**Figure 25C**). En effet, le scanner piézoélectrique, sur lequel est monté l'échantillon, est déplacé de haut en bas à un emplacement (x,y) donnée en appliquant une tension. Les courbes de force et de distance sont ensuite enregistrées en surveillant la déviation verticale du cantilever (d) en fonction du déplacement vertical du scanner piézoélectrique (z). On obtient une courbe brute qui est un tracé de la tension de la photodiode en fonction de la position du scanner. En utilisant les corrections appropriées, cette courbe peut être convertie en force-distance.

Tout d'abord, la tension peut être convertie en une déviation du cantilever en utilisant la pente de la courbe dans la région où la pointe et l'échantillon sont en contact. Ensuite, la déviation du cantilever est convertie en une force (F) en appliquant la loi de Hooke :  $F = -k \cdot d$ , où F est la force, k est la constante de raideur du cantilever et d est la variation de la déviation du cantilever. La courbe peut être corrigée en traçant F en fonction de la séparation pointe-échantillon, (z-d). La distance de séparation zéro est déterminée comme la position de la partie linéaire verticale de la courbe dans la région de contact.

On peut distinguer différentes parties dans une courbe force-distance ; un exemple typique obtenu pour une surface indéformable est illustré dans **Figure 25C** : A distance de l'échantillon, les forces subies par la pointe sont nulles (1) et le cantilever n'est pas dévié. Lorsque la pointe s'approche de la surface, le cantilever peut se courber vers le haut en raison des forces répulsives jusqu'à ce que la pointe entre en contact avec la surface de l'échantillon (2). Lorsque ces forces d'attraction dépassent la constante de raideur du cantilever additionné au gradient des forces de répulsion, la pointe entre en contact avec l'échantillon.

La phase d'approche de la courbe force-distance peut être utilisée pour mesurer les forces de surface, comprenant les forces de Van der Waals et les forces électrostatiques, de solvation, d'hydratation etc.<sup>502</sup>

Une fois que la pointe est en contact avec la surface, elle peut être poussée dans la surface de l'échantillon avec une certaine force, provoquant une déviation du cantilever et une augmentation de la force de contact répulsive (3). Les propriétés viscoélastiques de l'échantillon, telles que le module d'élasticité, peuvent être étudiées. Lorsque le cantilever se

rétracte de la surface, la pointe reste en contact avec la surface en raison des forces d'adhérence (4). À une certaine distance, la force du cantilever sera suffisante pour les surmonter et la pointe se libérera (5).

Pour une mesure quantitative du module élastique, la constante de ressort du cantilever doit être calibrée. Dans ce cas, la méthode du bruit thermique est appliquée pour la calibration. Le spectre de bruit thermique est un tracé des fluctuations du cantilever en fonction de la fréquence. Les fluctuations thermiques du cantilever sont dues à l'environnement. La plus grande amplitude sera observée autour de la fréquence de résonance du cantilever. En effet, pour une température donnée, cette amplitude ne dépend que de la constante de raideur du cantilever. La courbe de résonance thermique peut donc être ajustée à une fonction de Lorentz, ce qui permet de calculer la constante de raideur.

La déflexion du cantilever est directement proportionnelle à la force d'interaction pointe-échantillon. Lorsque la déviation du cantilever est connue en unités de longueur, il est facile de la convertir en unités de force. La force dans les interactions moléculaires est généralement comprise entre  $10^{-9}$  et  $10^{-12}$  N. Les données d'une expérience sont souvent affichées sous la forme d'un simple graphique x-y. Les positions de hauteur pour l'approche ou la rétraction de la pointe et de l'échantillon sont indiquées dans le graphique. Les positions de hauteur pour l'approche ou la rétraction du cantilever sont indiquées par l'axe des x et la propriété du cantilever qui est mesurée est l'axe des y.

Ces vingt dernières années, l'AFM est devenue une technique phare et couramment utilisée pour caractériser les tissus musculosquelettiques tels que le tendons, l'os et le cartilage <sup>399,503-510</sup> Par exemple, de nombreux auteurs ont utilisé l'AFM pour étudier le cartilage articulaire porcine, murin et humain. <sup>401,509-511</sup> Cependant il existe une grande disparité dans les résultats obtenus sur un même tissu. En effet, plusieurs paramètres peuvent influencer les mesures du module d'Young :

- La nature de l'échantillon : Darling *et al*, ont mesuré la rigidité *in situ* de la PCM et de l'ECM du cartilage articulaire humain, porcine et murin. Cette étude a démontré une variation intraespèce du module élastique identique mais une variabilité interespèce de l'élasticité, *i.e.*  $306 \pm 133$  kPa,  $81 \pm 19$  kPa et  $197 \pm 92$  kPa mesurés respectivement sur les échantillons humains, porcine et murin. Par ailleurs, l'état physiologique du tissu, *e.g.* l'âge, peut également influencer la mesure des propriétés mécaniques. <sup>509,512</sup>

- La préparation de l'échantillon influence également la mesure des propriétés mécaniques. Par exemple, les réticulations créées lors de la fixation des tissus au paraformaldéhyde rigidifient le tissu. Un même tissu analysé « frais » ou après congélation directe ne présentera pas les mêmes propriétés mécaniques qu'un tissu fixé.
- Les dimensions de la pointe AFM utilisée : Lors d'une étude menée sur le cartilage articulaire porcin, Stolz *et al.* ont démontré que le module élastique mesuré dépendait fortement de la taille et de la forme de la pointe utilisée lors de l'analyse : la pointe nanométrique mesurent un module de Young 100 fois plus faible que la pointe micrométrique (pointe possédant une microbille en borosilicate à son extrémité)<sup>510</sup>.
- La zone et la direction d'analyse : Le module élastique mesuré peut également dépendre de la localisation à l'intérieur même de l'articulation, *e.g.* Wilutz *et al.* ont montré une diminution au cours de l'arthrose de 45% ( $p=0.003$ ) du module de Young de l'ECM du cartilage articulaire provenant du condyle médial tandis qu'aucune différence entre le cartilage sain et arthrosique n'a été observée dans le condyle latéral.<sup>401</sup> Par ailleurs, le cartilage étant un tissu anisotrope, la direction utilisée pour les mesures d'élasticité affecte grandement les valeurs du module de Young obtenues comme le montre les études de Jurvelin *et al.* et McLeod *et al.*<sup>431,513</sup> Jurvelin *et al.* ont, en effet, montré que le module élastique mesuré parallèlement à la surface est supérieur à celui mesuré perpendiculairement à celle-ci ( $1.237 \pm 0.486$  MPa *versus*  $0.845 \pm 0.383$  MPa). L'étude menée par McLeod *et al.*, a permis de démontrer que le module d'élasticité est, en effet, influencé par l'orientation des fibrilles de collagène. En zone superficielle et profonde, les modules élastiques mesurés dans la direction des fibrilles de collagène, *i.e.* mesurés respectivement parallèlement à la surface et perpendiculairement à la tidemark, sont significativement plus grands que ceux mesurés perpendiculairement à l'orientation des fibrilles. La zone intermédiaire qui sert de transition structurelle, *i.e.* orientation aléatoire des fibrilles, ne présente pas de variation significative du module élastique entre les différentes directions d'analyse.

En conclusion, L'AFM est un outil puissant qui permet à la fois (1) d'accéder à la structure supramoléculaire des composants de l'ECM et de (2) déterminer les propriétés mécaniques associées à ces structures. Cependant, cette caractérisation à haute résolution nécessite la mise en place d'un protocole expérimental rigoureux afin d'obtenir des informations quantifiables fiables, reproductibles et comparables.

## **1.5. Objectif de l'étude et stratégies d'investigation : une approche interdisciplinaire pour une meilleure compréhension du vivant**

L'ECM de la capsule et du cartilage articulaire est complexe tant dans sa composition que dans sa structure. Les propriétés biomécaniques essentielles au bon fonctionnement de ces tissus résultent de l'interaction subtile entre les composants de l'ECM à travers des assemblages supramoléculaires. Le remodelage de l'ECM apparaît critique pour le développement et la progression des affections ostéoarticulaires. En effet, de petites variations en termes de composition et de structure peuvent induire un impact significatif sur l'intégrité du tissu et ses propriétés, entraînant ainsi des dysfonctionnements, *e.g.* les luxation de l'épaule, et le développement de pathologies, *e.g.* l'arthrose. Le remodelage de l'ECM est souvent étudié par des techniques biochimiques standards, *e.g.* histochimie, qui ne permettent pas de fournir des informations à l'échelle supramoléculaire. Nous pensons que l'utilisation des techniques de caractérisation de surface pour l'analyse des tissus biologiques, à l'échelle supramoléculaire, pourrait contribuer à une meilleure compréhension de la nature des processus biologiques et physicochimiques impliqués dans le remodelage pathologique de l'ECM.

Les objectifs de ce projet sont multiples avec (1) le développement de méthodes permettant l'analyse de tissus biologiques par des techniques puissantes de caractérisation de surface et (2) la compréhension fondamentale des modifications de l'ECM dans les tissus ostéoarticulaires malades.

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de trois études qui portent sur :

- ✚ L'effet de la réticulation du collagène sur les propriétés structurelles et mécaniques des capsules d'épaule humaine luxées,
- ✚ La caractérisation du remodelage pathologique de l'ECM du cartilage humain dans l'arthrose, en termes de composition, de structure et de propriétés mécaniques,
- ✚ La caractérisation moléculaire, biochimique et physicochimique du remodelage de l'ECM associé à la calcification pendant la différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires.





# **Chapitre 2**

## **Effet de la réticulation du collagène sur les capsules d'épaule humaine luxées**

—

### **Effet sur les propriétés structurelles et mécaniques**

---

L'ECM de la capsule articulaire est principalement composée de collagène fibrillaire de type I. La résistance à la traction nécessaire à la stabilisation de l'articulation résulte de la nanostructure des fibrilles en présence. La structure fibrillaire du collagène est stabilisée par plusieurs modifications post-traductionnelles qui permettent la formation de réticulations intermoléculaires et interfibrillaires. La rigidité du tissu dépend, entre autres, de la densité de ces réticulations :

- une trop forte densité réticulaire rigidifie le tissu qui perd en élasticité, ce qui engendre une limitation dans l'amplitude des mouvements et dans l'absorption des chocs, *e.g.* réticulation de type AGE lors du vieillissement du tissu.
- une trop faible densité réticulaire assouplit le tissu qui, trop lâche, n'est plus en mesure de stabiliser l'articulation, on assiste dès lors au glissement anormal de l'extrémité osseuse en dehors de l'articulation, *i.e.* luxation.

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de la combinaison riboflavine/UV, une procédure de réticulation utilisée dans le traitement de troubles ophtalmiques, sur la structure et la réponse mécanique des capsules d'épaule issues de patients sujets à de fréquentes luxations d'épaules. Dans ce but, la structure et les propriétés mécaniques des capsules ont été déterminées à l'échelle nanométrique par AFM.

Ce travail fait l'objet d'un article publié le 18 février 2022 — International Journal of Molecular Sciences 23, no. 4: 2297, <https://doi.org/10.3390/ijms23042297>

---

# Impact of collagen crosslinking on dislocated human shoulder capsules - Effect on structural and mechanical properties

Pauline Cornette<sup>a,b,†</sup>, Ilhem Lilia Jaabar<sup>a,b,†</sup>, Vincent Dupres<sup>c</sup>, Jean-David Werthel<sup>d</sup>, Francis Berenbaum<sup>b,e</sup>, Xavier Houard<sup>b,\*</sup>, Jessem Landoulsi<sup>a</sup>, Geoffroy Nourissat<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface, LRS, F-75005 Paris, France

<sup>b</sup> Sorbonne Université, INSERM (UMR\_S938), Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, F-75012 Paris, France

<sup>c</sup> Université Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000, Lille, France

<sup>d</sup> Orthopedy Department, AP-HP Ambroise Paré Hospital, 9, avenue Charles de Gaulle, 92100, Boulogne-Billancourt, France

<sup>e</sup> Rheumatology Department, AP-HP Saint-Antoine Hospital, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012, Paris, France

<sup>f</sup> Clinique Maussins-Nollet, F-75019 Paris, France

<sup>†</sup> These authors contributed equally

## Abstract

Classical treatments of shoulder instability are associated with recurrence. To determine whether the modification of the entire capsule properties may be an alternative procedure, the effect of crosslinking treatment on the structure and mechanical characteristics of diseased human shoulder capsules was investigated. Joint capsules harvested from patients during shoulder surgery (n=5) were treated or not with UV and/or riboflavin (0.1%, 1.0% and 2.5%). The structure and the mechanical properties of the capsules were determined at the nanoscale by atomic force microscopy (AFM). The effect of treatments on cell death was investigated. Collagen fibrils displayed highly ordered structures. They were well-aligned and adjacent to each other with a D-periodicity of  $66.9 \pm 3.2$  nm and a diameter of  $71.8 \pm 15.4$  nm in control untreated capsules. No effect of UV and/or riboflavin treatments was observed on the structural organization of the collagen fibrils or the D-periodicity or the diameter of the fibrils. UV and/or riboflavin treatments also did not induce cell death. In contrast, the crosslinking procedure strongly affected the tissue elasticity with a mean increase in the Young's modulus values ranged between 1.3- and 7.1-fold ( $p < 0.0001$  for each patient) for the UV + 2.5% riboflavin treatment. Our results show that the crosslinking procedure changed the biomechanics of diseased capsules, while keeping their structural organization unchanged. The UV/riboflavin crosslinking procedure may be a promising way to preserve the functions of collagen-based tissues and tune their elasticity for clinically relevant treatments.

**Keywords:** shoulder instability, atomic force microscopy, type I collagen fibrils

## 2.1. Introduction

Instabilities of the glenohumeral joint are the frequent disorders of young sportive patients. Dislocations of the shoulder joint are almost systematically associated with bony and capsulolabral disorders. Anatomic lesions like Bankart, HAGL (humeral avulsion glenohumeral ligament) or mid substance tears of the capsule and labrum are well known and are routinely treated by surgical procedures. Even after having fixed those macroscopic tears, recurrence is frequent.<sup>514</sup> A simple plication or direct repair could not treat the instability efficiently because surgery is acting mostly on the soft tissues involved in the procedure.<sup>514</sup> The modification of the entire capsule then appears as an alternative procedure. Hippocrates first described burns of all the anterior aspect of the shoulder in order to perform a scar tissue to limit anterior translation.<sup>515</sup> Thermal capsulorrhaphy has been developed and used to treat many different types of shoulder instability, but the efficacy of the thermal treatment cannot be confirmed.<sup>349</sup> This thermal shrinkage can also be carried out using radiofrequency or laser devices.<sup>351</sup> Rare but detrimental complications and few relevant clinical studies made this technique less popular.<sup>351</sup> Therefore, there is a real unmet need to efficiently treat shoulder instability.

The frequent recurrence of instability is mainly associated with the modification of the capsulolabral tissue structure caused by repetitive trauma. Rodeo *et al.*<sup>348</sup> reported that dislocation modifies the structure of the capsule at the (supra)molecular level, showing significant differences in the characteristics of collagen fibrils (*i.e.*, collagen crosslinks, collagen fibril diameter and density and amino acid composition) between healthy and dislocated shoulder capsules. The joint capsule is indeed mainly composed of fibrils of self-assembled type I collagen with a presumable multiaxial orientation.<sup>516</sup> The mechanical properties of the capsule, particularly the tensile strength, depend on the mean diameter of collagen fibrils and the intermolecular crosslinks between collagen molecules within the fibrils, which prevent the slippage under load. The mechanical behaviour is further tuned by the alignment of these fibrils in the tissue.<sup>348</sup> The anterior dislocation primarily affects the tensile behaviour of the glenohumeral capsule rather than the shear behaviour, and this phenomenon could be caused by failure or rotation of the collagen fibrils and/or the plastic deformation of the matrix.<sup>517</sup>

In vivo, type I collagen fibrils form by the self-assembly of collagen triple-helix (with molecular dimensions of ~300 nm in length and ~1.5 nm in diameter)<sup>36,518</sup> through a cell-

mediated regulation process involving two main processes<sup>519</sup>: (i) intermolecular interactions (hydrophobic interactions, hydrogen bonding, electrostatic interaction) determined by the intrinsic properties of collagen molecules;<sup>36,518</sup> and (ii) covalent bonds, which may be of a chemical nature or mediated by enzymes.<sup>519</sup> The controlled enzyme-assisted crosslinking is achieved by the oxidative deamination of specific lysine residues via lysyl oxidases, yielding lysine-aldehydes. The latter react, then, with an opposing hydroxylysine to form a Schiff base. By contrast, the non-enzymatic crosslinking results in an adventitious reaction between collagen and glucose. These crosslinking processes are tissue specific and provide the strength to collagen fibrils, depending on the mechanical requirements of the tissue (elasticity, stiffness, energy storing, etc.). Improving the mechanical properties of tissues by crosslinking has been used in clinical practice in ophthalmology for the treatment of cornea and sclera disorders for a couple of decades.<sup>520</sup> The principle is to change the degree of crosslinking within the collagen fibrils to modify the mechanical properties of the tissue. This interestingly therapeutic approach may be an alternative way to treat shoulder instability.

In the present study, we investigate the combined effect of UV irradiation and riboflavin, a procedure adapted from crosslinking treatments performed on cornea and sclera disorders<sup>520</sup>, on the structure and mechanical properties of diseased shoulder capsules harvested from patients during surgery. Owing to the dimensions of the collagen fibrils and their organization in the tissue, it is crucial to probe the effect of crosslinking at the nanoscale. Capsules were, thus, characterized by atomic force microscopy (AFM), one of the main techniques used to probe the organization of collagen in tissues at the nanoscale.<sup>521–529</sup> More precisely, the present investigations aim to (i) better define the structure of the collagen in the capsule, (ii) determine the impact of the crosslinking treatment on collagen fibrils structures and mechanical properties, and (iii) define optimal conditions for clinically relevant experimentation of this crosslinking procedure.

## 2.2. Materials and methods

### 1.2.3. Sample preparation

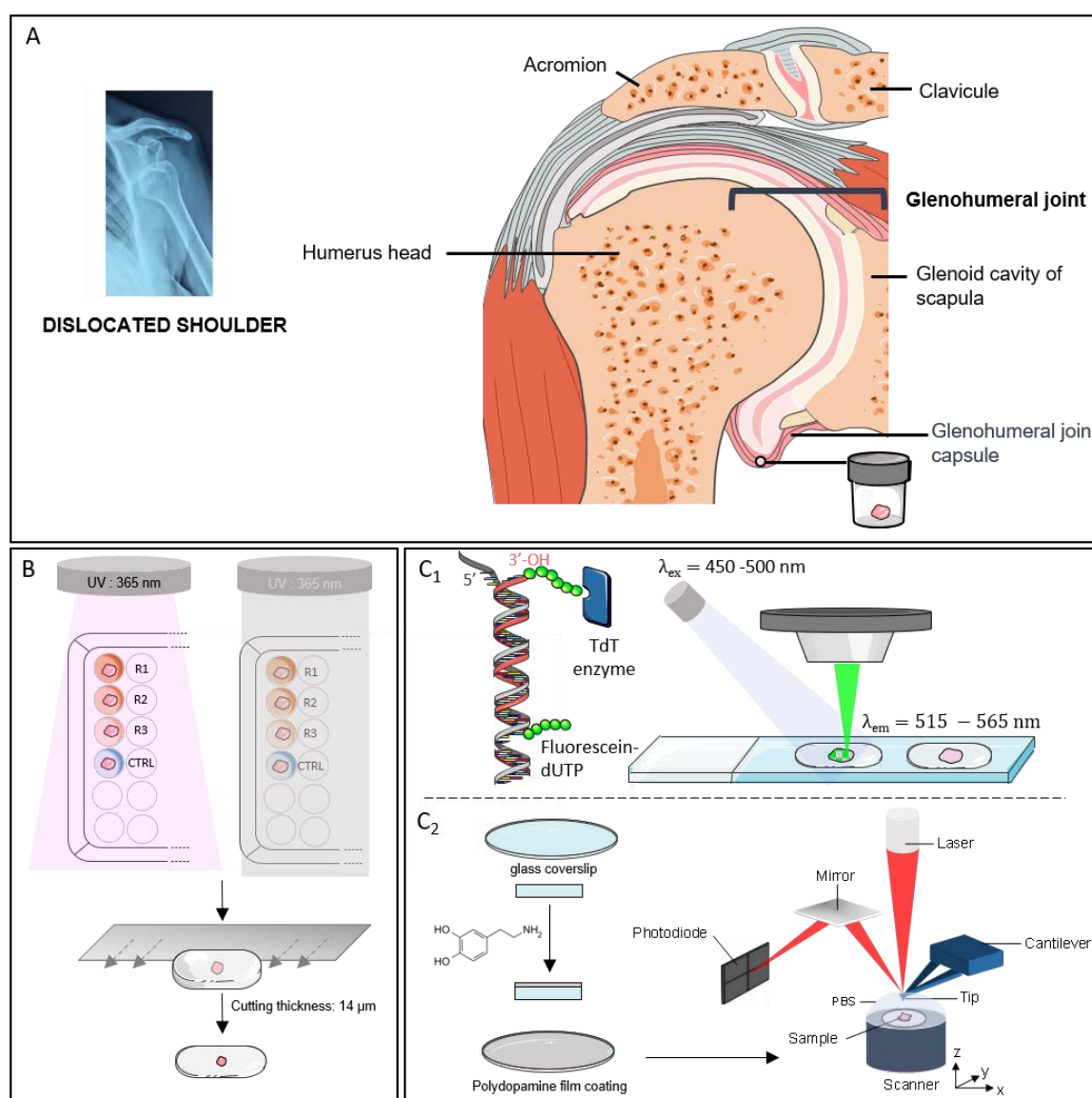
Articular capsules were collected from five patients undergoing shoulder surgery in the Maussins-Nollet Clinic (Paris, France). Informed consent was obtained from each patient on the day before surgery. Experiments using human samples have been performed in accordance with the Declaration of Helsinki and have been approved by a French Institutional Review Board (Comité de Protection des Personnes Ile de France V). All experiments were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Latarjet procedure was performed to stabilize the joint, allowing to remove 1 cm<sup>2</sup> of capsule, at the anterior and superior aspect of the detached capsule, that is no more useful in this surgical procedure. Each sample were cut into eight equal pieces of about 1 mm<sup>3</sup> (**Figure 26A**). Following the dissection, tissues were distributed fairly among two 96-well tissue culture plates corresponding to UV conditions and control conditions. Samples were incubated in 150  $\mu$ L of PBS buffer solution with or without riboflavin at various concentrations for 5 min in the dark. The different procedures used for sample preparation are summarized in **Table 4**. After changing treatment solution of each well by a new one, articular capsules were incubated for 30 min at room temperature. During this incubation period, the UV condition plate was illuminated by UV beam ( $\lambda = 365$  nm), while for the control condition plate was protected from the light (**Figure 26B**). All treatment solutions were changed every 5 min during this 30 min. After treatment, tissues were washed in PBS during 30 min, embedded in O.C.T. compound (Leica Biosystems, Nanterre, France) and stored at -80°C until cryosectioning. For each treatment condition, tissues were sectioned with a thickness of 7  $\mu$ m for biological analysis and 14  $\mu$ m for structural and mechanical characterizations. The different samples are labelled R<sub>H</sub>, R<sub>M</sub> and R<sub>L</sub> according to the high (2.5%), medium (1.0%) or low concentration of riboflavin (0.1%), respectively, with or without UV (see **Table 4**).

### 1.2.4. Cell death detection

Apoptosis was determined using the *in situ* cell death detection kit, Fluorescein (Roche-11684795910, Basel, Switzerland). The TUNEL assay was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, the articular capsules slices were fixed in paraformaldehyde (3.7% in PBS, pH 7.4) for 20 min and incubated in permeabilization solution (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate) for 2 min on ice. Free DNA 3'-OH ends were next

labeled with fluorescein-labeled nucleotides (fluorescein-dUTP) in the presence of a Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) for 60 min at 37°C in a humidified atmosphere in the dark.

Tissues incubated in dUTP without TdT enzyme were used as negative control, while positive control had DNA strand breaks induced with recombinant DNase 1 (0.1 mg/mL for 10 min), prior to the labelling procedure. Samples were directly analyzed under fluorescence microscope (excitation wavelength of 450-500 nm and detection in the range of 515-565 nm). DAPI staining was used to check the location of the nucleus (**Figure 26C**).



**Figure 26.** Experimental design. A) Tissue sampling. B) Tissue treatment: Riboflavin treatment ( $R_H$ : 2.5%,  $R_M$ : 1.0%,  $R_L$ : 0.1%) with and without UV radiation, O.C.T. inclusion and subsequent cryosectioning. C) Tissue characterizations: Fluorescent ( $C_1$ ) for the detection of cell apoptosis and atomic force microscopy ( $C_2$ ) for probing structural and mechanical properties.



**Table 4.** Treatment solution of each plate well according to the associated condition

Plate	Sample	Treatment	Solution
Control condition	CTRL	Control Riboflavin	PBS 1X
	R <sub>H</sub>	Riboflavin 2.5%	Riboflavin 2.5% in PBS 1X
	R <sub>M</sub>	Riboflavin 1.0%	Riboflavin 1.0% in PBS 1X
	R <sub>L</sub>	Riboflavin 0.1%	Riboflavin 0.1% in PBS 1X
UV condition	UV	Control UV	PBS 1X
	UV + R <sub>H</sub>	Riboflavin 2.5%	Riboflavin 2.5% in PBS 1X
	UV + R <sub>M</sub>	Riboflavin 1.0%	Riboflavin 1.0% in PBS 1X
	UV + R <sub>L</sub>	Riboflavin 0.1%	Riboflavin 0.1% in PBS 1X

### 1.2.5. Atomic force microscopy

Experiments were performed using a commercial AFM (NanoScope VIII MultiMode AFM, Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA.). The human tissue samples were immobilized on chemically modified glass slide (**Figure 26C**) to avoid movement (vertical or lateral) that may generate artifacts during imaging and force curve acquisition. Glass slides (disks, 12 mm of diameter, Thermo Scientific) were cleaned prior to use in a piranha solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (27%), 3/1, v/v) and thoroughly rinsed with ultrapure water (Milli-Q, Millipore, France). The glass slides were then incubated in dopamine solution (1mg/mL dopamine in 10 mM Tris, pH 8.5) at room temperature for 24h while ensuring a gentle stirring. The glass slides were then rinsed in three different baths (2 min each) of ultrapure water and dried under nitrogen gas flow.

Glass slides, on which the human tissues were cryo-sectioned, were fixed on a steel sample puck using a small piece of adhesive tape. Images were recorded both in the hydrated (PBS buffer) and the dried states at room temperature (20-22°C). Oxide-sharpened microfabricated Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> cantilevers were used (SNL-10, Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, Cam USA). The curvature radius of the tips was about 10 nm

(manufacturer specifications). All topographic images shown in this paper were flattened using a third-order polynomial to correct surface tilt and eliminate bow effects.

Force-distance curves (see **Figure 27A** and **B**) were recorded in PBS buffer at room temperature using microfabricated Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> cantilevers (MLCT from Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA, USA). The spring constants of the cantilevers were measured using the thermal noise method, yielding values ranging from 0.025 to 0.0482 N/m. The deflection sensitivity was calibrated by recording the response of the cantilever on a silicon wafer substrate, considered as an infinitely stiff surface. The curvature radius of silicon nitride tips was about 20 nm (manufacturer specifications). The same tip was used for all the measurements of the same patient (for all four conditions, without modification of the parameters), which removes the variability that one could otherwise have between conditions. A visual control of the tissue was performed using the optical microscope coupled with the AFM instrument to verify tissue integrity and define an area of interest. All force curves were recorded by applying a 1 nN force trigger with a 1 μm ramp size and approach/retraction velocities of 8 μm/s. For each sample, force-distance curves were acquired at least four areas of the sample. For each area (2 μm × 2 μm), curves were recorded with a force volume parameter set to 64 by 64 pixels for 1 area and 16 by 16 pixels for 3 areas, resulting in a minimum of 1700 curves per sample. For each condition (CTRL, UV, R and R+UV, see **Table 4**), 3 different samples were used, so at least 5000 curves were recorded per condition per patient. Since the edge of treated tissues appeared yellow due to the accumulation of riboflavin, only the non-colored internal part was analyzed.

#### *1.2.6. Data analysis*

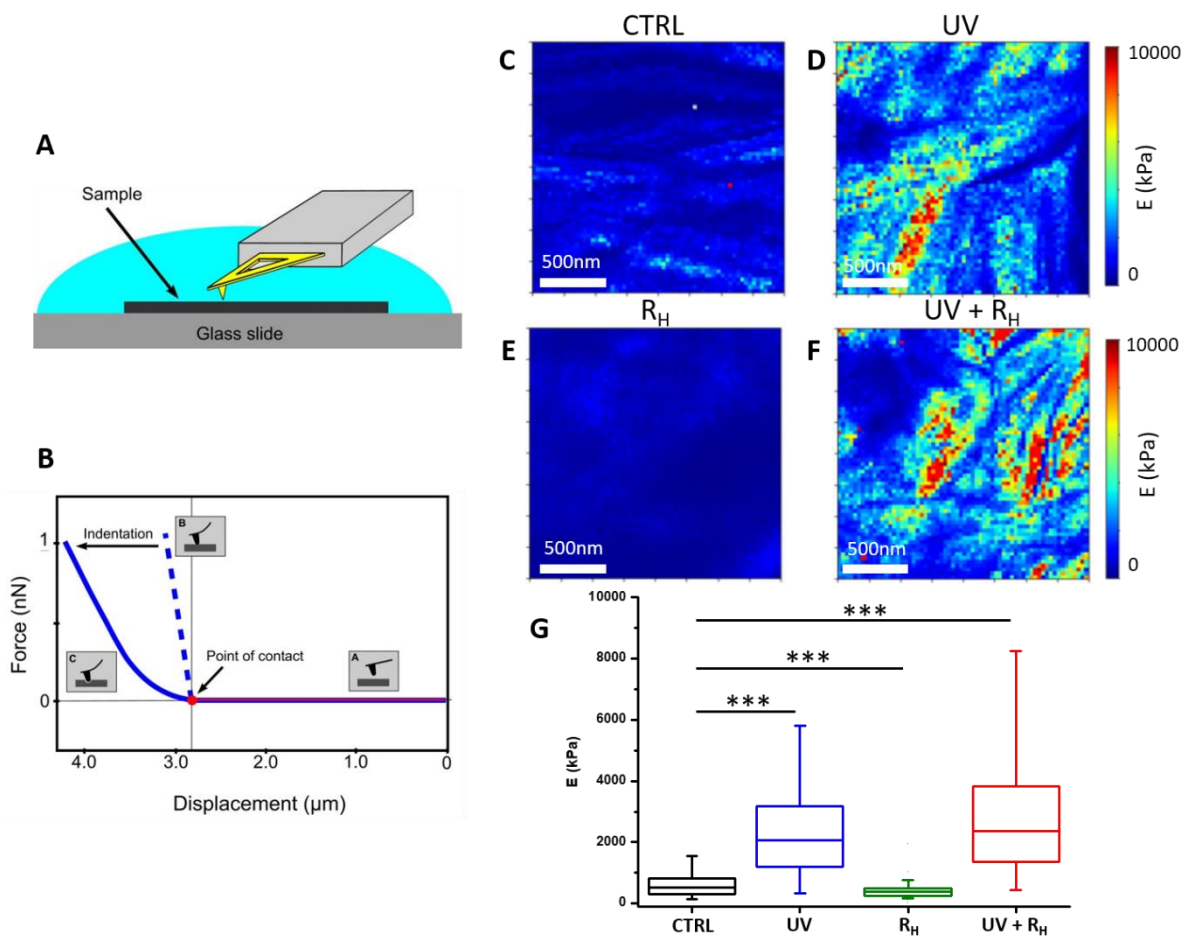
At least 3 images of 2 μm × 2 μm were acquired per condition and per patient and used to determine the intrinsic characteristics of the collagen fibrils (mean diameter and D-period). D-period corresponds to a succession of gaps and overlaps along the fibrils, generally around 67 nm for type I collagen. Measurements were obtained from at least 100-line scans obtained on different AFM height images. Box plots were generated by pooling all the data as a function of the condition and patient. Wilcoxon matched paired tests were performed with GraphPad Prism 5 software to compare the characteristics of the collagen fibrils between different conditions for each patient. A p-value of <0.0001 was considered to be significant.

An in-house pyAF (python Atomic Force) software, version 1.5.1, is used to analyse the force-distance curves. To detect the point of contact on the force curves, a linear fit was made using the baseline of the approach curve. A noise threshold is used to shift the fit along the force axis. The noise parameter can be manually adjusted by the user to optimize the detection of the point of contact. The position of the contact point is determined by the intersection between the force curve and this shifted fit. Subsequently, the elasticity was deduced from the Young's modulus which was determined from the indentation portion of the curve using the elastic contact model for pyramidal indenters (named Bilodeau model<sup>530</sup>), using the following equation:

$$F = \frac{3 E \tan \alpha}{4 (1 - \nu^2)} \delta^2$$

where  $F$  is the measured force,  $E$  the elastic modulus,  $\alpha$  the face angle of the pyramid,  $\delta$  the indentation depth, and  $\nu$  the sample's Poisson's ratio, that was set to 0.5, which correspond to an incompressible material.

The results are then presented in the form of  $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$  elasticity maps recorded on the 64 by 64 curves experiments where Young's modulus is displayed as coloured pixels that reflect the tissue stiffness magnitude. Box plots were also generated by pooling all the data from the elasticity maps as a function of the condition and patient. Unpaired t-test with Welch's correction (which assume no equal SDs) was performed to compare Young's modulus between conditions (\*\*p-value < 0.0001. A p-value of <0.0001 was considered to be significant). Bottom and top of the boxes represent the first and third quartiles respectively. The line within the bow corresponds to the second quartile, *i.e.* the median. The whiskers represent the 5<sup>th</sup> and the 95<sup>th</sup> percentiles.

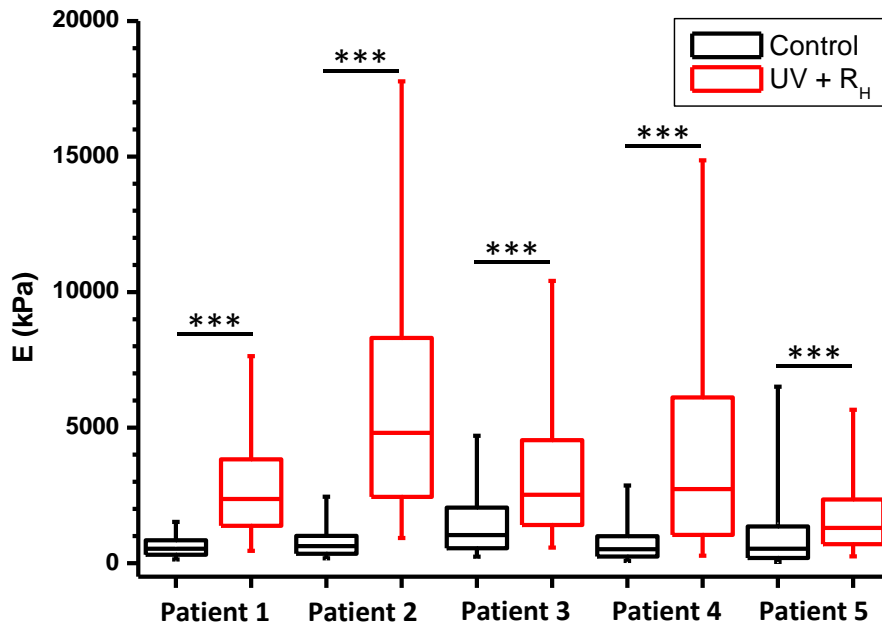


**Figure 27.** Atomic force microscopy analysis of human capsule elasticity. (A) A schematic representation of the experimental set-up. (B) Representative Force versus Displacement curve (the approach part) showing two different behaviors: the probe pushing on a hard surface (dashed line) or indenting in a soft surface (continuous line) (C-F) Elastic modulus maps ( $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ ) obtained for the joint capsule in the different conditions : control (C), UV treatment (D), 2.5% Riboflavin treatment ( $R_H$ ) (E) and 2.5% Riboflavin + UV treatment (UV +  $R_H$ ) (F). The different colors are representative of lower (blue/green) and higher (red/orange) values of the Young's modulus. (G) Quantification of Young's modulus obtained by AFM for the joint capsules in the four different conditions for one representative patient (Box plots generated by pooling all of the data collected for at least three different elasticity maps per condition and for different regions of the tissue, \*\*\*p-value < 0.0001).

## 2.3. Results

### 2.3.1. *Increased capsule stiffness after crosslinking procedure*

The procedures used for tissue sampling, crosslinking and sample preparation are summarized in **Figure 26**. AFM was used to compare the mechanical properties of the joint capsules with and without treatment (**Figure 27** and **Figure 28**). To ensure that observed differences between treatment may not be due to an experimental artefact, all experiments for the same patient were always performed using the same AFM tip and by keeping strictly the same experimental parameters. The **Figure 27** presents the elasticity maps obtained for one patient in the different experimental conditions, where Young's modulus is displayed as coloured pixels that reflect the tissue stiffness magnitude. In the control non-treated condition (**Figure 27C**), the elasticity of the tissue is relatively low compared to UV and UV + 2.5% Riboflavin (UV + R<sub>H</sub>) treatments (**Figure 27D** and **F**); the latter treatments induced a strong increase in tissue stiffness ( $p < 0.0001$  for both UV and UV+R<sub>H</sub> treatment) (**Figure 27G**). By contrast, the riboflavin (R<sub>H</sub>) treatment led to a decrease of the Young modulus ( $p < 0.0001$ ) (**Figure 27E** and **G**) that may be explained by an effect of riboflavin on the native crosslinking of collagen fibrils. The effects of the treatments on the mechanical properties of the joint capsules observed on this patient reflect the trends obtained for the entire patient panel. Since the most noticeable effect on mechanical properties seems to be related to the UV+R<sub>H</sub> treatment and that this treatment is the one expected to induce collagen crosslinking, **Figure 28** presents individual comparisons obtained for the five studied patients with the UV+R<sub>H</sub> treatment. For each patient, an increase in the Young's modulus after UV+R<sub>H</sub> treatment was clearly observed. The mean increase in the Young's modulus values ranged between 1.3 and 7.1-fold ( $p < 0.0001$  for each patient) (**Figure 28**). These results suggest that the crosslinking procedure had a major effect on the elasticity of collagen fibrils within the diseased capsules. Thus, the crosslinking procedure increased the capsules tissue stiffness. It is worth noting that box plots also showed high variability on the Young modulus values obtained with UV and UV+R<sub>H</sub> (**Figure 27G**). This suggests that the treatment induces heterogeneity on the tissue elasticity, which seems to be completely random and did not reveal any anisotropic feature.



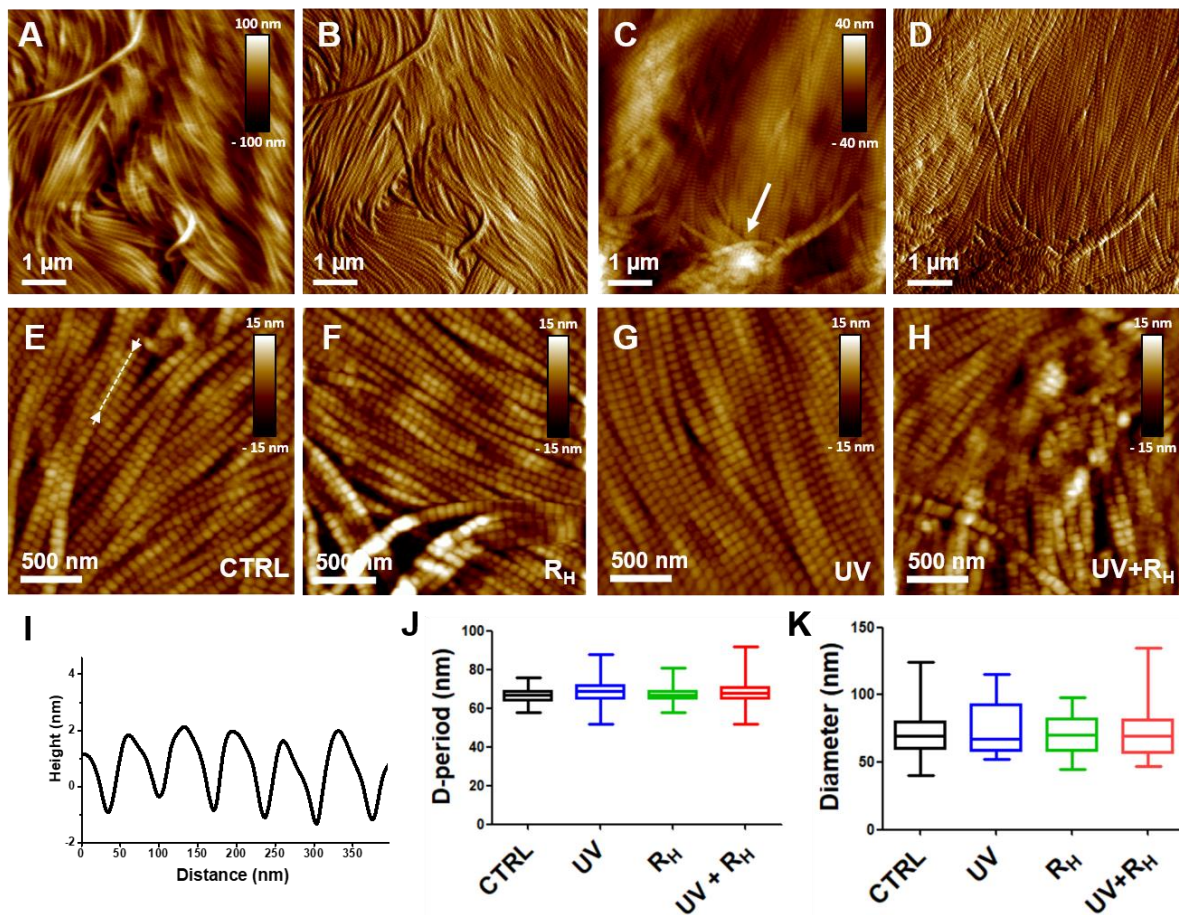
**Figure 28. Increase tissue stiffness of human capsules by crosslinking treatment.** Comparison of the quantification of Young's modulus obtained by AFM for the joint capsules in the two different conditions (Control in black and 2.5% Riboflavin + UV in red) and for five different patient (Box plots generated by pooling all of the data collected for at least three different elasticity maps per condition and for different regions of the tissue, \*\*\*p-value < 0.0001).

### 2.3.2. Increased capsule stiffness after crosslinking procedure

**Figure 29A** and **B** present AFM images recorded in the hydrated phases (close to physiological conditions), showing the typical morphology of native damaged capsules, *i.e.* prior to crosslinking treatments. The results show an alignment of the collagen fibrils. The collagen fibrils were adjacent to each other and had a similar diameter size. However, the recorded images did not allow the structure of individual fibrils, particularly their D-periodicity, to be enough resolved. This may be due to their mobility during imaging resulting on their interaction with the AFM tip, as commonly observed on adsorbed collagen layers<sup>531</sup> and collagen-based tissues.<sup>532</sup> In the dried phase (**Figure 29C** and **D**), the organization of these fibrils showed an alignment similar to that observed in the hydrated state, even if some disrupted fibrils could be observed (see arrow in **Figure 29C**). By contrast, the structure of individual collagen fibrils was well visible, which allowed statistical analyses of their characteristics to be performed in a reliable way.

AFM images were also recorded on capsules treated with UV, R<sub>H</sub> or with UV+R<sub>H</sub> (**Figure 29F-H**). Only the results for high concentration (2.5%) of riboflavin are presented, since similar results were obtained, whatever the concentration of riboflavin used. Results did not show noticeable effects on the whole morphology of the collagen fibrils, *i.e.* their adjacent and aligned features. Moreover, D-periods remained clearly visible on individual fibrils, regardless of the treatment used.

These qualitative observations suggest that individual collagen fibrils and their organization within the tissue were not greatly impacted by the treatments. To obtain quantitative information, the characteristics of collagen fibrils, namely, their mean diameter and D-period, were measured from high-resolution AFM images (**Figure 29E-H**). For this purpose, at least 100 lines scans were taken from different AFM images, for each treatment, and used to compute D-periodicity. Line scans were taken on individual collagen fibrils along its longitudinal axis. Control non-treated capsules showed well-defined D-periodicity measured at  $66.9 \pm 3.2$  nm (**Fig. 4E and J**), as broadly observed in type I collagen-based tissues.<sup>526,527,533</sup> This is clearly shown through the line scans taken along the fibril longitudinal axis (**Figure 29I**). Results show that the obtained mean values of the D-period were not affected by R<sub>H</sub> ( $67.1 \pm 3.1$  nm,  $p = 0.0517$ ) and UV+R<sub>H</sub> ( $68.2 \pm 5.04$  nm,  $p = 0.2668$ ) treatment and slightly affected by the UV ( $68.7 \pm 5.3$  nm,  $p \leq 0.001$ ) treatment (**Figure 29J**). Similarly, the mean values of the fibrils' diameter were similar in control ( $71.8 \pm 15.4$  nm), R<sub>H</sub> ( $69.6 \pm 14.1$  nm,  $p = 0.7090$ ), UV ( $74.1 \pm 18.4$  nm,  $p = 0.5940$ ) and UV+R<sub>H</sub> ( $74.1 \pm 20.7$  nm,  $p = 0.9937$ ) treated capsules, confirming the narrow size distribution of fibrils' diameter in the capsule (**Figure 29K**).

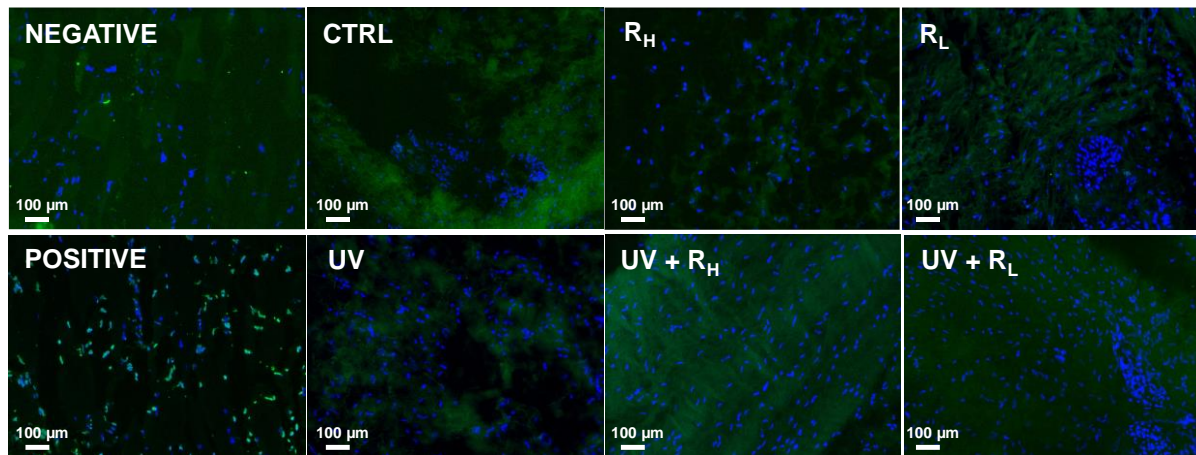


**Figure 29.** Atomic force microscopy analysis of human capsule structure. Representative AFM (A, C) height and (B, D) deflection images ( $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ , contact mode) recorded on untreated joint capsule in (A, B) PBS buffer or in (C, D) air. (E-H) High-resolution images recorded in air of the joint capsule (E) prior to and after (F) 2.5% Riboflavin (RH), (G) UV or (H) 2.5% Riboflavin + UV treatments (UV+RH). (I) Scan line taken at the location indicated by the arrows and dashed line in the image (E). (J, K) Box plots generated by pooling all of the data as a function of the treatment showing the evolution of (J) D-period and (K) mean diameter of individual fibrils.

Because UV and riboflavin treatments could induce cell death, the presence of apoptotic cells was investigated in treated and non-treated capsules by TUNEL assay (**Figure 30**). Dead cells appeared as bright green spots as shown in the positive control, whereas blue-fluorescent DAPI is used as a nuclear staining. No increase in cell death was observed after treatment by UV, riboflavin, or UV and riboflavin, whatever the concentration of riboflavin used.

These findings clearly indicate that the different treatments, particularly UV+RH did not alter the organization of collagen fibrils within the capsule, *i.e.* their adjacent and alignment features, and the characteristics of individual collagen fibrils, namely their D-period and mean diameter, nor induced apoptosis.





**Figure 30.** Absence of cell death induction by crosslinking treatment. Human articular capsules were treated or not (CTRL) by UV, 0.1% Riboflavin ( $R_L$ ), 2.5% Riboflavin ( $R_H$ ), UV + 0.1% Riboflavin (UV +  $R_L$ ) or UV + 2.5% Riboflavin (UV +  $R_H$ ) before TUNEL assay. No cell death was observed in negative control, whereas many apoptotic cells (green) were present in positive control. UV and riboflavin alone or in combination did not induced cell death. DAPI staining was used to check the location of the nucleus (blue).

## 2.4. Discussion

The treatment of shoulder instability by the classical surgery procedure is associated with a high risk of recurrence.<sup>514</sup> In patients with recurrent shoulder instability, the capsulolabral tissue is damaged by repetitive trauma.<sup>348</sup> In the present study, we show that a crosslinking procedure, using riboflavin and UV irradiation, had a major effect on the elasticity of collagen fibrils of human diseased shoulder capsules. The crosslinking procedure reinforced tissue stiffness without altering the characteristics of individual collagen fibrils (namely their D-period and mean diameter) and the organization of these fibrils, without increasing cell death.

Riboflavin was used here as a photosensitizer, which produces radicals within the tissue when exposed to UV irradiation, thus promoting collagen crosslinking. The mechanism by which riboflavin can induce the crosslinking of collagen molecules is described in the work of McCall et al., suggesting the existence of several pathways.<sup>534</sup> In particular, it requires the production of singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) that allows the formation of covalent bonds between (hydroxy)proline and histidine residues in adjacent chains.<sup>535</sup> On the other hand, UV irradiation, without riboflavin, may also produce radicals in tyrosine and phenylalanine residues, thus inducing the crosslinking of collagen molecules.<sup>536,537</sup> This may explain the increase of the stiffness when the tissue was exposed to UV, as shown in **Figure 27G** and confirmed in all patients (data not shown).

Extracellular matrix (ECM) is an essential structural and functional component of biological tissues. ECM accounts, indeed, for their morphological organization, confers them mechanical properties, and is a microenvironmental sensor for adherent cells. Accordingly, any alteration in the composition, the organization or the structure of ECM provokes deep changes in tissue mechanical properties and cell behavior. The control of the ECM stiffness is, thus, pivotal for tissue homeostasis. Moreover, ECM stiffness is commonly altered in numerous diseases, including solid cancers or cardiovascular diseases, and its control is of therapeutic interest.<sup>538</sup> Deciphering the ultra-structural organization of ECM and their mechanical properties is an important step to better understand the pathogenic processes of diseases associated with ECM remodeling and to propose new therapeutic options. In this context, AFM has been extensively used for probing collagen-based tissues,<sup>524–528,539</sup> including tendon,<sup>540</sup> cartilage<sup>521</sup> and bone.<sup>541</sup> AFM has shown its relevance to provide reliable information regarding their structural and mechanical properties, with the advantages of minimal sample preparation and ability to operate in physiological conditions. In the present study, AFM provided a relevant

way to characterize the collagen structure and stiffness in the joint capsule at the nanoscale. On the studied longitudinal cross-sections, our results show an alignment of fibrils in damaged joint capsules. The collagen fibrils were adjacent to each other, had a similar diameter size, and displayed the typical  $\sim 67$  nm D-period value for type I collagen. Interestingly, transmission electronic microscopy analysis of transversal cross-sections of the capsule did not reveal any significant difference in the mean diameter of collagen fibrils between normal and diseased capsules,<sup>348</sup> suggesting that shoulder instability does not affect the organization of collagen fibrils. Nevertheless, using a small angle light scattering technique, Debski et al.<sup>516</sup> showed that collagen fibers in the inferior glenohumeral ligament (IGHL) were not highly aligned, although small regions of localized alignment were found. Thus, the collagen organization at the micrometric scale suggests that IGHL is loaded in multiple directions. This random organization implies that during a capsular shift procedure, the ability of the IGHL to transfer loads across its entire insertion into the glenoid/labrum may be significantly altered.<sup>516</sup>

The random organization of collagen fibers supports the idea that global treatment of the capsule structure should be efficient to increase the efficiency of surgery. Thermal treatment of unidirectional instability is not performed anymore due to high recurrence rates and complications, including temporary nerve injuries that usually involve the sensory branch of the axillary nerve and rare thermal necrosis of the capsule.<sup>349</sup> A crosslinking procedure may achieve this goal. It has been routinely used in ophthalmology for decades.<sup>520</sup> In joint tissues, crosslinking protocols have been performed on tendons,<sup>542</sup> but has not been proposed for capsules yet, to the best of our knowledge. Enzymatic crosslinking protocols affect the whole tendon function, increasing failure load of individual collagen fibrils that paradoxically yield diminished tissue-failure properties.<sup>542</sup> However, contradictory reports have inconsistently correlated crosslink density to tissue stiffness.<sup>542</sup> Our results on the shoulder capsule show that the crosslinking procedure increased mechanical stiffness without modifying the structure and the morphology of collagen fibrils within the damaged capsules and without inducing immediate cell death. Such a capsular modification could be indicated in complement of shoulder stabilization for anterior or posterior instability and could be also useful for patients with very painful multidirectional instability, with or without connective tissue disorders like Ehlers Danlos patients<sup>543</sup>. In addition, crosslinking treatment of the global capsule, increasing its stiffness, may be efficient for patients with abnormally high laxity like hyperlaxity spectrum disorder diseases, such as Ehlers Danlos or Marfan syndrome.

Some limitations emerge from our study. Although we show the effect of UV and riboflavin treatment on tissue stiffness, it is still unknown whether the elastic modulus obtained after crosslinking is comparable with healthy tissue. Moreover, further investigations are needed to identify the clinically relevant conditions for crosslinking treatment. Before starting clinical studies, the long-term efficacy and safety of crosslinking, the combination modality of crosslinking and surgery, the outcomes after crosslinking two or more times, and the efficacy and complications of crosslinking procedures with UV need to be determined.<sup>520</sup> In addition, the effect of UV irradiation and riboflavin was analyzed on small tissue samples due to the small size of the capsule harvested during the surgical procedure. The efficiency of the treatment in the depth of the capsule has not been studied; the question, clearly, deserves further investigation.

## **2.5. Conclusion**

Glenohumeral joint instability is a frequent disorder of young sportive patients. Its treatment by classical surgical procedures is not efficient and is associated with recurrence. In the present study, we used a crosslinking treatment based on a combination of UV irradiation and riboflavin to reinforce the tissue, which was mainly constituted of type I collagen fibrils. For this purpose, human articular capsules were collected from different patients undergoing shoulder surgery. Results show that the crosslinking procedure changed the biomechanics of diseased capsules by increasing the tissue stiffness while keeping their structural organisation unchanged, and without inducing any significant cell death. Accordingly, the UV/riboflavin crosslinking procedure is a promising way to preserve the functions of collagen-based tissues and to tune their elasticity for clinically relevant experimentation.

# **Chapitre 3**

## **Décryptage du remodelage pathologique de la matrice extracellulaire du cartilage humain dans l'arthrose**

—

### **Caractérisation au niveau supramoléculaire**

---

L'arthrose, maladie musculosquelettique la plus fréquente, se caractérise, entre autres, par une dégradation irréversible du cartilage articulaire. Cette dégradation est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déséquilibrent l'homéostasie du cartilage.

L'homéostasie du cartilage est assurée par les chondrocytes. Or l'activité métabolique de ces derniers dépend des conditions structurelles, chimiques et mécaniques environnantes. Il existe donc une relation étroite entre les cellules et la matrice, puisque cette dernière protège les chondrocytes tout en stockant et transmettant les informations biologiques nécessaires à leur bon fonctionnement, *e.g.* stimuli chimiques et mécaniques. Au cours de l'arthrose, l'ECM du cartilage articulaire qui se compose essentiellement de fibrilles de collagène hétérotypiques de type XI/II/IX et d'agrégats d'agrecane, est sujette à un remodelage pathologique aboutissant *in fine* à la disparition du tissu. Si les mécanismes moléculaires impliqués dans le remodelage pathologique de l'ECM sont considérés comme déterminants, ils ne sont cependant pas encore complètement élucidés.

Dans ce chapitre, nous avons utilisé l'XPS et l'AFM pour étudier, respectivement, la composition, la structure et les propriétés mécaniques du cartilage humain à différents degrés de sévérité d'arthrose. Une méthodologie développée pour l'interface bio-organique/inorganique et adaptée au cartilage articulaire a été utilisée pour extraire les informations chimiques fines des données XPS.

Ce travail fait l'objet d'un article accepté pour publication le 09/05/2022 — Nanoscale Journal, Royal Society of Chemistry

---

# **Deciphering pathological remodeling of human cartilage extracellular matrix in osteoarthritis at the supramolecular level**

Ilhem Lilia Jaabar<sup>a,b</sup>, Pauline Cornette<sup>a,b</sup>, Antoine Miche<sup>a</sup>, Kristell Wanherdrick<sup>b</sup>, Vincent Dupres<sup>c</sup>, François-Paul Ehkirch<sup>d</sup>, Adeline Cambon Binder<sup>b,e</sup>, Francis Berenbaum<sup>b,f</sup>, Xavier Houard<sup>b</sup>, Jessem Landoulsi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface, LRS, F-75005 Paris, France

<sup>b</sup> Sorbonne Université, INSERM (UMR\_S938), Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, F-75012 Paris, France

<sup>c</sup> Université Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017 - CIIL - Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000, Lille, France

<sup>d</sup> Clinique Maussins-Nollet, F-75019 Paris, France

<sup>e</sup> Orthopedics and Hand Surgery Department, Saint-Antoine Hospital, 184 Rue du Faubourg Saint-Antoine, Paris, 75012, France

<sup>f</sup> Rheumatology Department, AP-HP Saint-Antoine Hospital, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012, Paris, France

## Abstract

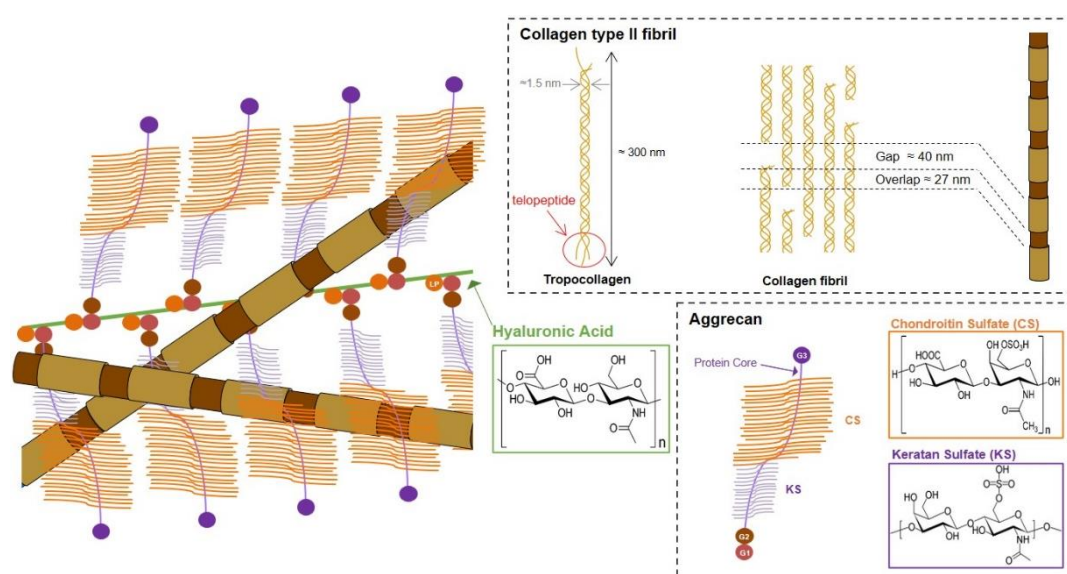
The extracellular matrix (ECM) of articular cartilage is a three-dimensional network mainly constituted of entangled collagen fibrils and interfibrillar aggrecan aggregates. During the development of osteoarthritis (OA), the most common musculoskeletal disorder, ECM is submitted to a combination of chemical and structural changes that play a pivotal role in the initiation and the progress of the disease. While the molecular mechanisms involved in the pathological remodeling of ECM is considered as decisive, it remains, however, not completely elucidated. Herein, we report a relevant way to unravelling the role and nature of OA progress on human cartilage tissues, in terms of chemical composition, morphological and mechanical properties at the level of the supramolecular assemblies constituting cartilage ECM. For this purpose, we use X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and develop an innovative methodological approach that provides a molecular composition of the ECM. Moreover, we use atomic force microscopy (AFM) to probe the tissues at the level of individual collagen fibrils, both imaging and force spectroscopy modes being explored to this end. Taken together, these nanoscale characterizations reveal the existence of two stages in the OA progress. At early stage, a marked increase in the aggrecan and collagen content is observed, reflecting the homeostatic chondrocyte activity that tends to repair the cartilage ECM. At late stage, we observe a failed attempt to stabilize and/or restore the tissue, yielding significant degradation of the supramolecular assemblies. This suggests an imbalance in the chondrocyte activity that turns in favor of catabolic events. Chemical changes are also accompanied by ECM structural changes and stiffening. Interestingly, we showed the possibility to mimic the imbalanced activities of chondrocytes by applying enzymatic digestions of healthy cartilage, through the combined action of hyaluronidase and collagenase. This yields damages strictly analogous to that observed at high OA severity. These findings bring mechanistic insights leading to a better understanding of the mechanism by which OA is initiated and progress in the cartilage ECM. They offer guidelines for the development of curative treatments, such as targeting the homeostatic balance of chondrocyte metabolism through the control of enzymatic reactions involved in catabolic processes.

**Keywords:** cartilage, collagen, aggrecan, X-ray photoelectron spectroscopy, atomic force microscopy, osteoarthritis



### 3.1. Introduction

The human articular cartilage is a 2-4 mm thick smooth tissue covering the ends of long bone in the synovial joints. Its main role is to reduce friction and withstand significant loads during motion.<sup>259</sup> It is an avascular and aneural tissue containing a relatively small proportion of chondrocytes (about 4% wt.), compared to other connective tissues.<sup>259,544</sup> These highly specialized cells are responsible for the synthesis and regulation of the extracellular matrix (ECM) components. The ECM of the articular cartilage contains a significant amount of water (ca. 65-85 wt.%), and is mainly composed of type II collagen fibrils (ca. 20–30 wt.%) and negatively charged aggrecans (ca. 10-15 wt.%) organized in a peculiar three-dimensional network.<sup>248,249,258</sup> Type II collagen is secreted by the chondrocytes in the form of soluble tropocollagens composed of three identical alpha chains (triple-helix) stabilized *via* direct interchain hydrogen bonds and inter- and intra-chain water-mediated hydrogen bonds. Tropocollagens self-assemble into fibrils through a cell-mediated regulation process that involves both intermolecular interactions and covalent bonds.<sup>545</sup> Aggrecans, the most abundant proteoglycans in the cartilage, consist of anionic sulfated glycosaminoglycans (GAGs), chondroitin sulfate (CS) and keratan sulfate (KS), covalently bound to a core protein backbone. Aggrecans only exist as aggregate within the ECM,<sup>262</sup> *i.e.* they are noncovalently attached to another long GAG chain, hyaluronic acid (HA), via a “link protein” to form larger aggrecan aggregate (**Figure 31**). The latter occupies the interfibrillar space and draw water into the tissue, generating an osmotic swelling pressure that is counterbalanced by the tensile strength of collagen fibrils.



**Figure 31.** Schematic illustration of the main constituents and their supramolecular organization in the extracellular matrix of cartilage (Abbreviations. LP: link protein, G1/G2/G3: globular domain).

Thus, the interplay of these two supramolecular assemblies, collagen fibrils and aggrecans, confers to the articular cartilage the remarkable biomechanical properties required for the articulation motion.<sup>259</sup>

The composition of the cartilage ECM is maintained by chondrocytes homeostatic balance between catabolic and anabolic events, which involves the control of proteoglycan turnover, while type II collagen seems to be little concerned.<sup>546</sup> Over time, articular cartilage is submitted to small variations in terms of composition and structure due to the normal joint wear. While the crosslinking of collagen fibrils increases with the age, due to an accumulation of advanced glycation end products,<sup>547,548</sup> aggrecan aggregates are submitted to changes due to synthetic and degradative events related to ageing. The matrix turnover seems to be less efficient with ageing, resulting in the modification of aggrecan structure and the formation of smaller aggregates.<sup>262,549</sup> Moreover, the gradual loss of aggrecans with age seems to influence the fibrillar structure of collagen, yielding collagen fibrils, which are more bundled to each other.<sup>509</sup> Age-related changes in the composition and structure of the aggrecans and collagen impact the mechanical properties of the articular cartilage, resulting in a matrix stiffening,<sup>399,509</sup> and cause degenerative joint diseases, such as osteoarthritis (OA).

OA is the most common musculoskeletal disorder.<sup>550</sup> OA is a whole joint disease, mainly characterized by an irreversible loss of the articular cartilage due to the degradation along two axes: the erosion of the surface and the abnormal reactivation of the endochondral ossification at depth resulting in the advancement of the mineralization front into the articular cartilage.<sup>369</sup> Changes in the ECM composition and structure are decisive in the development and the progression of OA,<sup>551,552</sup> however the molecular mechanisms involved in the pathological remodeling are still not completely elucidated. In particular, the precise composition of ECM in terms of supramolecular compounds, the building blocks of the tissue, is difficult to determine. Indeed, common procedures are based on biochemical methods, which requires the digestion of the tissue, so that the global supramolecular structure is not preserved. As an alternative, immunohistology, or other label-free characterization techniques, including infrared<sup>464</sup> and near-infrared spectroscopies,<sup>553</sup> second harmonic generation<sup>461</sup> and Raman spectroscopy<sup>473</sup> can be used to probe cartilage ECM. However, all these techniques can only probe changes in a semi-quantitative way.

For this purpose, we use, herein, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), which is particularly relevant to explore interfaces of biological interest,<sup>489,490</sup> including biomaterials,<sup>552</sup> protein layers<sup>491–493</sup> and microorganisms,<sup>494,495</sup> but has never been used for the characterization of soft biological tissues. Importantly, this technique provides reliable chemical composition at nanoscale resolution in the direction perpendicular to the surface plane, and offers a good selectivity towards biomacromolecules. Complementary investigations regarding structural changes and mechanical properties were performed by atomic force microscopy (AFM), which is extensively used to probe biological systems, including musculoskeletal tissues.<sup>258,506,509,510,554</sup> In the present study, human samples, comprising an articular cartilage layer and the underlying subchondral bone from the external tibial plateau, were collected from seven OA patients and one healthy patient to investigate the remodeling of the articular cartilage at different stages of OA.

The characterization of cartilage at the level of individual collagen is crucial to decipher the remodeling events that the ECM undergoes and their impact in terms of composition, supramolecular organization and compliance. This provides unique insights regarding the fate of the macromolecular assemblies constituting the cartilage ECM, particularly during OA progression.

## 3.2. Materials and methods

### 4.2.1. Authorization

Human OA knee explants were obtained from 7 patients undergoing total knee joint replacement surgery for OA in the Maussins-Nollet Clinic (Paris, France). Informed consent was obtained from each patient on the day before the arthroplasty. Experiments using human samples were approved by two French Institutional Review Boards (Comité de Protection des Personnes Ile de France V; Comité Consultatif sur le Traitement de l'information en Matière de Recherche). Human healthy knee explants were obtained from one individual who had donated his body to the School of Surgery of the Assistance Publique - Hôpitaux de Paris after acceptance of the project by the scientific direction. Written informed consent had prior been given in the lifetime of the individual. Donors body had not been prepared or frozen.

### 4.2.2. Osteoarthritic human samples preparation

The procedure of sample preparation and characterization is summarized in **Figure 32**. The samples were taken from the external tibial plateau using a punch with a diameter of 4 mm. Each sample consisted of an articular cartilage layer and the underlying subchondral bone. Samples were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, Merck) for 24 h, washed with ultrapure water (MilliQ, Millipore) and decalcified in 14% ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution (EDTA, VWR). Unless stated elsewhere, samples were then embedded in tissue freezing medium (OCT, Leica Biosystems) compound and stored at -80°C until its cryosectioning. For surface characterizations (XPS and AFM), the osteochondral samples were cryosectioned at a thickness of 14 µm and deposited on glass slides.

### 4.2.3. Evaluation of OA grade by histology

Tissues were cryo-sectioned at a thickness of 7 µm and stained with Safranin O/Fast Green to assess articular cartilage histomorphology and sulfated GAG content. Mankin score<sup>427</sup> was determined on the stained tissues by two independent evaluators. OA samples were classified into three groups based on their Mankin score groups: the group ‘Low’ (scores 1 – 4) represents articular cartilage with superficial lesion, the group ‘Moderate’ (scores 5 – 9) includes samples with a thinner cartilage showing fissures and loss of histochemical aggrecan staining, and the group ‘High’ (scores 10 – 14) refers to samples with severe damage and fissuring that reaches the subchondral bone. In this case, the cartilage becomes totally eroded and the subchondral bone is partially uncovered. (**Figure S1**)

#### 4.2.4. *Enzymatic treatment*

Limited enzymatic digestion was performed on cryosectioned healthy osteochondral samples. Cryosections of healthy tissues were incubated in 24-well tissue culture plate in 500  $\mu$ L of hyaluronidase (2 mg/ml in PBS, Merk), collagenase (2 mg/ml in PBS containing  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Merk) or hyaluronidase/collagenase solutions for 24h at 37°C in the dark. For the latter condition, samples were first treated with hyaluronidase (2 mg/ml, Merk) for 24h, and then incubated in collagenase solution (2mg/ml, Merk) for 2 h at 37°C in the dark. After treatment, tissues were washed 3 times with water and stored at -20°C.

#### 4.2.5. *X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)*

XPS analyses were performed using an ESCA+ spectrometer (Omicron Nano-Technology) equipped with a monochromatized aluminum X-ray source (powered at 20 mA and 14 kV) and a MCD 128 channeltron detector. Charge stabilization was ensured using a CN10 device with an emission current of 5.0  $\mu$ A and a beam energy of 0.30 eV. Analyses were performed in sweep mode; the resulting analyzed area was about 1 mm in diameter. A pass energy of 20 eV was used for narrow scans. Under these conditions, the full width at half-maximum (FWHM) of the Ag 3d<sub>5/2</sub> peak of a clean silver reference sample was about 0.6 eV. The pressure in the analysis chamber was approximately 10<sup>-10</sup> Torr. The introduction of the sample in the analysis chamber did not induce any significant increase of the pressure due to sample degassing. The photoelectron collection angle,  $\theta$ , between the normal to the sample surface and the analyser axis was 45°. A laser beam allowed to point and analyse the three zones of interest: the upper zone located near the cartilage surface, the middle zone and the deep zone located near the tidemark. The following sequence of spectra was recorded: survey, C 1s, N 1s, O 1s, S 2p, Si 2p, Zn 2p, Na 1s, Ca 2p, P 2p, Ti 2p, K 2p and C 1s again to check for charge stability as a function of time and the absence of sample degradation. XPS peaks were referenced to the C 1s component due to carbon bound to only carbon and hydrogen at 284.8 eV. The data treatment was performed with CasaXPS software (Casa Software Ltd., Teignmouth, U.K.). The peaks were decomposed using a linear baseline and a component shape defined by the product of a Gaussian function and a Lorentzian function in a 70:30 ratio. Molar fractions were calculated using peak areas normalized according to Scofield factors.

#### 4.2.6. Atomic force microscopy (AFM)

AFM images were recorded using a commercial AFM (NanoScope VIII MultiMode AFM, Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA.). Glass slides, on which the osteochondral samples were cryo-sectioned, were fixed on a steel sample puck using adhesive tape. Images were recorded in ambient conditions at room temperature ( $\sim 22$  °C). Oxide-sharpened microfabricated  $\text{Si}_3\text{N}_4$  cantilevers were used (SNL-10, Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA.). The spring constants of the cantilevers were measured using the thermal noise method, yielding values ranging from 0.11 to 0.14 N/m and the tip radius used was lower than 10 nm (manufacturer specifications). Images were recorded in contact mode at a scan rate equal to 1 Hz.

Force-distance curves were recorded in PBS buffer at room temperature using microfabricated  $\text{Si}_3\text{N}_4$  cantilevers (MLCT from Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA.). The spring constants of the cantilevers were measured using the thermal noise method, yielding values ranging from 0.027 to 0.063 N/m. The deflection sensitivity was calibrated by recording the response of the cantilever on a silicon wafer substrate, considered as an infinitely stiff surface. The curvature radius of silicon nitride tips was about 20 nm (manufacturer specifications). The same tip was used for all the measurements on no OA, OA and treated cartilages, without modification of the parameters, which removes the variability that one could otherwise have between degradation stage. A visual control of the tissue was performed using the optical microscope coupled with the AFM instrument to verify tissue integrity and define an area of interest. All force curves were recorded by applying a 1 nN force trigger with a 1  $\mu\text{m}$  ramp size and approach/retraction velocities of 2  $\mu\text{m}/\text{s}$ . For each sample, force-distance curves were acquired at least on three zone of the cartilage (superficial, middle and deep zone). For each zone (2  $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ ), curves were recorded with a force volume parameter set to 16 by 16 pixels for 3 areas, resulting in a minimum of 2300 curves per sample. The data treatment was performed with an in-house pyAF (python Atomic Force) software, version 1.5.1. To detect the point of contact on the force curves, a linear fit was made using the baseline of the approach curve. A noise threshold is used to shift the fit along the force axis. The noise parameter can be manually adjusted by the user to optimize the detection of the point of contact. The position of the contact point is determined by the intersection between the force curve and this shifted fit. Subsequently, the stiffness was deduced from the Young's modulus which was determined from the indentation portion of the curve using the elastic contact model for pyramidal indenters (named Bilodeau model<sup>555</sup>), using the following equation:

$$F = \frac{3 E \tan \alpha}{4 (1-\nu^2)} \delta^2 \quad (5)$$

where F is the measured force, E the elastic modulus,  $\alpha$  the face angle of the pyramid,  $\delta$  the indentation depth, and  $\nu$  the sample's Poisson's ratio, that was set to 0.5, which correspond to an incompressible material. Box plots were generated by pooling all the data from the Young's modulus maps as a function of the condition and patient.

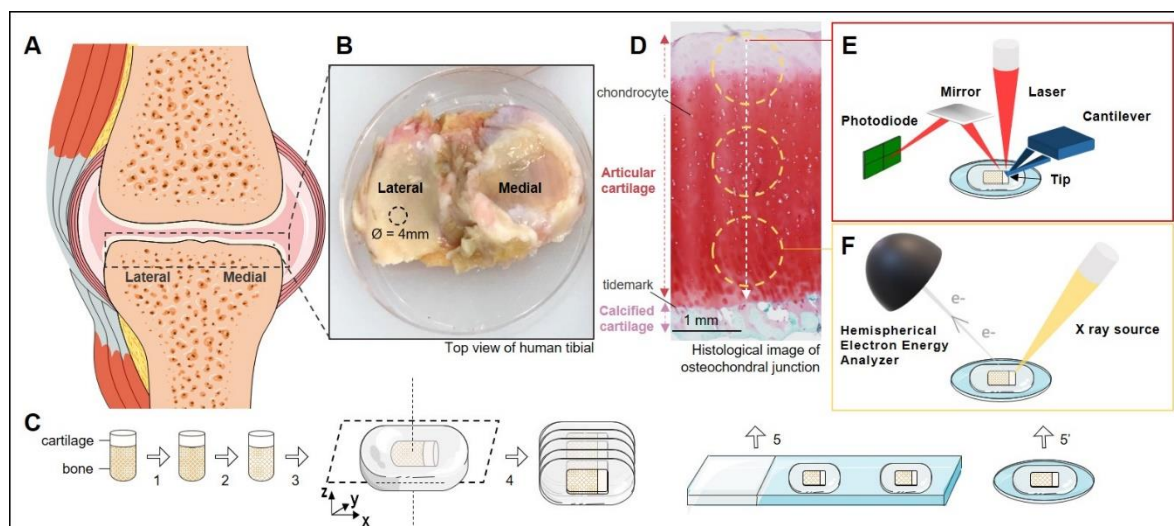
#### 4.2.7. *Statistical Analysis*

Shapiro-Wilk normality test was performed with GraphPad Prism 5 software. If the tested data groups passed normality test successfully, an unpaired t test was performed to compare the concentration ratios (XPS analysis) or collagen structural characteristics (AFM analysis) between different OA scores. If data didn't follow a normal distribution, a Mann Whitney test was thus performed. In a similar way to OA human samples, if the tested data groups passed normality test successfully, a paired t test was performed to assess the cartilage composition with enzymatic treatment (XPS analysis) or the collagen diameter variation with healthy cartilage (AFM analysis). If data didn't follow a normal distribution, a Wilcoxon test was thus performed.

### 3.3. Results

#### 4.3.1. Tissue chemical composition

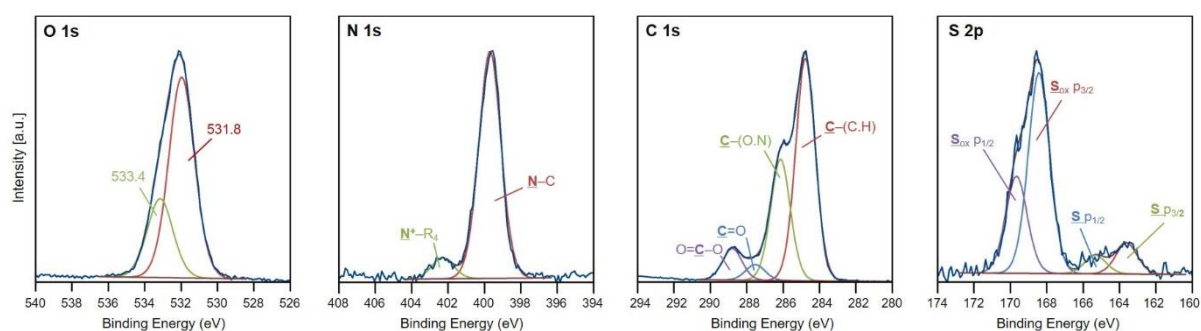
The chemical composition of cartilage samples was investigated by XPS. For this purpose, samples were taken from the external (lateral) tibial plateau using a punch with a diameter of 4 mm (**Figure 32A, B**). Analyses were performed at two osteochondral samples, cryosectioned at different depths (following the axis parallel to the tidemark which delimitates non-calcified from calcified cartilage, see **Figure 32C**, step 4) and on three locations on the same osteochondral sample, (following the axis perpendicular to the tidemark, see **Figure 32C**, step 5, and **Figure 32D**). Accordingly, for each patient, XPS analyses were performed on six different locations of the cartilage. In addition to XPS, AFM imaging was performed on the same number of samples at different locations, as depicted in **Figure 32** (see panels D-F). As the sample preparation procedure includes several steps (**Figure 32C**), the effect of the different treatments was, first, investigated to assess their possible impact on the composition of the articular cartilage. To this end, five adjacent osteochondral samples were taken from the external tibial plateau of the same patient, , and were submitted to the treatments detailed in **Table 5**.



**Figure 32.** Osteoarthritic human samples preparation. (A) Illustration of the synovial joint structure showing articular cartilage and bone. (B) Macroscopic view of the knee tibial lateral and medial plateau. (C) The samples were taken from the external tibial plateau using a punch ( $\varnothing = 4$  mm). Once the sample taken, it was fixed (1) and decalcified (2). The treated tissue was then embedded and stored (3). For evaluation of OA grade by histology and surface characterizations the osteochondral samples were cryo-sectioned (4) and deposited on glass slides (5). (D) Mankin score was determined on the Safranin O/Fast Green stained tissues. (E, F) Atomic force microscopy (AFM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were used to probe, respectively, the morphology and the composition of human cartilage samples at different OA scores. Areas analysed by each techniques, (E) AFM and (F) XPS, are roughly delimited in panel D.



**Figure 33** presents typical O 1s, N 1s, C 1s and S 2p peaks recorded on a cartilage sample. In the studied conditions, the technique probes the tissue at a depth of *ca.* 6 nm following the direction perpendicular to the surface plane (see details in Supplementary Information, **Table S1** and **Table S2**). As the binding energy of photoelectrons is influenced by the electron density on the atom, the shape of the peaks results, indeed, from the superposition of components that are typical of the chemical functions in which the atom is involved. As a consequence, the decomposition of these peaks provides information on the chemical nature of the organic compounds and offers some selectivity in the analysis of the biological tissue. This is particularly important for the discrimination between adventitious organic contaminants and biocompounds of interest. These peaks were decomposed on the basis of previous works with constraints ensuring the consistency required to make quantitative comparison between samples.<sup>489,498</sup> The imposed constraints, the assignment of the components to chemical functions and details regarding peak components (binding energy, FWHM) are detailed in Supplementary Information.



**Figure 33.** Representative O 1s, N 1s, C 1s and S 2p peaks recorded on a cartilage sample prepared using the F-d procedure, i.e. by performing PFA fixation, subsequent demineralization and inclusion in OCT.

The methodology used here is based on the approach developed for interfaces of biological interest.<sup>489,496–498</sup> C 1s peak can be confidently decomposed into four contributions: (i) a component at 284.8 eV due to carbon only bound to carbon and hydrogen [C-(C,H)], (ii) a component at about 286.1 eV due to carbon bound to oxygen or nitrogen [C-(O,N)], including alcohol, peptidic link, acetal or hemiacetal, (iii) a component at about 287.5 eV due to carbon making one double bond [C=O] or two single bonds with oxygen [O-C-O], including peptidic link, acetal and hemiacetal in GAGs, and finally (iv) a component near 288.9 eV due to carboxylic acid and ester (O=C-O). All components were constrained to have the same FWHM.

In contrast to C 1s peak, the decomposition of the O 1s peak is less reliable, owing to the presence of a series of very near components. **Figure 33** shows a tentative decomposition in two components, the FWHM of which were imposed to be equal. The first one at about 531.8

eV may be due to [C=O] bonds in amide and carboxyl groups, or O atoms of carboxylate. The second component, at about 533.4 eV, may be attributed to oxygen singly bound to carbon ([C-O-H] of alcohol and carboxyl, or [C-O-C] of ether and ester).

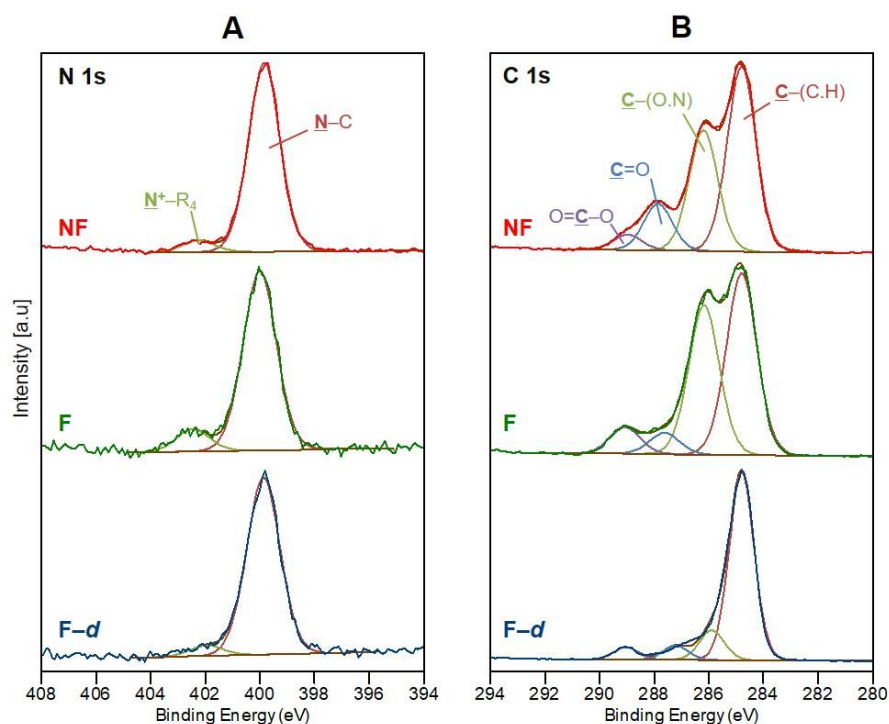
The N 1s peak showed a main contribution at about 399.8 eV, attributed to amide in peptidic link or amine (N-C), in some cases a minor contribution near 401.5 eV, attributed to protonated amine, is observed as well as a small component at higher binding energies, at 402.4 eV attributed to quaternary amine, which may be due to phospholipids present on the cell membranes.

The S 2p peak was decomposed into a well-defined single doublet (Figure 33). A ratio of 2:1 was imposed between the intensities of S 2p<sub>3/2</sub> and S 2p<sub>1/2</sub> components. The binding energy position of S 2p<sub>3/2</sub> component, *ca.* 163.7 eV, can be assigned to thiols (-S-H) or disulfide (-S-S-) chemical groups present in proteins, while the one at *ca.* 168.6 eV is due to oxidized sulfur species (S<sub>ox</sub>), namely sulfates which may be present in proteoglycans. Peaks assignment are summarized in Table S3 (Supplementary Information).

The effect of the different treatments used for sample preparation (Table 4) was investigated on the same patient, as described above. Figure 34 shows typical changes in the peak shapes as a function of the procedure used for sample preparation. This is particularly noticeable in the C 1s peak showing a decrease in the component due to [C-(O,N)] to the respect of [C-(C,H)] for the sample submitted to a PFA fixation followed by a demineralization procedure (compare NF to F-*d* samples Figure 34). The molar concentration of the different elements detected by XPS on the cartilage tissue are given in Table S4 (Supplementary Information).

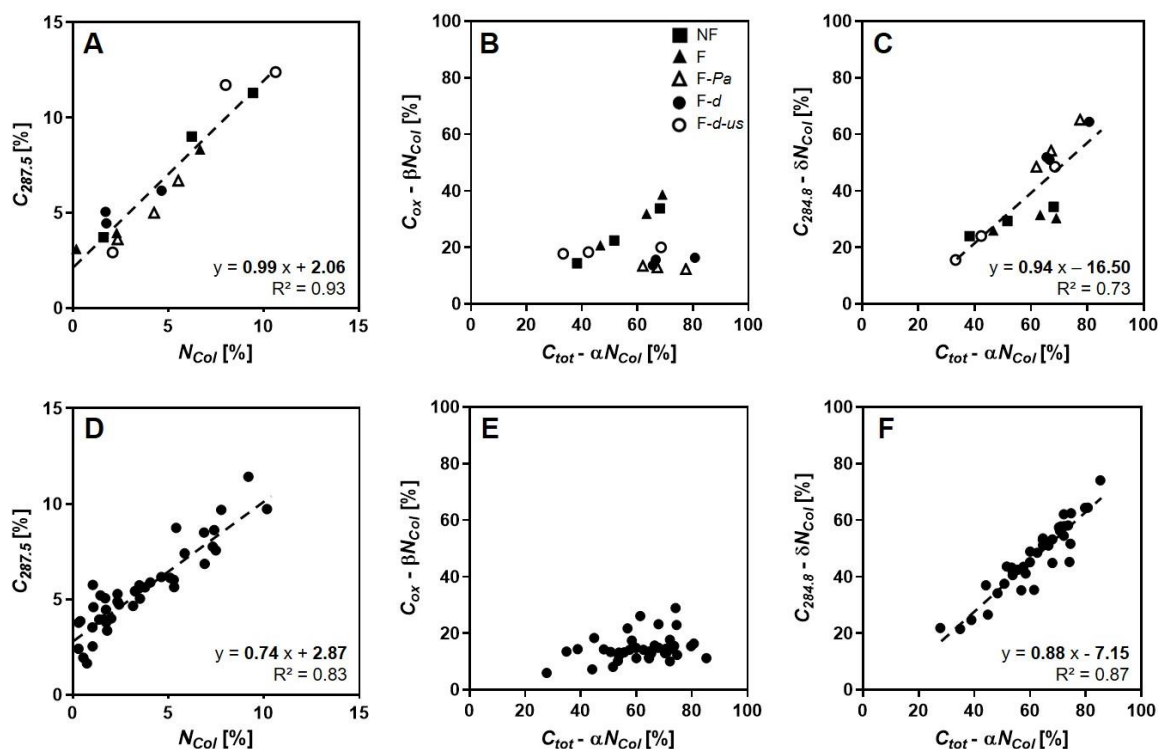
**Table 5.** Procedures used for the preparation of human cartilage samples.

SAMPLE	TISSUE TREATMENT				
	Fixation		Demineralization		Embedding
	PFA (F)	EDTA (d)	Ultrasonic Treatment (us)	OCT	Paraffin (Pa)
NF	–	–	–	x	–
F	x	–	–	x	–
F- <i>d</i>	x	x	–	x	–
F- <i>d-us</i>	x	x	x	x	–
F- Pa	x	–	–	–	x



**Figure 34.** Representative (left) N 1s and (right) C 1s peaks recorded on native cartilage sample (NF), as such or further submitted to PFA fixation (F) and subsequent demineralization (F-d).

The consistency of spectral data, generated through elemental quantification and peak decomposition, could be evaluated by means of simple statistic correlations if meaningful number of samples is available. The consistency essentially concerns biochemical compounds of interest (proteins, GAGs, HA) and organic adventitious contamination, mainly originating from sample preparation, ambient atmosphere and even XPS spectrometer.<sup>498</sup> **Figure 35** presents plots of the molar concentrations associated with different components, where the name of an element (*C*, *N* or *S*) designates its concentration and the number in subscript designates the binding energy of the peak component (*e.g.*  $C_{284.8}$  is the concentration of the component at 284.8 eV corresponding to  $[C-(C,H)]$ ). **Figure 35A** shows the plot of  $C_{287.5}$  vs the concentration of nitrogen due to proteins ( $N_{protein} = N_{399} + N_{401} \approx N_{Col}$ ), type II collagen being the dominating protein in the cartilage ECM.<sup>248</sup> The regression line, computed by considering all the samples submitted to the different treatments, showed a slope of 0.99, which is close to the value expected for type II collagen (0.89, **Table S6**, Supplementary Information). In this graph, the exclusive presence of aggrecans or hyaluronic acid would give slopes equal to 2.26 (**Table S14**) or 3.00 (**Table S16**), respectively. This result supports the consistency of data extracted from peak decomposition and indicate that  $N_{Col}$  is mainly due to proteins dominated by collagen.



**Figure 35.** Correlations between the indicated sums of molar concentrations measured by XPS. (A-C) Cartilage samples (from the same patient) were submitted to different treatments: native (NF, ■), PFA fixation (F, ▲), EDTA demineralization for several days (F-d, ●), or EDTA demineralization using ultrasonic treatment (F-d-us, ○), OCT or Paraffin embedding (F-Pa, △). (D-F) Data corresponding to cartilage samples from seven different patients. Dashed lines indicate regression lines with their corresponding equations.

**Figure 35B** and **C** address the distribution of carbon among different functional groups, all corrected for the contribution of protein, showing the plots of  $C_{ox} - \beta N_{Col}$  vs  $C_{tot} - \alpha N_{Col}$  and  $C_{284.8} - \delta N_{Col}$  vs  $C_{tot} - \alpha N_{Col}$ ,  $C_{ox}$  is the concentration of carbon in all oxidized forms ( $C_{ox} = C_{286.1} + C_{287.5} + C_{288.9}$ ),  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  factors are the  $C_{tot}/N_{Col}$ ,  $C_{ox}/N_{Col}$  and  $C_{284.8}/N_{Col}$  molar ratios, respectively, computed on the basis of amino acid amount and composition of type II collagen (**Table S5** and **Table S6**, Supplementary Information). These plots showed that, if the contribution of protein is subtracted, the concentration of carbon in all oxidized forms ( $C_{ox} - \beta N$ ) did not show any systematic variation as a function of the total carbon concentration (**Figure 35B**). The values are mostly ranging from 10 to 20%, except for one native (NF) and two fixed (F) cartilage samples. In contrast, carbon only bound to carbon and hydrogen ( $C_{284.8}$ ) was the dominating form and its concentration showed a linear relationship with total carbon concentration (**Figure 35C**). Thus, the variation of the total carbon concentration is mainly due to hydrocarbon compounds, suggesting that they are originating from adventitious contaminants. Similar trend was, indeed, observed on a variety of proteins adsorbed on solid

surfaces.<sup>498</sup> It originates from surface contamination by adsorption of organic compounds, which is an ubiquitous phenomenon in common environmental conditions, including when samples are submitted to further wet treatments. The method detailed above is a way to improve the selectivity of XPS analysis to cope with contamination. Importantly, these findings indicate that the composition of the cartilage ECM is not strongly impacted by the different treatments carried out for sample preparation, including fixation, embedding and demineralization. The major variations come essentially from adventitious contaminants, which are mainly due to the adsorption of hydrocarbon compounds, while the oxidized forms of carbon ( $C_{ox}$ ) remain at relatively low concentration. Furthermore, no noticeable effect was observed on the morphology of cartilages submitted to the different treatments carried out for sample preparation (**Figure S2**, Supplementary Information).

All the osteochondral samples taken from the different studied OA patients ( $n = 7$ ) were prepared by performing PFA fixation, subsequent demineralization for 3 months and embedding in OCT (F-d procedure). Demineralization preserves the integrity of the cartilage/bone interface during the sample cutting, avoiding damage to the deep cartilage zone by tearing apart the tissue at the tidemark. OCT embedding keeps the tissue in its hydrated state.

Plots analogous to **Figure 35A-C** were made using XPS data recorded on different samples from seven OA patients (**Figure 35D-F**). Interestingly, results showed an excellent agreement between the variation of the concentrations of nitrogen due to proteins ( $N_{Col}$ ) and of carbon attributed to peptidic links ( $C_{287.5}$ ) (**Figure 35D**). Moreover, the variations of carbon among different functional groups (Figure 35E and F) revealed the same trend observed above, *i.e.* for samples submitted to different treatments (see **Figure 35B** and **C**). Carbon, not due to proteins (collagen II), is of hydrocarbon nature in a defined proportion of ~88%, which is close to the values reported for adventitious contamination on adsorbed protein layers.<sup>498,556</sup>

The trends in surface composition appear more clearly if they are summarized in terms of concentration of model macromolecular compounds. Based on a detailed analysis of the literature, a model describing the ECM composition is proposed (see section S2. in Supplementary Information). The model assumes that cartilage ECM is essentially composed of collagen (Col), aggrecan (Agg) and hyaluronic acid (HA). The molecular compositions were determined for each compound and chemical functions were identified to be used as specific markers for the macromolecule of interest (**Table S5-Table S16**, Supplementary Information). By combining experimental data (from XPS analysis) and theoretical considerations, based on

reasonable assumptions regarding the ECM composition model, a surface macromolecular composition of the articular cartilage can be determined. Four main compounds were, thus, considered: collagen (Col), aggrecan (Agg), hyaluronic acid (HA) and other organic compounds (Oth), which represent lipids in cells and adventitious contaminants, both mainly consisting of hydrocarbon-like compounds.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma_{Col}$  factors are the  $C_{tot}/N_{tot}$ ,  $C_{ox}/N_{tot}$ ,  $C_{284.8}/N_{tot}$  and  $C_{286.1}/C_{tot}$  molar ratios, respectively, computed on the basis of amino acid amount and composition of type II collagen (**Table S17**, Supplementary Information).  $\eta$  is the  $C_{tot}/S_{ox}$  computed on the basis of the composition of aggrecan (**Table S17**). The proportion of carbon atoms due to each model compound X ( $C_X/C_{tot}$ ) can be computed by solving the following system of equations:

$$\frac{C_{Col}}{C_{tot}} = \alpha \times \frac{N_{Col}}{C_{tot}} \quad (1)$$

$$\frac{C_{Agg}}{C_{tot}} = \eta \times \frac{S_{ox}}{C_{tot}} \quad (2)$$

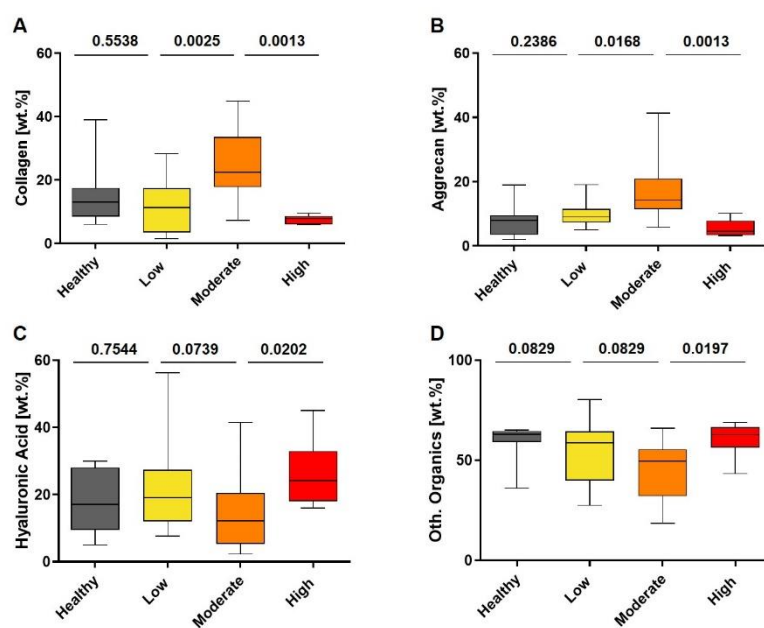
$$\frac{C_{286.1}}{C_{tot}} = \gamma_{Col} \times \frac{C_{Col}}{C_{tot}} + \gamma_{Agg} \times \frac{C_{Agg}}{C_{tot}} + \gamma_{HA} \times \frac{C_{HA}}{C_{tot}} \quad (3)$$

$$\frac{C_{Col}}{C_{tot}} + \frac{C_{Agg}}{C_{tot}} + \frac{C_{HA}}{C_{tot}} + \frac{C_{Oth}}{C_{tot}} = 1 \quad (4)$$

This system of equation is based on the consistency of XPS data to provide exclusive markers for the two compounds of interest. This concerns collagen (Col), which may be quantified by  $N_{Col}$  (see consistent relationship in  $C_{287.5}$  vs  $N_{Col}$  plot, cf. **Figure 35D**), and aggrecans (Agg) quantified by the contribution in the S 2p peak at *ca.* 168 eV, due to oxidized sulfur species ( $S_{ox}$ ), and which is exclusively present in CS and KS (**Figure 31**). In contrast, hyaluronic acid (HA) does not present any exclusive marker. Its concentration ratio may be computed by subtracting the contribution of collagen and aggrecan in the  $C_{286.1}$  component which includes peptidic link, acetal and alcohol functional groups. Any biological element that does not correspond to one on the three compounds mentioned above is computed in the *Oth. Organics* molar concentration.

The computed concentration ratios ( $C_X/C_{tot}$  with X= Col; Agg; HA or Oth) can then be converted into weight percentages of model compounds, using the carbon concentration specific to each compound (**Table S1**, Supplementary Information). For sake of comparison, data are pooled on box plots and presented as a function of the OA severity, determined by the Mankin score from 0 (healthy) to 14 (severe OA) (**Figure S1**, Supplementary material). **Figure 36** shows the evolution of the molecular constituents of the cartilage ECM, *i.e.* aggrecan,

collagen, hyaluronic acid, and other organics in healthy cartilage and OA cartilage of low (0 – 4), moderate (5 – 9) and high (10 – 14) Mankin score groups. No significant variations were observed between the healthy and OA cartilage at low Mankin scores. Results reveal that the amount of both collagen and aggrecan increase markedly from low to moderate OA score. This evolution corresponds to an increase from 11.6 to 24.1 wt.% ( $p < 0.01$ ), for collagen, and from 9.9 to 17.2 wt.% ( $p < 0.05$ ) for aggrecan (**Figure 36A and B**). The trend is then reversed at higher scores, showing a significant decrease in the concentration of collagen and aggrecan (to 7.6 wt.%,  $p < 0.01$ , and 5.5 wt.%,  $p < 0.01$ , respectively). By contrast, the variation of the concentrations of hyaluronic acid and other organics did not show any clear trend and seems to be not significantly impacted by OA scores (**Figure 36C and D**). These quantitative data suggest that increasing the histopathological OA severity strongly impacts the amount of type II collagen and aggrecans in the cartilage ECM.

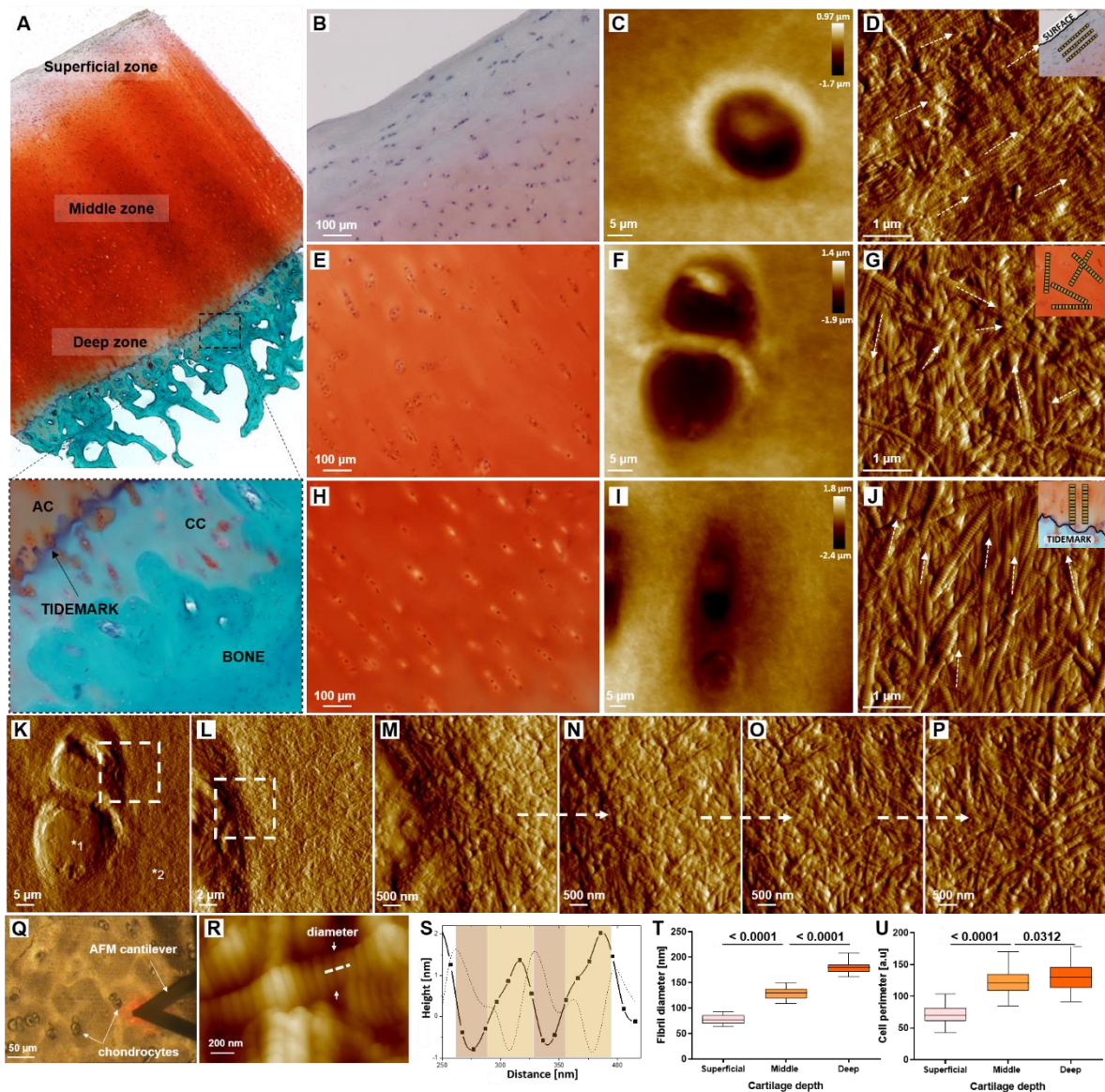


**Figure 36.** Evolution of the weight percentages (wt.%) of the main constituents of cartilage ECM, including (A) collagen, (B) aggrecan, and (C) hyaluronic acid, and (D) other organic molecules, mainly due to hydrocarbon compounds originating from adventitious contaminants, by combining XPS data and theoretical considerations.

### 4.3.2. Tissue morphology

AFM imaging was used to probe possible morphological changes of the cartilage ECM as a function of histopathological OA severity, evaluated by the Mankin score. **Figure 37A** shows a healthy cartilage and osteochondral junction. The articular cartilage revealed a normal red staining intensity (staining except for the superficial zone) with normally distributed chondrocytes and intact tidemark, separating the non-calcified and the calcified cartilage. Superficial, intermediate and deep zones can be easily distinguished. The superficial zone contained spherical chondrocytes and densely packed collagen fibrils which are mostly aligned and parallel to the articular cartilage surface (**Figure 37B-D**), but fibrils with random orientations can be also observed. Deflection images were used instead of height images to better visualize individual fibrils and their D-periods. The intermediate zone was characterized by a lower cell density and a random orientation of fibrils (**Figure 37E-G**). In the deep zone, chondrocytes are shown to be organized in columns following the direction of aligned collagen fibrils, *i.e.* perpendicular to the tidemark (**Figure 37H-J**). To probe cartilage ECM morphological changes as a function of OA severity, images were recorded at different areas in the tissue mostly located in the territorial matrix, which was identified to the regard of chondrocytes (**Figure 37K-P**). The latter are clearly visible in optical micrograph (**Figure 37Q**). The typical morphology of the cartilage ECM in the territorial matrix showed three-dimensional collagen network, where individual collagen fibrils are well distinguishable (**Figure 37R**). The main characteristics of these fibrils, *i.e.* D-period and mean diameter, can be determined using high-resolution images (**Figure 37R**). Line scans taken along the fibril longitudinal axis may be used to provide reliable information regarding the D-period of individual fibrils (**Figure 37S**). The healthy articular cartilage exhibited collagen fibrils, with clearly resolved D-period. The fibrils mean diameter increased noticeably from the superficial to deep zones: from  $76.6 \pm 8.7$  nm to  $178.9 \pm 11.1$  nm, respectively (**Figure 37T**). In addition, chondrocytes within the middle and deep zones were larger than those in the superficial region (**Figure 37U**). This zonal dependance of the mean diameter of fibrils and their organization are in agreement with previous studies.<sup>551,557–559</sup>





**Figure 37.** (A) Healthy osteochondral junction stained with Safranin O/Fast Green. The zoom taken at the cartilage (red) / bone (green) interface shows the border, named tidemark, between articular cartilage (AC) and calcified cartilage (CC). (B-H) Zooms taken at the three different cartilage layer and the associated AFM height and deflection images showing respectively chondrocytes (C, F, I) and the extracellular matrix (D, G, J). (K) AFM deflection image showing a chondrocyte (\*1) and the extracellular matrix (\*2). (L and M) Zoom taken at the location indicated by dashed lines in images (K and L), respectively, and (M-P) offset of 5  $\mu\text{m}$  toward the extracellular matrix. (Q) Optical image showing of the cartilage tissue and the AFM cantilever. (R) High resolution height image showing individual collagen fibrils. (S) Line scan (■), and the corresponding second derivative (--), taken at the location indicated by dashed line in image (R). The second derivative is used to identify the D-period, including gap and overlap regions shown in light and dark brown, respectively in panel S. (T) Evolution of collagen fibril diameter with depth in healthy articular cartilage. (U) Evolution of cell perimeter with depth in healthy articular cartilage.

In contrast to the healthy sample, the subdivision of OA cartilages into three distinguishable zones (superficial, middle and deep) was no longer possible due to the erosion of the surface and the abnormal ossification at cartilage depth, as clearly shown in histological images of OA osteochondral junction (**Figure S1**).

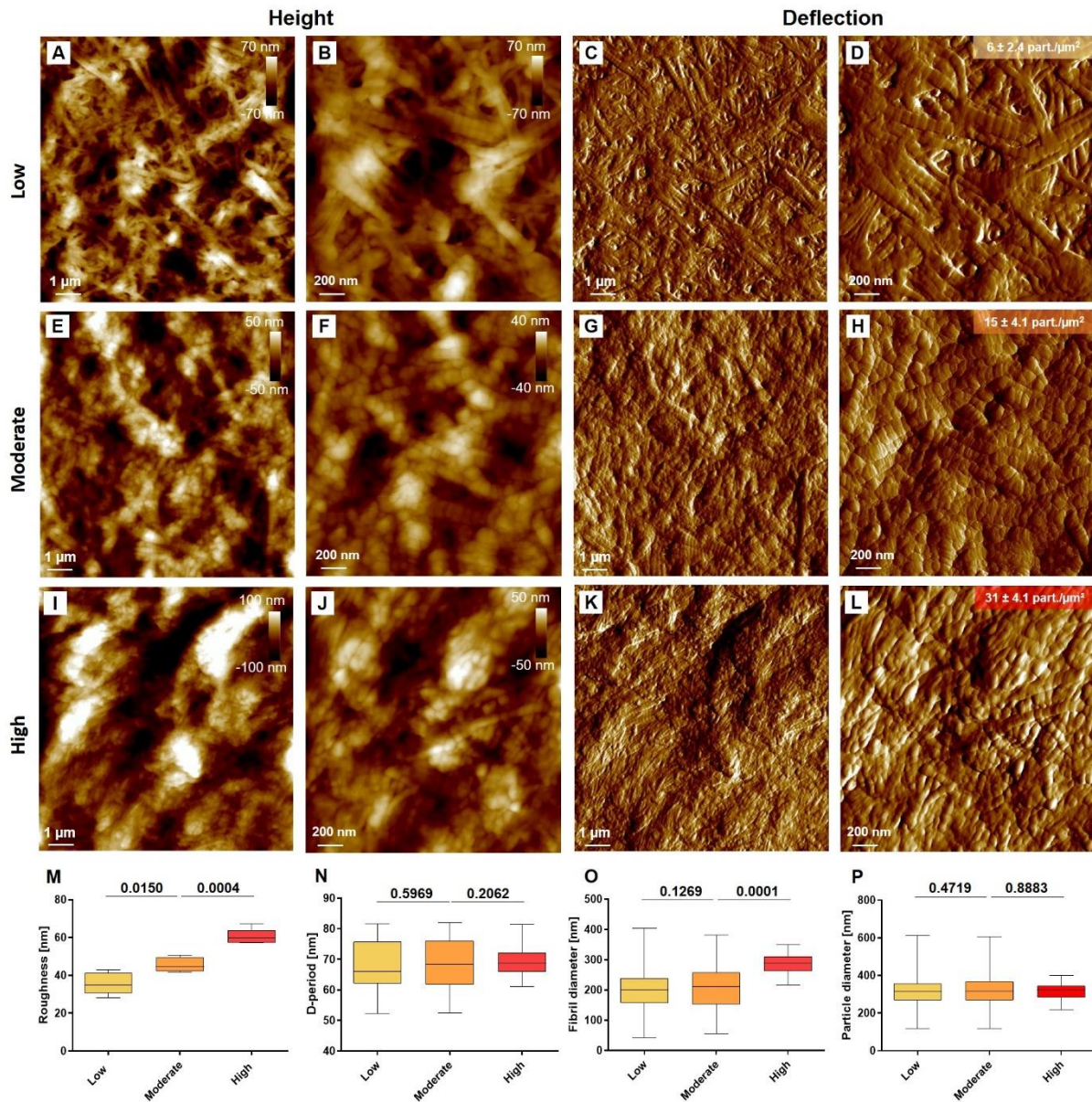
The evolution of the cartilage ECM morphology due to OA was assessed as a function of the score groups (low, moderate and high). At low OA scores, AFM images showed individual fibrils randomly organized, sometimes twisted, and interconnected with each other's throughout the depth of the cartilage (**Figure 38A-D**). Their D-period features were particularly visible in deflection images (**Figure 38C, D**). At moderate OA scores, the ECM morphology appeared denser with collagen fibrils that were more bundled to each other (**Figure 38E-H**). In contrast, drastic morphological changes were observed at high OA scores. Instead of the well-defined fibrils observed at lower scores, AFM images revealed the dominating presence of spheroid-shaped nano-objects, while only some fibrils remain visible (**Figure 38I-L**). It is noteworthy that these nanostructures could be observed on tissues with lower scores, but their presence was significantly less pronounced, compared to high scores (**Figure S3**, Supplementary Information).

These qualitative observations suggest that the histopathological OA severity, reflected by the scores, was associated with changes in the morphology of the studied cartilage ECM, particularly on (i) the whole three-dimensional collagen network, in the one hand, and (ii) the substructure of fibrils, on the other hand. To obtain quantitative information, particularly regarding the surface topography and the main characteristics of individual fibrils (mean diameter and D-period), measurements were performed by using AFM images recorded on several tissues and at different depth locations (three  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  images per patient). The root-mean square roughness,  $R_{\text{rms}}$ , computed on  $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$  images, showed a significant increase with increasing the OA score (**Figure 38M**). Moreover, it is shown that the D-period of collagen fibril remained almost unchanged ( $68.3 \pm 7.2\ \text{nm}$ ,  $68.7 \pm 7.7\ \text{nm}$  and  $69.4 \pm 4.7\ \text{nm}$  for low, moderate and high group, respectively) (**Figure 38N**). However, the mean diameter of fibrils significantly increased at higher score: from  $198.8 \pm 57.5\ \text{nm}$  and  $206.4 \pm 66.3\ \text{nm}$ , at low and moderate scores, respectively to  $287.3 \pm 33.0\ \text{nm}$ , at high scores (low vs moderate: no significant; moderate vs high:  $p < 0.001$ , **Figure 38O**). In contrast, the mean diameter of the globular particles remained almost unchanged (*ca.*  $315\ \text{nm}$ , **Figure 38P**), while their presence



was more pronounced when increasing the OA score (from approximately 7 to 18 and 32 particles per  $\mu\text{m}^2$  for low, moderate and high group, respectively, **Figure 38D, H, L**).

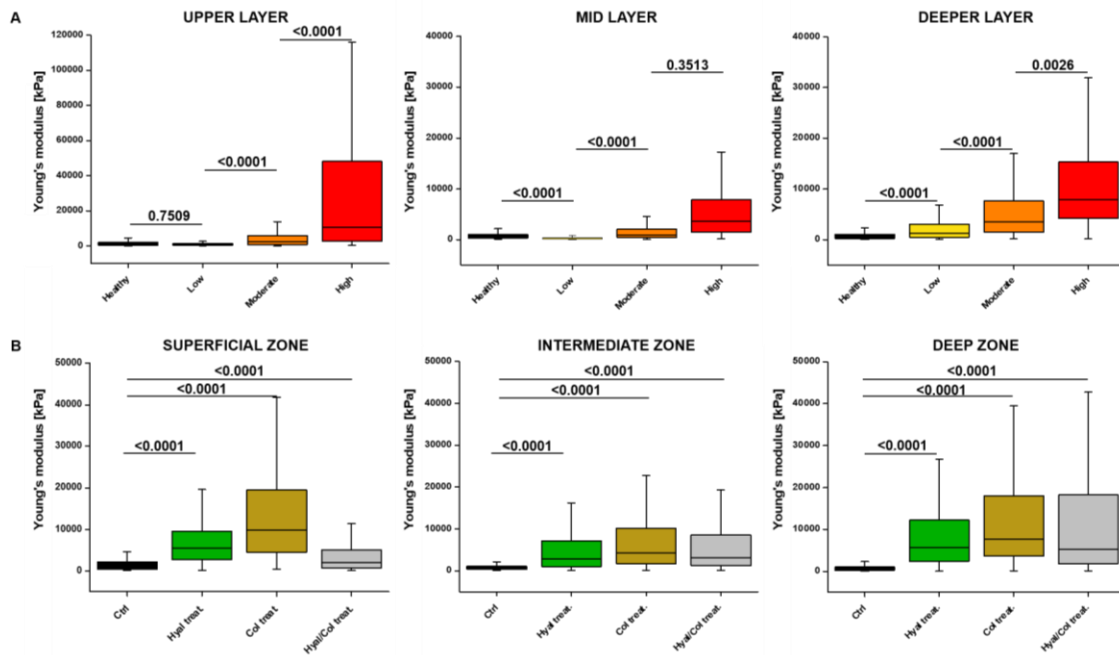
Together, XPS and AFM data showed that the modifications of the chemical composition, as a function of OA scores were associated to structural changes, which consist in significant alteration of collagen fibrils and their supramolecular organization within the ECM.



**Figure 38.** AFM (A, B, E, F, I and J) height and (C, D, G, H, K and L) deflection images showing the evolution of ECM morphology with OA severity: at (A-D) low, (E-H) moderate and (I-L) high OA scores. Evolution of (M) the surface roughness (from  $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  images), (N) D-period, (O) the mean diameter of collagen fibrils, and (P) the size of the spheroid-shaped particles. Values indicated in insets (panels D, H and L), expressed in  $\text{part./}\mu\text{m}^2$  correspond to the surface densities of the spheroid-shaped particles.

### 4.3.3. *Mechanical properties*

AFM was also used to assess possible changes in the mechanical properties of the cartilage that may result in changes in the composition and structure of ECM, as described above. For this purpose, indentation tests were performed by AFM on healthy and OA cartilages at the different score groups. Examples of typical force-indentation curves, and the corresponding fits, are given in **Figure S4** (Supplementary Information), showing the ability to probe tissues with different stiffness in the studied conditions. However, it must be kept in mind that these measurements do not aim to provide absolute values of the Young's modulus of the cartilage samples; it rather allows situations to be compared to each other. Indeed, measurements were performed in the same conditions, using the same parameters (applied force, velocity, size of the probed area, *etc*) and the same AFM tip so that the extracted Young's modulus values can be compared in a reliable way. **Figure 39A** presents the evolution of the Young's modulus as a function of OA severity, where measurements were performed at different locations of the cartilages subdivided to three zones: upper, middle and deep. In healthy cartilage, these correspond to superficial, middle and deep zones, as described above. In OA cartilages, and due to the erosion of the surface and the abnormal ossification at cartilage depth, the upper zone is located in the vicinity of the cartilage surface, the deeper one is near the tidemark, while the middle zone is in between. Results showed a significant increase in the Young's modulus from healthy to OA cartilages. This stiffening effect was independent on the location where the measurements were performed, *i.e.* upper, middle and deeper zones, and became more pronounced when increasing the OA scores (*e.g.* **Figure 39A**).



**Figure 39.** Evolution of Young's modulus in different cartilage ECM zones with (A) OA severity and (B) in healthy cartilage treated with hyaluronidase, collagenase or both. Note that "upper", "mid" and "deeper" zones correspond to analyzed areas along cartilage surface (upper) - tidemark (deeper) axis. Boxplots display the data distribution based on standard deviation, first quartile (Q1), median and third quartile (Q3).

#### 4.3.4. Tissue digestion

To provide a comprehensive understanding of the interplay of collagen and aggrecan supramolecular assemblies to maintain the cartilage ECM integrity and function, limited enzymatic digestions using either hyaluronidase, collagenase, or a combination of both enzymatic activities were performed on healthy samples. The composition of the cartilage ECM prior to and after enzymatic digestions was probed, first, by XPS. Results showed the significant increase of collagen amount and the decrease in aggrecan when the sample was submitted to hyaluronidase or collagenase treatment (**Figure S6**, Supplementary Information). This suggest that both enzymatic reactions lead to a partial degradation of aggrecans, but involves different pathways as the hyaluronidase and the collagenase target different chemical groups. The trend observed in **Figure S6** also confirm the interplay of these supramolecular entities, aggrecan and collagen, which mainly constitute the cartilage ECM. **Figure 40** shows the structural evolution of healthy cartilage treated with hyaluronidase, collagenase, or both enzymes. Because on healthy tissue, the different zones (superficial, middle and deep zone) are distinguishable, the evolution of the cartilage ECM morphology was assessed as a function of cartilage depth. All cartilage areas underwent similar alterations of their collagen fibrils upon enzymatic treatment. These alterations are more or less pronounced depending on the depth (**Figure 40A-C**). Drastic

morphological changes were observed on hyaluronidase-treated cartilage (**Figure 40D-F**). Instead of the well-defined fibrils observed on control sample, the morphology of the ECM appeared flattened and denser with collagen fibrils that stuck together. In contrast, their D-period features remained particularly visible. The measured periodicity remained, indeed, unchanged. Collagenase-treated cartilage (**Figure 40G-I**) showed more densely packed fibrils, that were noticeably larger (**Figure 40M-O**). For instance, the mean diameter increased from  $129.8 \pm 11.7$  nm (Ctrl) to  $193.5 \pm 36.7$  nm (Col treat.),  $p < 0.001$ , in the middle zone (**Figure 40N**). The thickening of collagen fibrils was amplified by hyaluronidase/collagenase treatment in cartilage deep zone (**Figure 40J-L**). In the latter condition, morphological changes due to the enzymatic treatments were clearly dependant on the cartilage depth (compare superficial, middle and deep zones in **Figure 40J-L**). Interestingly, it is shown that because fibrils are strongly bundled to each other, they laterally fused to form larger fibrils (for more details see **Figure S5**, Supplementary Information). This phenomenon may, indeed, explain the significant increase of fibril's mean diameter as a result of the enzymatic treatments.

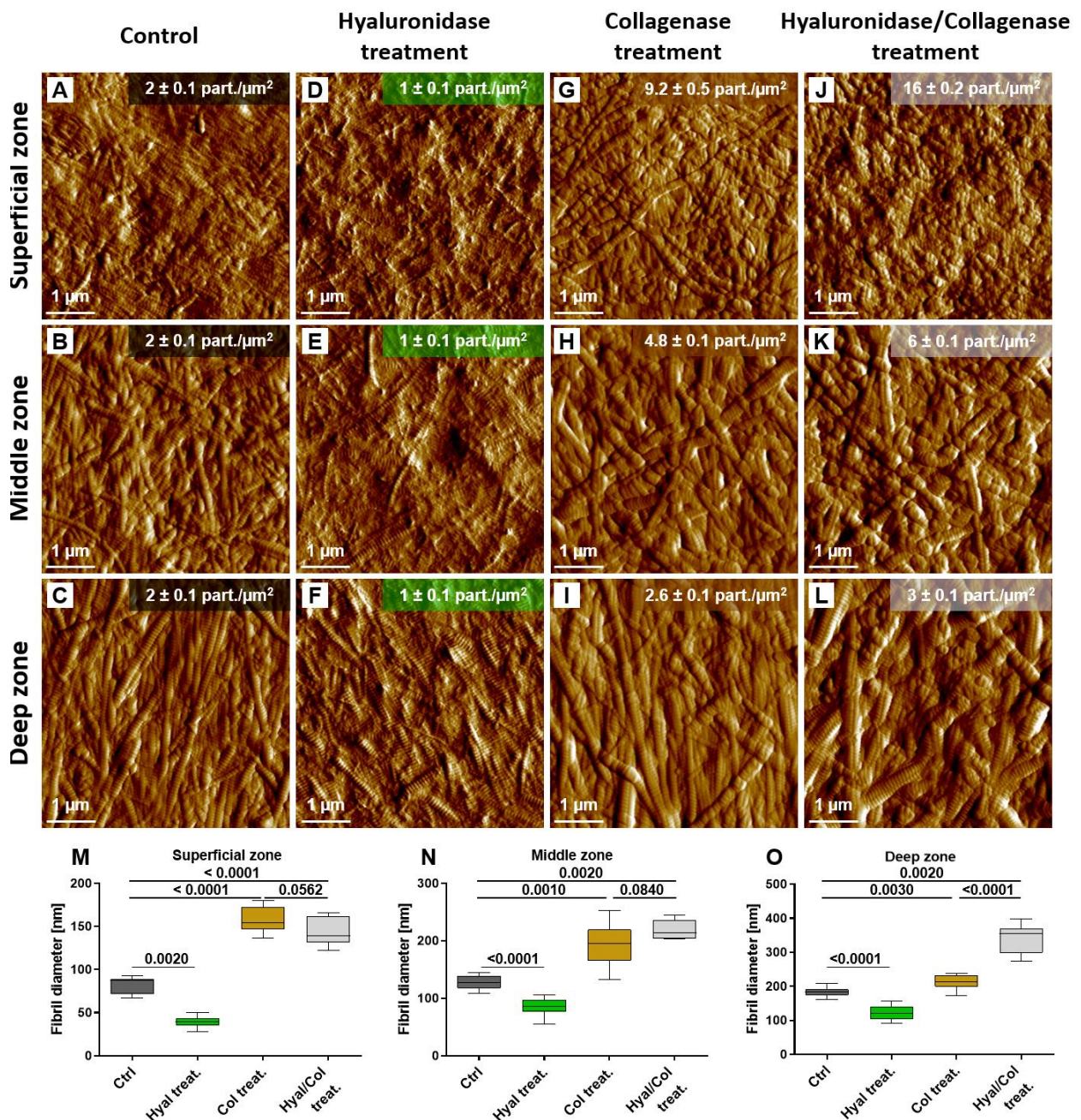
AFM images also revealed the presence of spheroid-shaped nano-objects, similar to those observed in OA samples, when the healthy cartilage sample was submitted to collagenase or hyaluronidase/collagenase, but not hyaluronidase treatment (see the surface density values, part./ $\mu\text{m}^2$ , in **Figure 40A-L**, insets).

Although ECM alterations were observed in all treated cartilages, it appears that there is a depth-dependent sensitivity to enzymatic digestion: cartilage superficial zone presented more drastic morphological changes than deep zone (**Figure 40**). The variation in fibril diameters due to collagenase and hyaluronidase/collagenase treatments was more significant in the superficial zone (**Figure 40M**). Moreover, the increase in the surface density of the spheroid-shaped particles is noticeably high in the superficial zone, while it is very weak in the deep zone.

**Figure 39B** presents the Young's modulus evolution of healthy cartilage treated with hyaluronidase or/and collagenase in different cartilage zones. A significant increase in the Young's modulus of the cartilage samples at different depth (superficial, intermediate and deep) was clearly observed after hyaluronidase and collagenase treatment. The enzymatic treatments performed on the healthy tissue lead, thus, to its stiffening. These results support the dependence between the supramolecular organisation of the ECM constituents and the



mechanical properties of the tissue. This effect is similar to what is observed on human OA cartilage.



**Figure 40.** Evolution of ECM (A-L) morphology and (M-O) mean fibril diameters due to enzymatic digestion of healthy articular cartilage, as indicated. (A-L) AFM deflection images recorded on healthy cartilage (A-C) prior to and after enzymatic treatment using (D-F) hyaluronidase, (G-I) collagenase or (J-L) both enzymes. (M-O) Evolution of the mean fibril diameter measured in the superficial, middle and deep zone prior to and after the different enzymatic treatments.

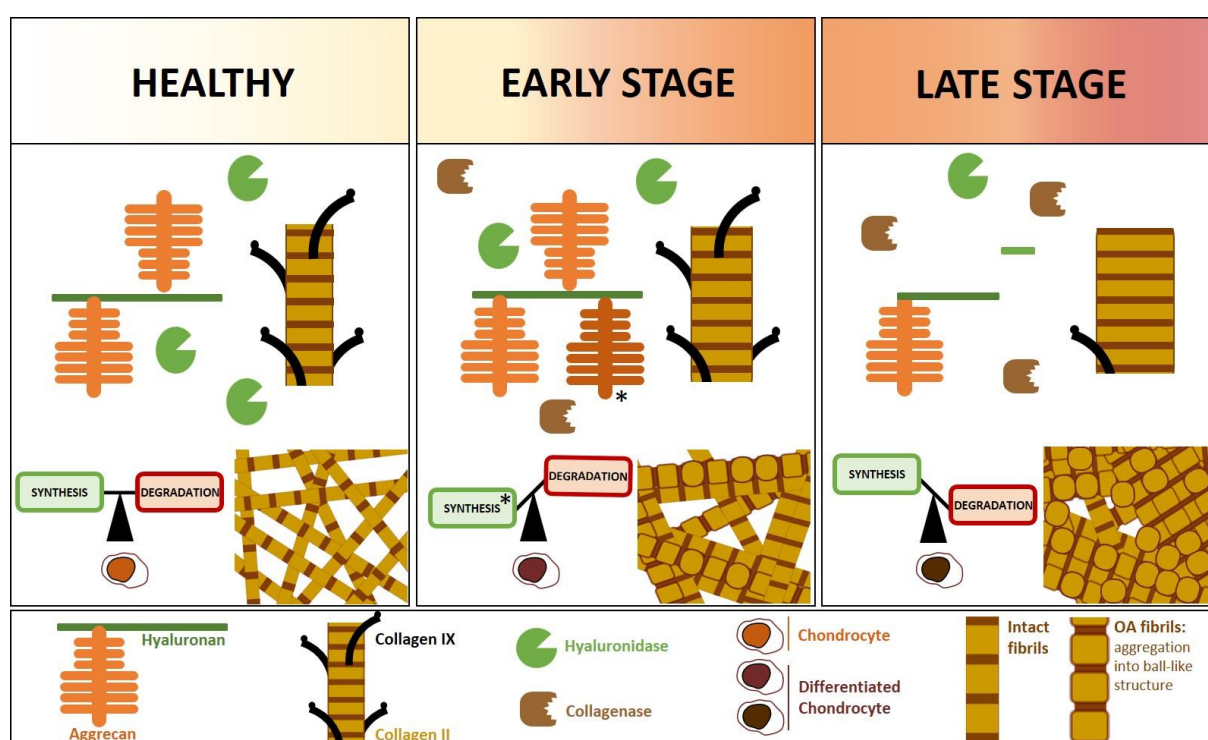
### 3.4. Discussion

Because type II collagen fibrils and interfibrillar aggrecan aggregates are the main constituents of cartilage ECM, the interplay between these two supramolecular assemblies is decisive in the development and progress of OA. Indeed, small variations in terms of composition and structure of these constituents may have a great impact on the biomechanical functions of cartilage. Herein, we aimed at unravelling the role and nature of OA progress, on human cartilage tissues, in terms of chemical composition and structural changes. A particular attention was dedicated to events at the nanoscale that is the level of supramolecular assemblies constituting cartilage ECM. For this purpose, we used XPS and AFM to probe, respectively, the composition and the morphology of human cartilage at different OA scores, as well as mechanical properties. These techniques offer a remarkable way to provide qualitative and quantitative information with a nanoscale resolution. While AFM has been used for probing soft musculoskeletal tissues, including mussel tendon and cartilage, to our knowledge, this is the first use of XPS to characterize pathological human cartilage tissue. Moreover, a model describing the main ECM compounds was developed with the aim to provide quantitative evolution of the matrix composition. Interestingly, the computed ratio of aggrecan to collagen determined in the present study by XPS varies from 0.5 (healthy cartilage) to 0.75 (OA cartilage), which is included within the range of ratios calculated from data available in the literature (0.33-0.75).<sup>258,259,544</sup>

The methodological development described here to explore XPS data, on the one hand, and the AFM characterization of the tissue, on the other hand, provides new insights into the evolution of the human cartilage ECM with the OA severities. There is, indeed, clear evidences on the existence of two distinct stages in the OA progression (**Figure 41**). At early stage, *i.e.* from low to moderate OA scores, a significant increase in aggrecan and collagen content was observed. This evolution may reflect an attempt of the cartilage repair via the anabolic response of chondrocytes, as evoked elsewhere.<sup>560,561</sup> The AFM images of the cartilage ECM associated with this anabolic response revealed that no drastic structural changes were observed on the newly synthesized matrix, except that collagen fibrils appeared to be more bundled to each other. The late stage corresponds to changes observed from moderate to high scores. The noticeable decrease of the amount of aggrecan and collagen observed by XPS may be associated with degradation processes. This observation suggests that the degradation of the cartilage ECM due to OA is no longer compensated by the anabolic response of chondrocytes (**Figure 41**).



Moreover, the evolution of the chemical composition, at this stage, was associated to drastic changes in the ECM morphology: well-defined collagen fibrils were almost not visible and, instead, spheroid-shaped nano-objects were extensively present. They may result from the aggregation of degraded collagen hetero-fibrils and probably aggrecans, in addition to other macromolecules present in the ECM. Interestingly, XPS data support a relationship between the amount of collagen and aggrecans in all conditions, *i.e.* healthy, early and late OA stage (**Figure S7**, Supplementary material). This confirms the role of homeostatic process, on the one hand, and supports the remarkable interplay between these supramolecular entities, on the other hand.



**Figure 41.** Proposed mechanism of OA progress showing the evolution of supramolecular building blocks, namely collagen fibrils and aggrecans, and the imbalance between anabolic and catabolic activity of chondrocytes. Schematic illustration of the reorganization in the extracellular matrix of cartilage during osteoarthritis. Other proteins may be involved in the interaction between Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix (FACIT) Collagen type IX and aggrecan aggregate as Cartilage Oligomeric Matrix Protein Precursor (COMP) and Matrilines, for sake of clarity they are not represented in the scheme.

Regarding mechanical properties, it is generally agreed in the literature that cartilage aging is accompanied by an increase of the tissue stiffness.<sup>399,509,562</sup> This is probably due to an increase of the degree of crosslinking within collagen fibrils, resulting in their stiffening. The relevance of using AFM in nanoindentation tests is, thus, related to its capacity to provide information at the level of individual collagen fibrils, so that supramolecular changes, resulting

from OA progress, can be correlated to nanomechanical properties. However, measurements of the elastic modulus performed on osteoarthritic cartilage tissues have shown some discrepancies regarding the evolution of this parameter with the OA severity. Our data clearly showed a global stiffening effect of the cartilage ECM from healthy to OA tissues, and an increase of the Young's modulus with increasing Mankin scores. This trend is in agreement with some reports<sup>399,563</sup> and in contradiction with other ones.<sup>431,509</sup> A tentative explanation of these disparate observations is given in **Table S18** (Supplementary Information) : It shows high variabilities of parameters that may influence Young's modulus measurements, including the nature and the localization in the joint, sample preparation procedures, methods used for OA scoring and, importantly, the direction on which AFM measurements were performed. Indeed, because cartilage is an anisotropic tissue, the direction used for nanomechanical measurements greatly affects the obtained Young's modulus<sup>431,513</sup> and, possibly, its evolution with OA severity. Moreover, and despite their significance, these parameters are not always well described (see **Table S18**, Supplementary Information). As mentioned above, the approach adopted here to probe possible evolutions (healthy vs OA and different OA scores) does not provide absolute Young's modulus but allows situations to be compared with each other. It confirms that changes in the composition and structure of the ECM supramolecular assemblies result in a change on the mechanical properties at the level of collagen fibrils.

To better highlight the pivotal role of collagen and aggrecans and the interplay between these supramolecular assemblies to maintain the ECM structure, specific enzymatic digestions were performed on healthy cartilage. Indeed, it is generally agreed in the literature that, unlike type II collagen, aggrecan aggregates undergo a turnover that does not keep stable their structure throughout life.<sup>262</sup> HA degradation by hyaluronidase is considered as the main source of changes in aggregate structure.<sup>262</sup> Its cleavage is detrimental since it reduces both the size and the charge of the aggregates. The collagen network and its interactions with aggrecan and other non-collagenous proteins also become susceptible to disruption by the increased activity of collagenases (MMP-1 and MMP-13).<sup>262,564</sup> Moreover, there are evidences supporting that aggrecanolysis precedes collagenolysis.<sup>509,565-567</sup>

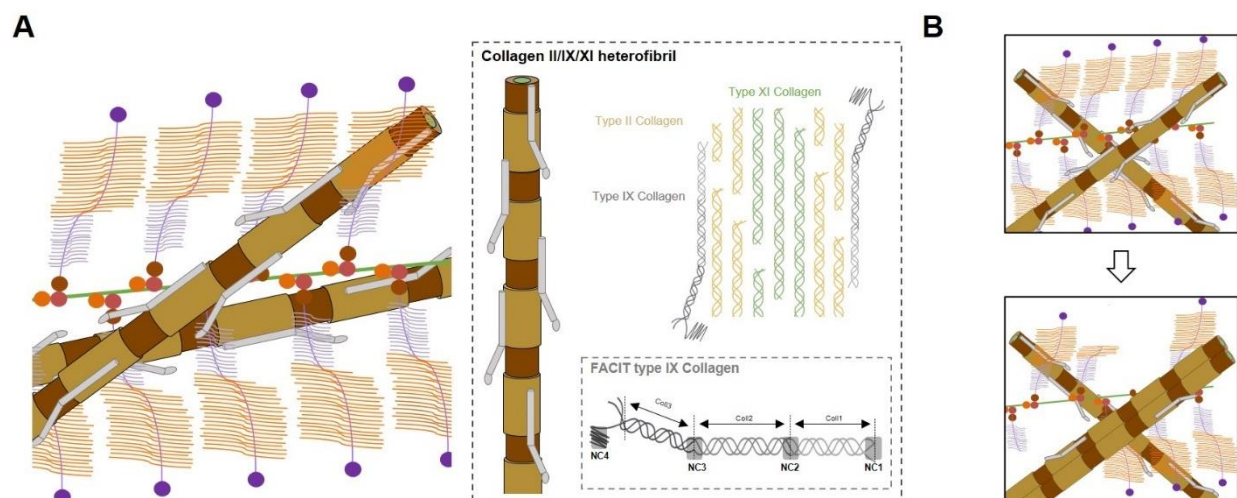
Our results showed remarkable similarities in the ECM composition and morphology between a healthy tissue submitted to a sequential enzymatic digestion (hyaluronidase then collagenase) and OA tissue at late OA stage. These similarities were, indeed, shown through (i) the assembly of densely packed and thicker fibrils, compared to healthy cartilage, and (ii) the

appearance of aggregated spheroid-shaped nanostructures, presumably originating from degradation products.

Moreover, these morphological features were particularly observed in the middle (**Figure 40K**) and the deep (**Figure 40L**) zones, as the superficial zone is generally not observed in OA samples at late stage, due to the erosion of the cartilage surface.

The stiffening effect observed with increasing OA score was also observed after the enzymatic digestion. These findings clearly support the idea that the catabolic activity of chondrocytes at the late OA stage can be mimicked with specific enzymatic activities, which preferentially impact the main supramolecular assemblies of cartilage, collagen fibrils and aggrecans, in terms of composition, organisation and mechanical properties.

Aggrecan molecules are noncovalently bound to hyaluronic acid to form large aggrecan aggregates<sup>262</sup> and their release upon hyaluronidase treatment is expected to modify the organization of the collagen network. This is consistent with AFM observations showing that collagen fibrils became more densely packed and flattened (**Figure 40D, E, F**). On the other hand, the significant impact observed on collagen fibrils due to collagenase activity may be explained by the involvement of other collagens than type II collagen. Indeed, it is noteworthy that collagen fibrils present in cartilage are hetero-fibrils<sup>258,399,548</sup> that consists in central filaments of type XI collagen surrounded by type II collagen fibrils (~90% of the collagen mass) and type IX fibrils, interacting with type II collagen fibrils and localized in the outer layer (see **Figure 42**).



**Figure 42.** (A) Schematic illustration of the Collagen II/IX/XI hetero-fibril constituents and their organization (Abbreviations. FACIT: Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices, COL1/COL2/COL3: triple-helical domains). (B) Schematic illustration of the reorganization in the extracellular matrix of cartilage during osteoarthritis

It is commonly agreed that the two minor collagens (*i.e.* type IX and XI) play a crucial role in maintaining the structural integrity of the cartilage matrix, therefore, the disruption of the fibrillar network may be caused by their proteolysis.<sup>304,509,568,569</sup> By contrast, type II collagen is not expected to be impacted by type IX and type XI collagen proteolysis. Instead, it may change its supramolecular architecture and lead to a dramatic loss of interconnectivity in the collagen/aggrecan network.<sup>569,570</sup> The FACIT (fibril associated collagen with interrupted triple helixes) type IX collagen, which is covalently bound to the type II collagen fibril surface, mediates interactions between collagen fibrils and other ECM components, including proteoglycans.<sup>551</sup> Thus, the collagenase-induced degradation of the type IX collagen may decrease the efficiency of aggrecan entrapment and play a major role in the depletion of interfibrillar aggrecan content. This may explain the increase in the amount of collagen observed by XPS after collagenase treatment (**Figure S6**, Supplementary Information). It also leads to significant changes in the supramolecular organization of fibrils, which become more bundled to each other and may fuse laterally (**Figure 42B**).

The effect of the enzymatic treatments in the superficial zone was more pronounced, compared to the deep and the middle zones. In the latter cases, fibrils are clearly visible (Figure 9K,L), while they are difficult to distinguish in the superficial zone (Figure 9J). Instead, the spheroid-shaped nanostructures, presumably due to the degradation of collagen fibrils, are dominating, suggesting that the superficial zone is more prone to be degraded than the other ones. These results may explain why the superficial layer of the articular cartilage is the first to be degraded in OA. They can also suggest that the degradative enzymes in OA play a more pivotal role in the erosion of articular cartilage than in the pathological ECM remodeling in the deepest part of the cartilage.<sup>567</sup>

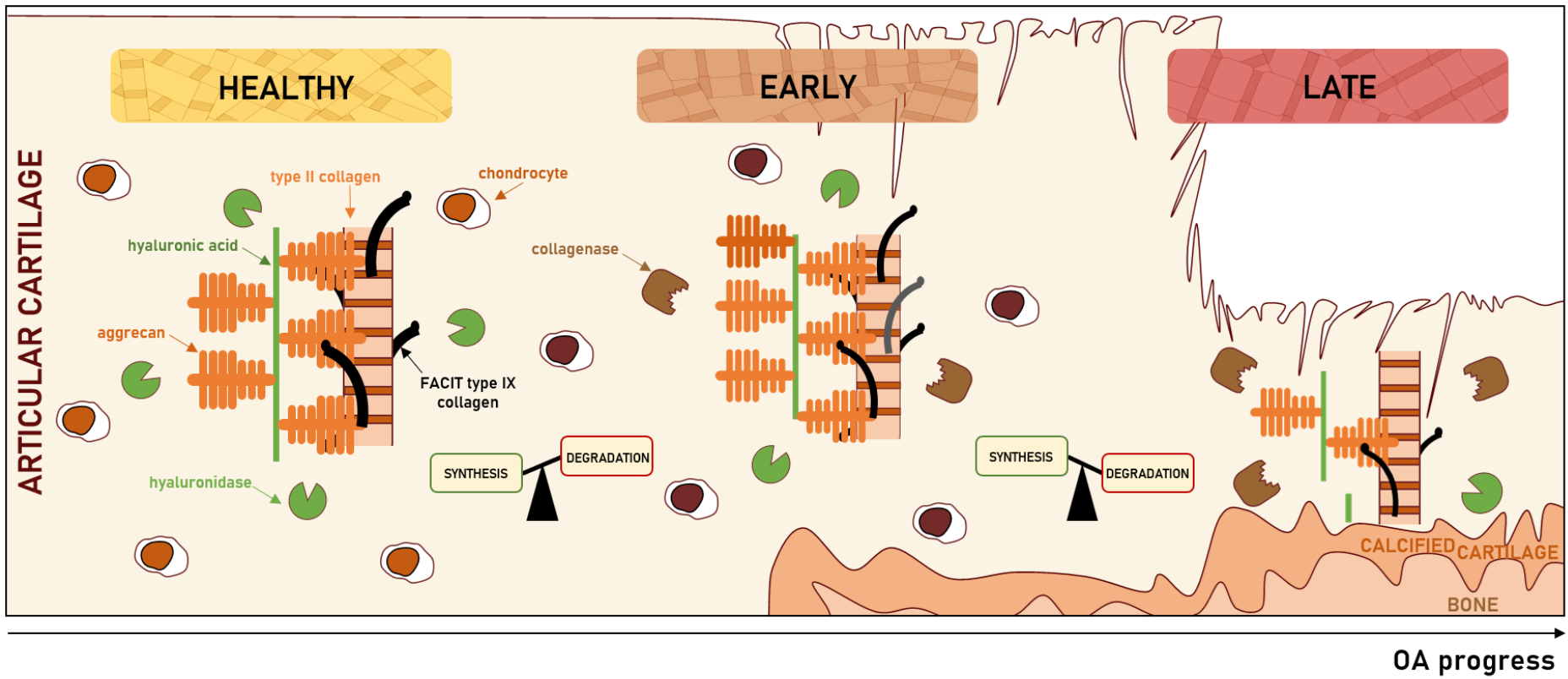
### 3.5. Conclusion

Collagen fibrils and aggrecans are supramolecular assemblies, which are entangled in a three-dimensional network that mainly constitute the cartilage ECM. The interplay between these building blocks is decisive in the development and progress of OA, as small chemical and structural changes may strongly impact the biomechanical functions of cartilage. In the present study, a particular attention was dedicated to events at the nanoscale that is the level of supramolecular assemblies constituting cartilage ECM. For this purpose, XPS and AFM were used to probe, respectively, the composition and the morphology of human cartilages, as well as mechanical properties at different OA severities.

The methodological development described here to improve the selectivity of XPS and quantify supramolecular compounds, on the one hand, and AFM characterizations of the tissue (morphology and nanomechanical properties), on the other hand, provides relevant insights into the evolution of the cartilage ECM with the OA severities. There is, indeed, clear evidences on the existence of two distinct stages in the OA progression. At early stage, corresponding to low and moderate OA Mankin scores, a significant increase of collagen and aggrecan content was observed. This evolution can be associated with an attempt of chondrocytes to restore the cartilage ECM through their anabolic activities. The morphology of the tissue, at the individual collagen fibril level, did not show important changes associated with this anabolic response. At late stage, corresponding to changes observed from moderate to high Mankin scores, significant decreases in the amount of aggrecan and collagen were clearly observed by XPS, which may be associated with degradation processes. These observations suggest that the degradation of the cartilage ECM due to OA is no longer compensated by the anabolic response of chondrocytes. The metabolic balance turns, thus, in favor of catabolic events. Chemical evolutions, observed at this stage, were also associated to radical changes in the ECM morphology: the well-defined collagen fibrils were almost not visible and, instead, spheroid-shaped particles were extensively present. They may result from the aggregation of degraded collagen and other macromolecules present in the ECM. XPS data support a correlation between the amount of collagen and aggrecans, indicating the remarkable interplay between these supramolecular entities, independently of the OA progress.

Interestingly, we showed the possibility to mimic the presumable imbalance between anabolic and catabolic activity of chondrocytes. For this purpose, limited enzymatic digestion through the combined action of hyaluronidase and collagenase were applied to a healthy cartilage, yielding damages strictly analogous to that observed during the OA progress.

The analytical methodological developments described here support the reliability of XPS data, which was evaluated, in terms of selectivity, precision and accuracy, via correlations between spectral data incorporating large amount of results. This opens up new horizons for the characterization of the chemical composition of soft biological tissues, while preserving their composition and structural properties (*e.g.* in diagnosis and related applications). From a biomedical perspective, this work provides a comprehensive understanding of the mechanism by which OA starts and progresses in the cartilage ECM. This offers relevant guidelines for the development of curative treatments, particularly those targeting the homeostatic balance of chondrocyte metabolism through the control of specific enzymatic reactions.







# **Chapitre 4**

**Dynamique du remodelage de l'ECM associé à la  
calcification pendant la différenciation  
hypertrophique des chondrocytes articulaires**

—

**Caractérisation biochimique, moléculaire et physicochimique**

---

Le cartilage articulaire est organisé en différentes couches qui diffèrent entre elles en termes de composition et d'organisation matricielle mais également par le phénotype et le profil d'expression génique des chondrocytes qui les composent. En effet, les chondrocytes de la couche profonde du cartilage articulaire présentent un phénotype préhypertrophique, tandis que le cartilage calcifié contient des chondrocytes hypertrophiques. La dégradation observée dans la zone profonde du cartilage articulaire, au cours de l'arthrose, peut résulter de la réactivation d'un processus de type ossification endochondrale. Elle s'accompagne en effet de la différenciation hypertrophique des chondrocytes qui déposent une matrice extracellulaire spécifique qu'ils minéralisent. Il est actuellement suggéré que le remodelage pathologique de la jonction ostéochondrale, au cours de l'arthrose, soit orchestré par la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Puisque l'environnement péricellulaire est essentiel au contrôle du comportement cellulaire, les modifications de la matrice péricellulaire des chondrocytes au cours de leur différenciation phénotypique de cellules préhypertrophiques en cellules hypertrophiques devraient jouer un rôle central dans le remodelage de la jonction ostéochondrale pendant l'arthrose.

Dans ce chapitre, nous avons donc cherché à déterminer la dynamique de la minéralisation et à comprendre les changements chimiques et structuraux de l'ECM des chondrocytes qui se produisent au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes articulaires. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de différenciation progressive des chondrocytes articulaires immatures murins (iMACs) en chondrocytes préhypertrophiques (Prehyp) et hypertrophiques (Hyp), qui minéralisent leur ECM. Une cinétique de différenciation Prehyp à Hyp a été réalisée afin de suivre la minéralisation et le remodelage de la matrice par immunofluorescence, par des approches biochimiques et moléculaires ainsi que par des approches physicochimiques, *i.e.* AFM, SEM-EDX, XRD et ATR-IR.

Ce travail fait l'objet d'un article en cours d'écriture.

---

# **Dynamics of extracellular matrix remodeling associated with calcification during the hypertrophic differentiation of articular chondrocytes**

Ilhem Lilia Jaabar <sup>a,b</sup>, Brittany Foley <sup>a</sup>, Alberto Mezzetti <sup>a</sup>, Françoise Pillier <sup>c</sup>, Francis Berenbaum <sup>b,d</sup>, Jessem Landoulsi <sup>a</sup>, Xavier Houard <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Réactivité de Surface, LRS, F-75005 Paris, France

<sup>b</sup> Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, F-75012 Paris, France

<sup>c</sup> Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques, LISE, F-75012 Paris, France

<sup>d</sup> Rheumatology Department, AP-HP Saint-Antoine Hospital, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75012, Paris, France

## Abstract

The calcified cartilage (CC) is the transitional zone between non-calcified hyaline cartilage and bone in growth plates and joints. CC diminishes the existing mechanical gradient and plays a pivotal role in the replacement of non-calcified hyaline cartilage by bone in the endochondral ossification process. Unlike bone and teeth, whose mineralization relies on the calcification of type I collagen fibrils, cartilage mineralization requires a profound ECM remodeling. The matrix of non-calcified cartilage, rich in type II collagen fibers, is indeed replaced by a matrix rich in type X collagen. Such a process, which is not completely characterized, depends on the hypertrophic differentiation of chondrocytes. Thanks to an *in vitro* model of progressive hypertrophic differentiation of chondrocytes, we studied the dynamics of changes in the composition and structure of the matrix associated with its mineralization during hypertrophic differentiation of chondrocytes. For this purpose, kinetics of Prehyp to Hyp differentiation of mouse articular chondrocytes (iMACs) were carried out to follow the mineralization and the remodeling of the matrix by immunofluorescence, biochemical and molecular approaches as well as by physicochemical approaches. Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes induced a matrix turnover characterized by a rapid drop in type II collagen and aggrecans and the concomitant appearance of type X collagen. In addition to fibrillar type II collagen or type X collagen network, IF and AFM analyses also revealed the presence of a three-dimensional type I collagen network. Matrix turnover is accompanied by an increase in the concentration and the enzymatic activity of MMP-13, the main collagenase of cartilage. EDX analyses revealed that the newly formed minerals are poorly crystalized HAP. The chemical mapping also showed that phosphorus is concentrated in cellular debris, which may originate in part from the apoptosis that increased during the hypertrophic differentiation of chondrocytes. . These findings provide new insight into the dynamics of matrix remodeling events resulting from hypertrophic chondrocyte differentiation, which leads to its mineralization. They also provide relevant guidelines for the understanding of remodeling events that occur at the osteochondral junction in OA.

**Keywords:** chondrocyte, hypertrophic differentiation, mineralization, cartilage, collagen, aggrecan

## 4.1. Introduction

Cartilage is a family of specialized connective tissues that comprises hyaline, elastic and fibrous subtypes. All of them are composed of chondrocytes that produce and organize an abundant and peculiar extracellular matrix (ECM). For instance, the collagen matrix of hyaline cartilage is mainly composed of type II collagen, whereas fibrous cartilage is rich in type I collagen. Differences in matrix composition and organization confer the cartilage specific mechanical properties.<sup>264,571</sup>

Cartilages are unique among biological tissues because they may or may not be physiologically mineralized. Elastic and fibrous cartilages as well as most of hyaline cartilages are not mineralized. However, at the interface between cartilage and bone, the hyaline cartilage of the growth plate and joints is mineralized. In addition, pathological mineralization can also occur in hyaline and fibrous cartilages. Notably, cartilage damages in osteoarthritis (OA) indeed include the presence of crystal depots in the ECM.<sup>383,388</sup> OA cartilage is also characterized in its deepest part by an advancement of the mineralization front, as evidenced by the duplication of tidemark, which delimitates mineralized and non-mineralized cartilages. This phenomenon is reminiscent of that of the endochondral bone formation process that allows the longitudinal growth of long bones.<sup>572</sup> One of the pivotal events in the endochondral bone formation process is the phenotypic change of chondrocytes, which undergo a process of terminal differentiation and become hypertrophic.<sup>275,573,574</sup> Such a hypertrophic differentiation of chondrocytes is also observed in OA cartilage and is suspected to play a pivotal role in cartilage degradation.<sup>383,385,575-578</sup> Hypertrophic chondrocytes are able to mineralize their matrix because they express high levels of alkaline phosphatase and they secrete matrix vesicles that concentrate inorganic phosphate and calcium to allow the nucleation of calcium phosphate (CaP) crystals.<sup>572,579,580</sup> Apoptotic bodies of hypertrophic chondrocytes have been similarly proposed to serve as nucleation sites for CaP crystals.<sup>383</sup>

Unlike bone, whose mineralization is based on the calcification of the osteoid matrix, essentially composed of type I collagen fibrils, the mineralization of cartilage requires a profound remodeling of the ECM. Non-mineralized and mineralized cartilage matrices indeed differ by their content in type II and type X collagen as well as aggrecan. During their hypertrophic differentiation, chondrocytes slow down their expression of type II collagen and aggrecan, whereas that of type X collagen is induced.<sup>581-583</sup> Nevertheless, the sequence of

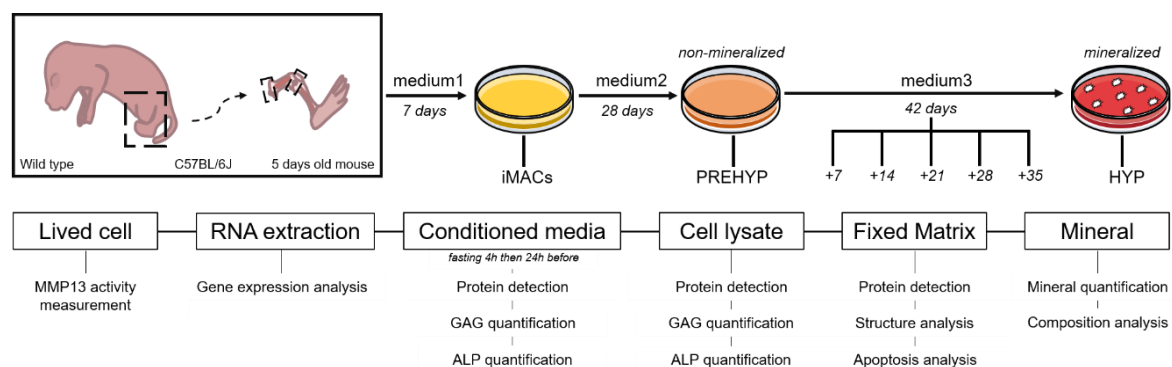
remodeling events of cartilage matrix associated with its mineralization is not completely characterized, especially for articular cartilage.

In the present study, we aimed at unravelling the dynamics of ECM mineralization and modifications during the hypertrophic differentiation of articular chondrocytes. For this purpose, we used an *in vitro* model of progressive differentiation of murine immature articular chondrocytes (iMACs) into prehypertrophic (Prehyp) and hypertrophic (Hyp) chondrocytes that we recently developed.<sup>584</sup> Kinetics of prehypertrophic to hypertrophic differentiation were carried out to follow the mineralization of the ECM and its remodeling by immunofluorescence, biochemical and molecular approaches as well as by physicochemical approaches, including atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy associated with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX), attenuated total reflection infrared (ATR-IR) analyses and X-ray diffraction (XRD).

## 4.2. Materials and methods

### 4.2.1. Primary culture of murine articular chondrocytes

iMACS isolated from the femoral heads and knees of 5-6-day-old newborn C57BL/6 mice (Janvier labs) were seeded either on culture plates or on sterile glass slides (12 mm, Dutscher) and cultured for 7 days DMEM culture medium (1 g/L glucose) supplemented with fetal calf serum (10%), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and L-glutamine (4 mM) (Medium 1), as previously described<sup>585,586</sup>. According to van Eegher *et al.*<sup>584</sup> Prehyp chondrocytes were obtained by culturing iMACS for an additional 28 days in DMEM/HAM-F12 medium supplemented with fetal calf serum (5%), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/mL), L-glutamine (4mM), ascorbic acid (40 µg/mL), insulin-transferrin-sodium selenite (1%, Sigma Aldrich) and triiodo-L-thyronine (50 ng/mL, Sigma Aldrich) (Medium 2). Chondrocytes were further cultured for 42 days in medium 2 supplemented with β-glycerophosphate (10 mM, Sigma Aldrich), retinoic (100 nM, Sigma Aldrich) and 1α,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (10 nM, Sigma Aldrich) (Medium 3) to obtain Hyp chondrocytes. All cultures were performed at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% with the exception of the last differentiation step, which was performed at 37°C in a humidified atmosphere of 3% CO<sub>2</sub>/95% air. At the end of the culture, cells were serum-starved for 24 h. All conditioned media were then collected, centrifuged and stored at -20°C, except those used for LDH assay that were stored at 4°C. Cells were either fixed in 3.7% paraformaldehyde (PFA) or used for mRNA or protein extraction. The experimental design is summarized in **Figure 43**.



**Figure 43.** Experimental design and analyses carried out. iMACS isolated from the femoral heads and the knees of newborn mice were cultured on sterile glass slides for 7 days in Medium 1. Confluent iMACS were then cultured for 28 days in Medium 2 to obtain Prehyp chondrocytes and for an additional 42 days for prehypertrophic to hypertrophic phenotype changes. Hyp chondrocytes were obtained by culturing Prehyp for 42 days in medium 3. MMP-13 analysis was performed on lived cells. Conditioned media were harvested for GAG and ALP quantification. Cells were either fixed in PFA or used for mRNA or protein extraction.

#### 4.2.2. RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR

Total RNAs were extracted with the ReliaPrep RNA Cell Miniprep System kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was obtained from 500 ng of total RNA by reverse transcription (Omniscript RT Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). The mRNA expression of genes of interest was analyzed by quantitative real-time PCR using the Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France) in a 12  $\mu$ L final volume reaction using specific primers (10  $\mu$ M) (**Table S19**) and GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corp., Madison, WI, USA). The PCR amplification conditions were as follows: initial denaturation for 5 min at 95°C followed by 40 cycles consisting of 10 s at 95°C, 15 s at 60°C and 10 s at 72°C. For each PCR experiment, the cDNAs were run in duplicate in parallel with serial dilutions of a cDNA mixture tested for each primer pair to generate a standard linear curve, which was used to estimate the amplification efficiency. The relative mRNA expression for all genes analyzed was normalized to that of hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt) used as internal reference genes for mouse genes, respectively, and the expression was determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

#### 4.2.3. Protein extraction and protein assay

For phosphatase alkaline assay, murine chondrocytes were lysed in Tris HCl (10 mM) pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> (0.5 mM) and Triton X-100 (0.1%), as described by Kirsch *et al.*<sup>587</sup> Cell homogenates were centrifuged at 10000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were kept for analysis.

For western-blot experiments, chondrocytes were lysed in RIPA buffer containing Tris HCl (50 mM; pH 8), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM), NP-40 (1%), sodium deoxycholate (0.5%) and sodium dodecyl sulfate (SDS, 0.1%), supplemented with protease inhibitor cocktail cOmplete™ 1X (Roche).

Protein concentrations in cell-conditioned media were determined using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein concentrations in cell lysates were determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions.



#### 4.2.4. Alkaline phosphatase activity assay

Murine chondrocytes were lysed in Tris HCl (10 mM) pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> (0.5 mM) and Triton X-100 (0.1%), as described by Kirsch et al. 8. Cell lysates were stored at -20°C for analysis. Alkaline phosphatase enzymatic activity was measured in murine chondrocyte cell lysates and conditioned media using the Colorimetric Alkaline Phosphatase Assay Kit, Yellow Color (FluoroProbes, Interchim, Montluçon, France).

#### 4.2.5. Glycoaminoglycan assay

Glycoaminoglycans were quantified by reaction with dimethylmethylene blue (DMMB).<sup>588</sup> Shark chondroitin sulfate (Merck) was used as a standard. Briefly, after adding DMMB reagent to samples, the microplate was shaken and incubated 3 min in the dark at RT before absorbance measuring at 530 nm.

#### 4.2.6. MMP-13 enzymatic activity assay

After washing with phosphate-buffered saline, chondrocytes were incubated at 37°C in assay buffer (50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) containing the MMP-13 synthetic fluorogenic substrate MCA-Pro-Cha-Gly-Nva-His-Ala-Dpa-NH<sub>2</sub> (40 μM, Millipore) in the presence or absence of Marimastat (20 μM, Merk). Substrate hydrolysis was monitored for 32 min by spectrofluorometry ( $\lambda_{Exc} = 340$  nm; and  $\lambda_{Em} = 380$  nm). MMP-13 enzymatic activity was determined as the difference between the substrate hydrolysis obtained in the absence and in the presence of Marimastat.

#### 4.2.7. Cell calcification assay

The quantification of cell calcification was performed as described by Gregory *et al.*<sup>589</sup> After alizarin red staining, cells were scraped in 10% (v/v) acetic acid. The solution was heated at 85°C for 10 min, transferred to ice for 5 min and centrifuged at 20000 g for 15 min. Then, 250 μL of the conditioned medium was mixed with 100 μL of 10% (v/v) ammonium hydroxide, and the optical density was measured in triplicate at 405 nm.

#### 4.2.8. Western Blot (WB)

Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) after resolution by 8% SDS-PAGE. Membranes were probed with primary antibodies (**Table S20**) and with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Results were revealed using clarity Western ECL substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and pictures were obtained by the Bio-Rad Chemidoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

#### 4.2.9. Cell death detection

Apoptosis was determined on fixed cells using the *in situ* cell death detection kit, Fluorescein (Roche). The TUNEL assay was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, PFA-fixed chondrocyte cultures were incubated in permeabilization solution (0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate) for 2 min on ice. Free DNA 3'-OH ends were next labeled with fluorescein-labeled nucleotides (fluorescein-dUTP) in the presence of a Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) for 60 min at 37°C in a humidified atmosphere in the dark. Samples incubated in dUTP without TdT enzyme were used as negative control, while positive control had DNA strand breaks induced with recombinant DNase 1 (1 mg/mL for 10 min), prior to the labelling procedure. Samples were directly analyzed under confocal fluorescence microscope (excitation wavelength of 450-500 nm and detection in the range of 515-565 nm). DRAQ5 staining was used to check the location of the nucleus.

#### 4.2.10. Immunofluorescence (IF)

IF was performed on PFA-fixed chondrocyte cultures with a rabbit antibody against type I, II, VI, X, collagens (dilution 1:100) (**Table S20**, Supplementary Information) as primary antibodies. Samples were first incubated with 1% BSA, 22.52 mg/mL glycine in PBST (PBS+ 0.1% Tween 20) for 30 min to block unspecific binding of the antibodies. Samples were then incubated with the primary antibody in 1% BSA overnight at 37°C in a humidified atmosphere in the dark. After three PBS washes, samples were incubated with the secondary antibody and DRAQ5 in 1% BSA (dilution 1:200 and 1:1000) (**Table S20**). Labeled matrices were mounted in Eukitt medium. IF images of whole-tissue were captured by using a confocal laser scanning microscopy (CLSM).

#### 4.2.11. *Atomic force microscopy (AFM)*

AFM images were recorded using a commercial AFM (NanoScope VIII MultiMode AFM, Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA.). Murine cells were cultured in culture plate (12 wells, corning) on sterile glass slides (12 mm, Dutscher). At the end of the culture, cells and their ECM were fixed in PFA and stored at -20°C. Glass slides covered with cells and ECM were then pick up (**Figure S8**) and fixed on a steel sample puck using adhesive tape. Images were recorded in ambient conditions at RT (~22 °C). Oxide-sharpened microfabricated Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> cantilevers were used (SNL-10, Bruker Nano Inc., Nano Surfaces Division, Santa Barbara, CA.). The spring constants of the cantilevers were measured using the thermal noise method, yielding values ranging from 0.39 to 0.54 N/m.

#### 4.2.12. *Scanning electron microscopy – Energy- dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX)*

Glass slides covered with cells and ECM (**Figure S8**) were fixed on a sample puck using adhesive tape and imaged by scanning electron microscope (SEM, FEI Quanta FEC 250) at an acceleration voltage operating at 10–20 kV. The samples were metallized by carbon sputtering for a better image contrast. The elemental content of the ECMs was identified using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) measurements.

#### 4.2.13. *Infrared- Attenuated total reflectance spectroscopy (IR-ATR)*

IR was used to probe the evolution of the relative chemical composition of the calcified matrices. Measurements were made using a Bruker VERTEX 80 FTIR spectrometer (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany). The instrument was operated in attenuated total reflection (ATR) mode using a Bruker A225 mono-reflection diamond ATR device and nitrogen cooled LN-MCT detector. Sample measurements were executed over a spectral range of 500-7800 cm<sup>-1</sup>, at 160 kHz mirror speed, and employing 250 scans per measurement for enhanced signal-to-noise ratio. The background (air) was measured over 1000 scans. Samples of the calcified matrices (as well as the non-calcified control) were measured while still attached to the glass substrate by pressing the experimental surface against the diamond ATR crystal with a force that ensures a homogeneous contact. A total of six individual measurements were taken for each experimental condition under ambient conditions. Measurements were executed using the Opus 7.8 software (Opus, Version 7.8.44. Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany).

#### 4.2.14. *X-ray powder diffraction (XRD)*

XRD measurements were performed using a Bruker Discover D8 X-ray powder diffractometer (Bruker, Karlsruhe, Germany) with Bragg-Brentano geometry, Cu X-ray anode (Cu-K $\alpha$ ,  $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ) operated at 40 kV, 30 mA, and a LYNXEYE XE-T detector operated in 1D mode. Measurements were performed over a range of 5° to 80° 2 $\theta$  with a step size of 0.03° at 2 seconds per step with the use of a beam knife to minimize background scattering at low 2 $\theta$  angles and motorized divergence slit in variable mode. Calcified matrix was separated from the solid substrate and micronized using an agate mortar and pestle, then plated onto zero-background quartz single crystal sample holders for analysis.

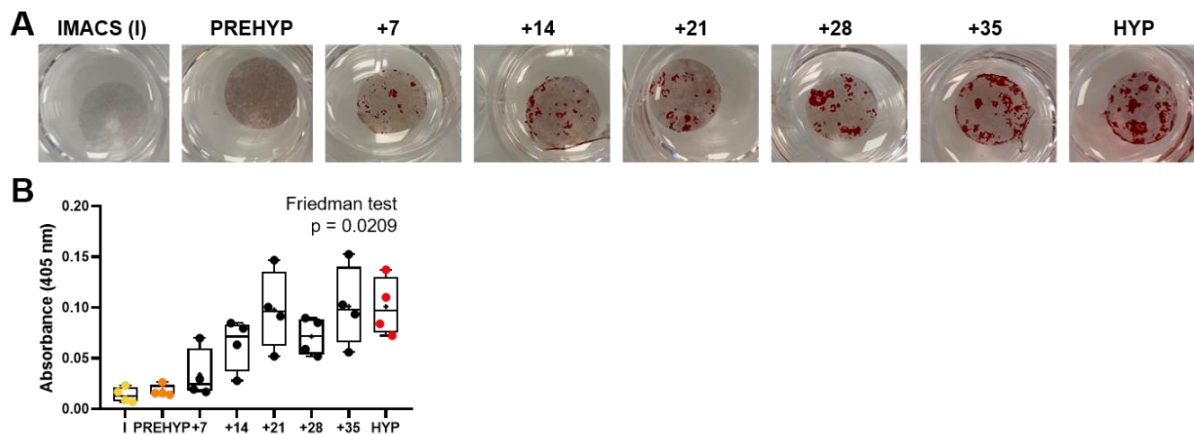
#### 4.2.15. *Statistical Analysis*

Data were compared using the Friedman test except for cell death and collagen diameter which passed the normally test successfully. In this case, an ANOVA test was thus performed. All analyses were performed using GraphPad Prism 8 software.

### 4.3. Results

#### 4.4.1. Progressive mineralization of chondrocyte matrix during hypertrophic differentiation

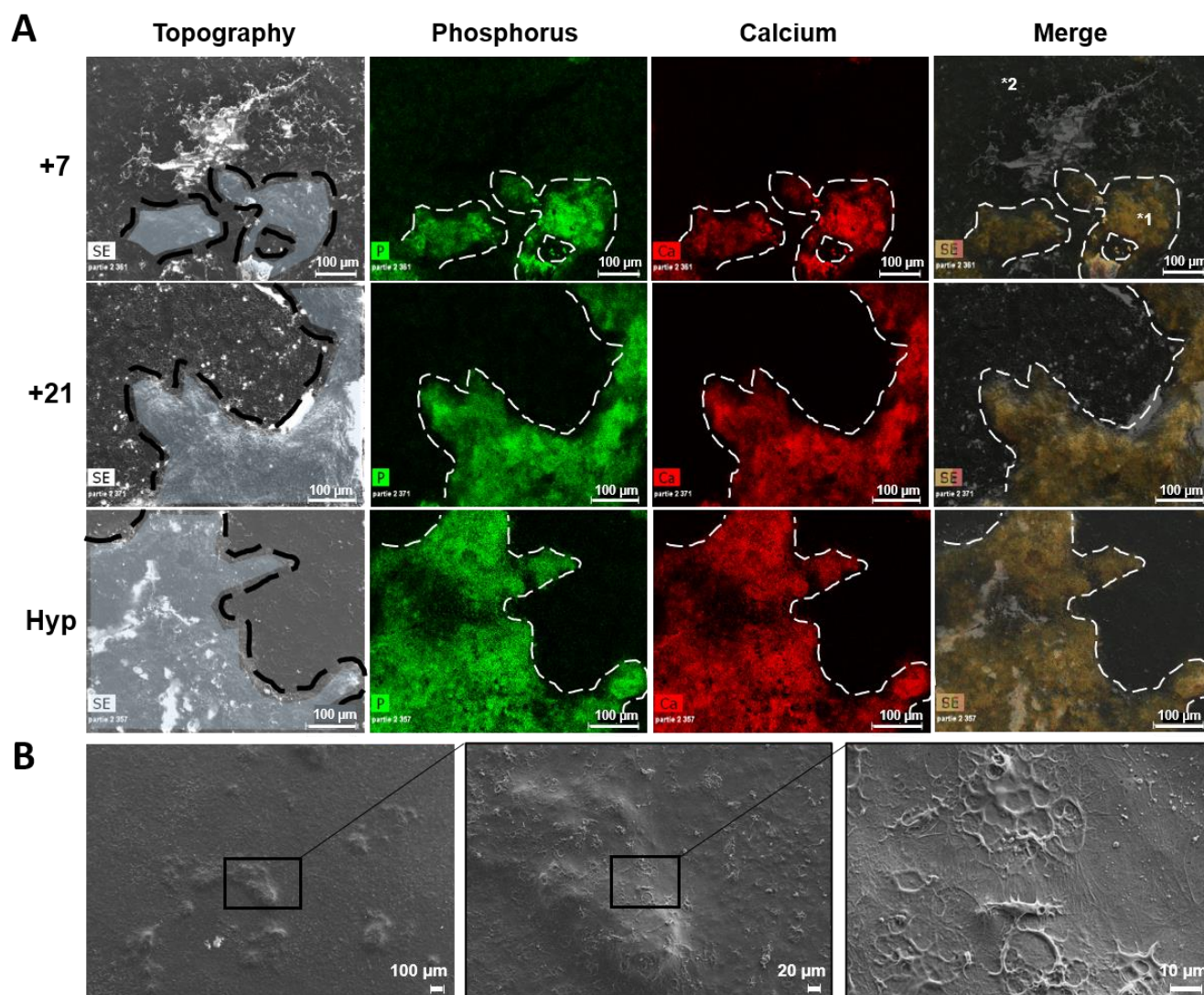
iMACs progressively differentiated into Prehyp and Hyp chondrocytes when cultured in appropriate conditions (**Figure S9**), as described by van Eegher *et al.*<sup>584</sup> Neither iMAC nor Prehyp chondrocyte cultures showed calcification, as revealed by the absence of alizarin red staining (**Figure 44A and B**). In contrast, spots of alizarin red staining were observed in cultures of hypertrophic chondrocytes. They appeared as early as 7 days after induction of hypertrophy and further increased in size and number over time (**Figure 44A**). Moreover, spectrophotometric quantification of staining revealed a gradual increase in absorbance from the time of hypertrophy induction until day 21 when a plateau was reached (**Figure 44B**).



**Figure 44.** Matrix calcification during Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes. (A) Representative photomicrographs of alizarin red staining and (B) the corresponding absorbance measured on the different chondrocyte matrices, as indicated.

Minerals found in cultures of chondrocytes, 7, 21 and 42 days after hypertrophy induction, consist of calcium phosphate (CaP) compounds, as shown through the EDX spectra (**Figure S11**). SEM images and the corresponding elemental maps, made with EDX for phosphorus and calcium, showed that the surface coverage of CaP mineral increased markedly with time (**Figure 45A**). Interestingly, the presence of the mineral phase is only detected by the elemental maps, because it did not show any particular topography that can be discriminated with the remaining matrix. This suggests that CaP minerals are embedded within an organic and non-fibrillar matrix (**Figure 45B**).

Regarding the composition of the mineral phase, the ratio of calcium to phosphorus determined from the EDX extracted data was  $1.72 \pm 0.06$  (**Figure S10**). Complementary analysis was performed by XRD on the mineral formed by hypertrophic chondrocyte at the end of the 42-day kinetics. The pattern shown in **Figure S10B** revealed the main peaks corresponding to the (002) (211) and (310) planes of the hexagonal lattice of HAP, but suggest the presence of poorly crystalline HAP mineral.



**Figure 45.** (A) Topographic imaging of the mineral expansion (SEM) and the associated chemical mapping (EDX) according to Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes with \*1 the mineral and \*2 the matrix. EDX spectra extracted from chemical mapping of the matrix (1) and the mineral (2) are shown in **Figure S10A** (B) SEM images recorded on a mineral present on chondrocytes matrix 21 days after Hyp induction: zoom on the covering matrix.

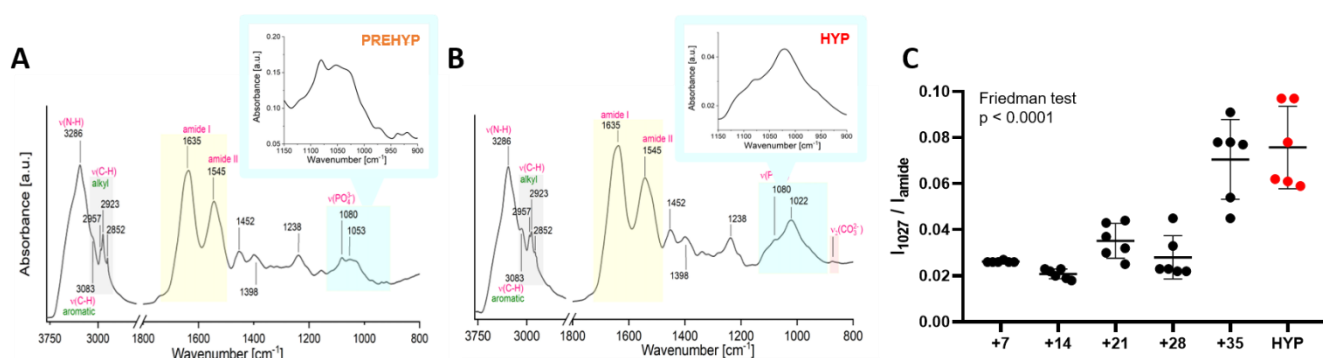
IR-ATR was used to observe changes to chemical composition for different timepoints during chondrocyte differentiation. Results show comparable spectra between the mineralized samples and non-mineralized Prehyp control, including absorption bands of amide and phosphate groups characteristic of mineralized tissues (**Figure 46A, B**). Multiple contributions are observed over the range of 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$  and 2800  $\text{cm}^{-1}$  to 3100  $\text{cm}^{-1}$  in the N-H and C-H stretching domains (including alkyl and aromatic C-H stretch), respectively. Prominent peaks are observed between 1470 and 1700  $\text{cm}^{-1}$ , including the amide I band (from 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ ) which principally results from C=O stretching modes and the amide II band (from 1470-1570  $\text{cm}^{-1}$ ) which is attributed to a combination of C-N stretching and N-H bending modes. The  $\nu_1, \nu_3$  phosphate band region (900-1200  $\text{cm}^{-1}$ ), resulting from symmetric and antisymmetric stretching vibrations, respectively, may be explored to probe changes during the mineralization of the matrix. Importantly, the band shape across this region in the mineralized samples differed sufficiently compared to that of the nonmineralized control to permit relative quantification of the inorganic phosphate content between samples via peak fitting (see insets in **Figure 46**). While other contributions in this region are present even in the Prehyp sample (**Figure 46A**), including organic phosphate (*e.g.* phosphate groups present in phospholipids, or even proteoglycans, the  $\nu_3$  contribution localized at an average position of approximately 1027  $\text{cm}^{-1}$  is selected as representative of inorganic phosphate given the time-dependent evolution of its intensity over all later timepoints (for more details see section **S3.2** in **Supplementary information**).

To quantify the relative mineral content in the ECM for each sample, the ratio of the intensity for the characteristic inorganic phosphate contribution at 1027  $\text{cm}^{-1}$  to the intensity for the total amide I and II contributions was calculated (**Figure 46C**). The intensity of either component is herein defined as the integrated peak area of the single 1027  $\text{cm}^{-1}$  contribution in the case of phosphate and the summed integrated peak area of either contribution in the case of the amide I and amide II bands. Results show that the ratio of the intensity of the phosphate contribution to the amide contribution increases significantly after 21 days, then after 35 days (**Figure 46C**). These increases may be correlated with an extensive mineralization of the matrices.

Interestingly, IR spectra showed the presence of a band due to  $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$  at 830-890  $\text{cm}^{-1}$  (see **Figure 46B**), which is observed in all samples except the Prehyp. The presence of this

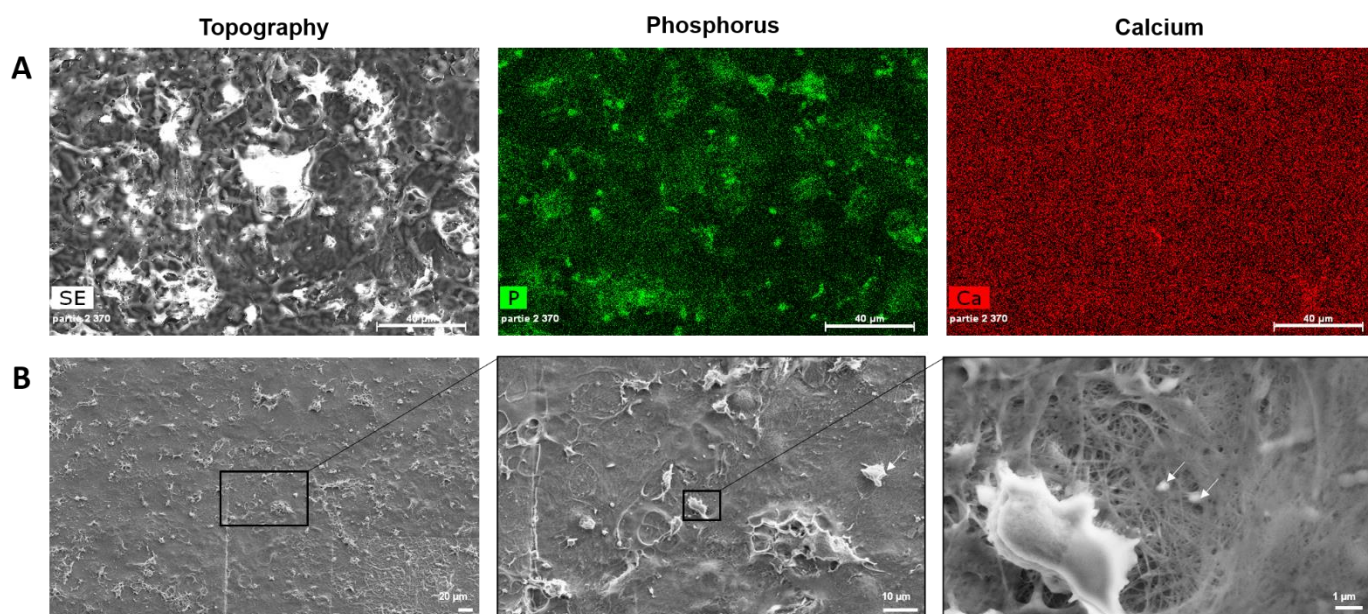


band, particularly in the Hyp mineralized matrix (42 days), combined with XRD data, support the formation of poorly crystalline carbonated-HAP.



**Figure 46.** (A-C) IR spectra recorded on the matrices of Prehyp and Hyp chondrocytes and the quantification of relative mineral content throughout Hyp differentiation by using intensity ratio of particular IR bands

In contrast to the mineralized areas of chondrocyte cultures, no calcium accumulated in the non-mineralized areas (**Figure 47A** and **Figure S10**). Nevertheless, phosphorus was observed in non-mineralized areas, although in much lower quantity than in mineralized areas (**Figure S10A**). Interestingly, phosphorus was concentrated as small spots of 0.5 to 5  $\mu\text{m}$  (**Figure 47A**). Structures of similar size were found on the matrix of hypertrophic chondrocyte cultures (**Figure 47B** middle and right panels). Other smaller structures of about 400-500 nm were also observed (**Figure 47B** right panel, arrows).



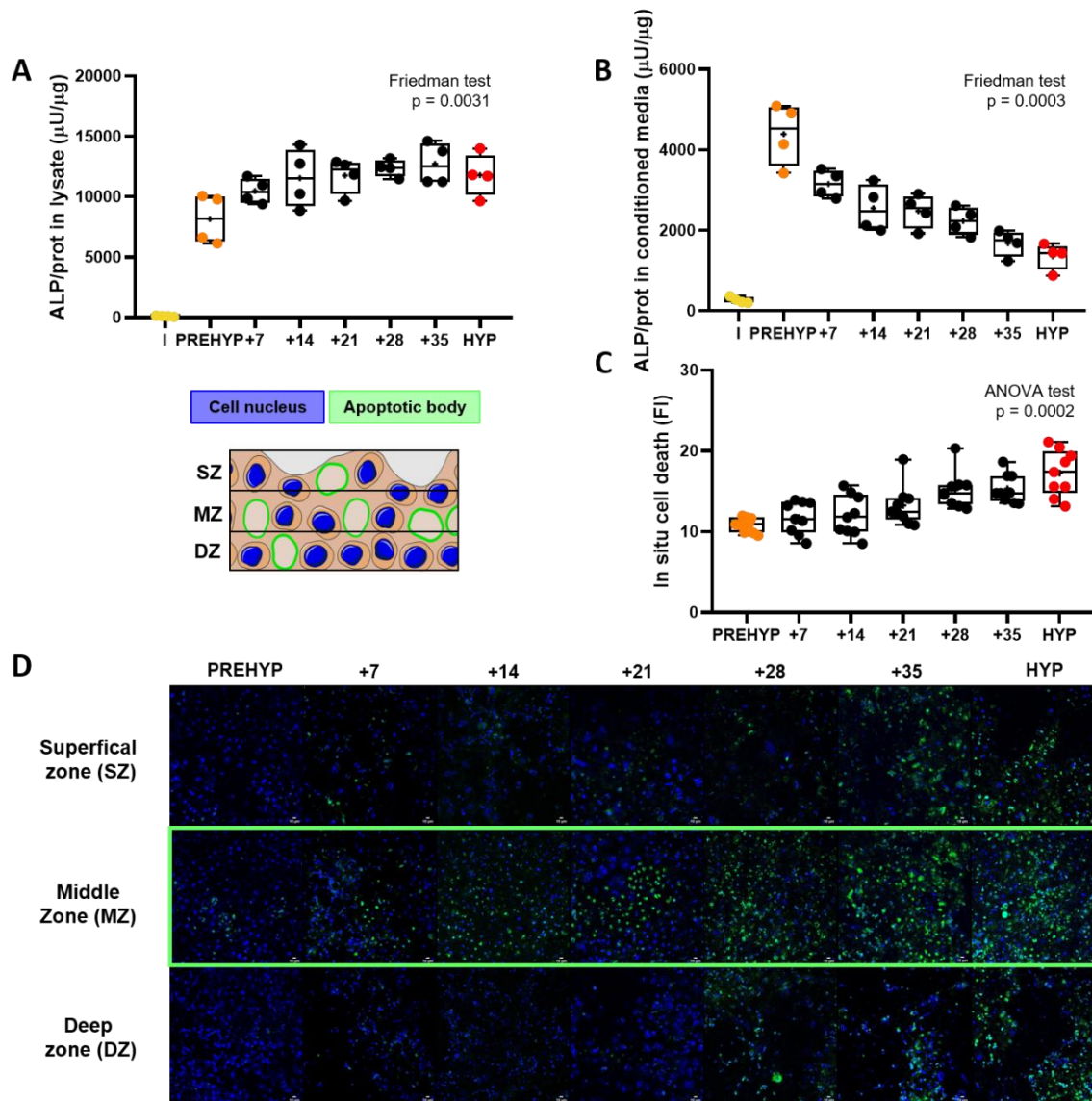
**Figure 47.** (A) EDX mapping of this matrix showing that this population is phosphor rich. (B) SEM images of chondrocytes matrix recorded away from the mineral. Zoom on an extracellular vesicle population All images were recorded on chondrocytes matrix 21 days after Hyp induction.



#### *4.4.2. Increased alkaline phosphatase activity and cell death during hypertrophic differentiation of prehypertrophic chondrocytes*

Alkaline phosphatase plays a pivotal role in mineralization process through the generation of inorganic phosphate. While iMACs displayed a very low alkaline phosphatase enzymatic activity, both in cell lysates and supernatants, a 74.5 and 16.5-fold increased activity was observed in Prehyp chondrocytes in lysates and supernatants respectively (**Figure 48A** and **B**). The activity of phosphatase alkaline further increased in cell lysates when hypertrophy was induced (1.5-fold,  $p = 0.0031$ ) (**Figure 48A**). As soon as 7 days after hypertrophy induction, the enzymatic activity of alkaline phosphatase indeed reached its maximum and remained constant until the end of the kinetics. In contrast, it progressively decreased in conditioned media after hypertrophy induction (**Figure 48B**).

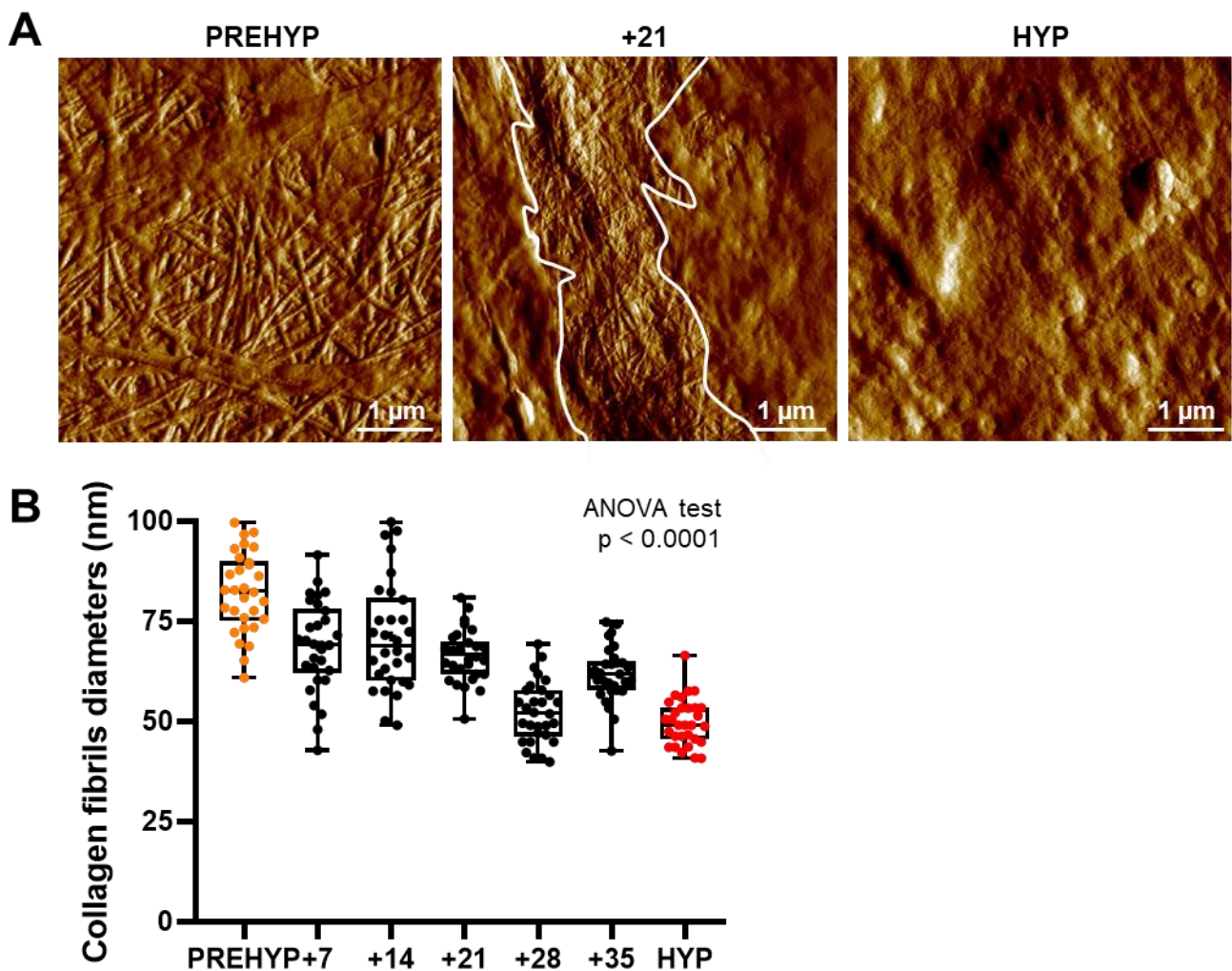
We next investigated the occurrence of cell death after hypertrophic induction of chondrocytes since cell death may be involved in the mineralization of Hyp chondrocyte matrix.<sup>590</sup> Some TUNEL-positive cells were observed in cultures of prehypertrophic chondrocytes (**Figure 48C** and **D**). Their number progressively increased from the time of hypertrophy induction to the end of the kinetics ( $p = 0.0002$ ). Interestingly, confocal microscopy showed that TUNEL-positive cells were mainly observed in the middle area of the cultures. Few apoptotic cells were indeed found either at the top of the cultures or at its bottom, where they were only observed late after the induction of hypertrophy (**Figure 48C** and **D**).



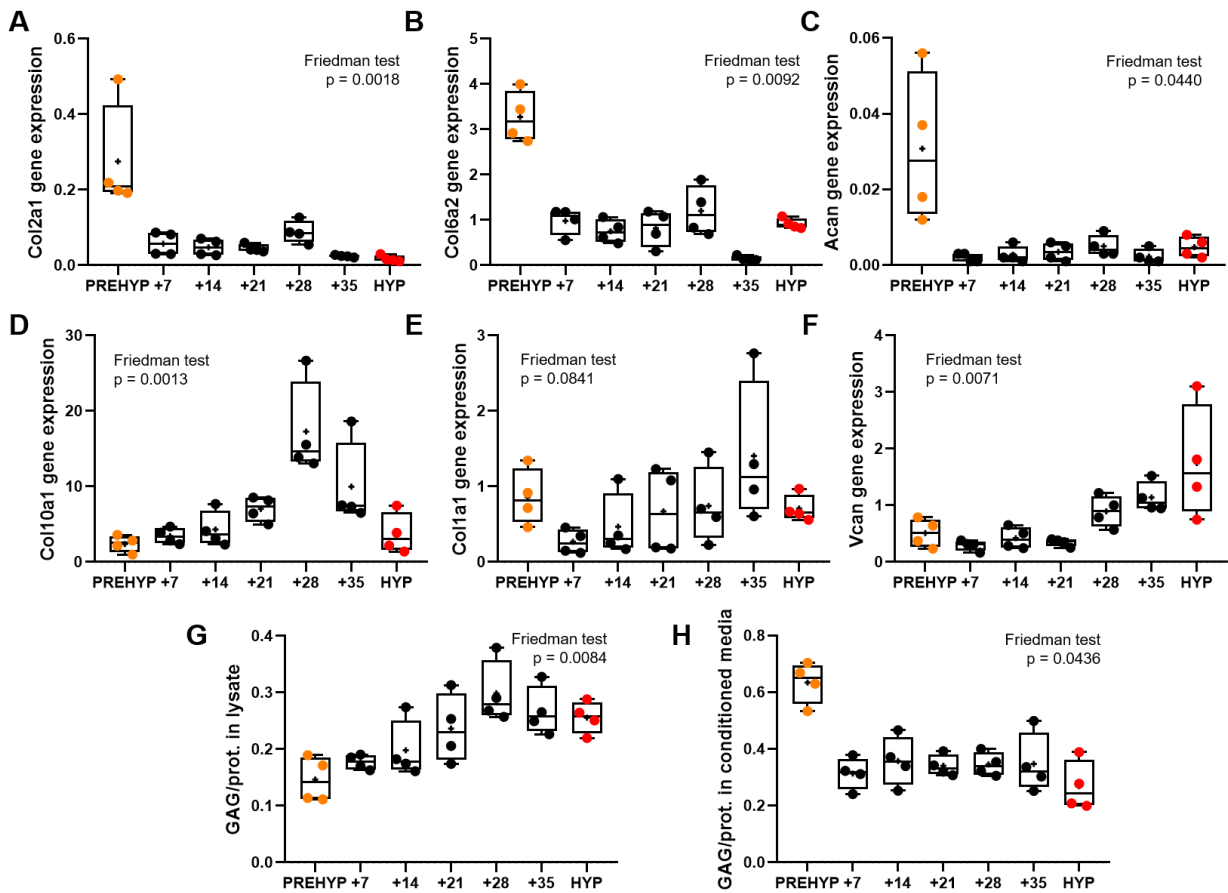
**Figure 48.** (A-B) Measurement of ALP activity associated with Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes in lysate and conditioned media, respectively. (C-D) Apoptosis analysis. (C) Quantification of in situ cell death according to Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes. (D) CLSM images recorded at different matrix depth showing the predominant presence of apoptotic body in middle zone.

#### 4.4.3. Alteration of ECM structure and composition during hypertrophic differentiation of prehypertrophic chondrocytes

Since matrix mineralization can be accompanied by changes in matrix composition and structure, we analyzed its structure and organization by AFM. Nanoscale analysis of chondrocyte cultures showed that both fibrillar and non-fibrillar matrices were observed in cultures of Prehyp chondrocytes (**Figure 49A**). Interestingly, the surface occupied by the non-fibrillar matrix increased after hypertrophy induction. In addition, the diameter of collagen fibrils gradually decreased during the 42-day kinetics of hypertrophic differentiation ( $p < 0.0001$ ). While collagen fibrils had a mean diameter of  $82.2 \pm 10.0$  nm in cultures of Prehyp chondrocytes, the mean diameter of collagen fibrils was  $65.5 \pm 6.4$  nm and  $49.8 \pm 5.8$  nm, 21 and 42 days after the induction of hypertrophy, respectively (**Figure 49B**).



**Figure 49.** (A) AFM characterization of the matrix during hypertrophic differentiation of Prehyp chondrocytes: shift from the non-fibrillar to fibrillar matrix. (B) The collagen fibril mean diameter of the calcified matrix of Hyp chondrocytes is compared to that of osteoblast, since they also calcify their matrix.

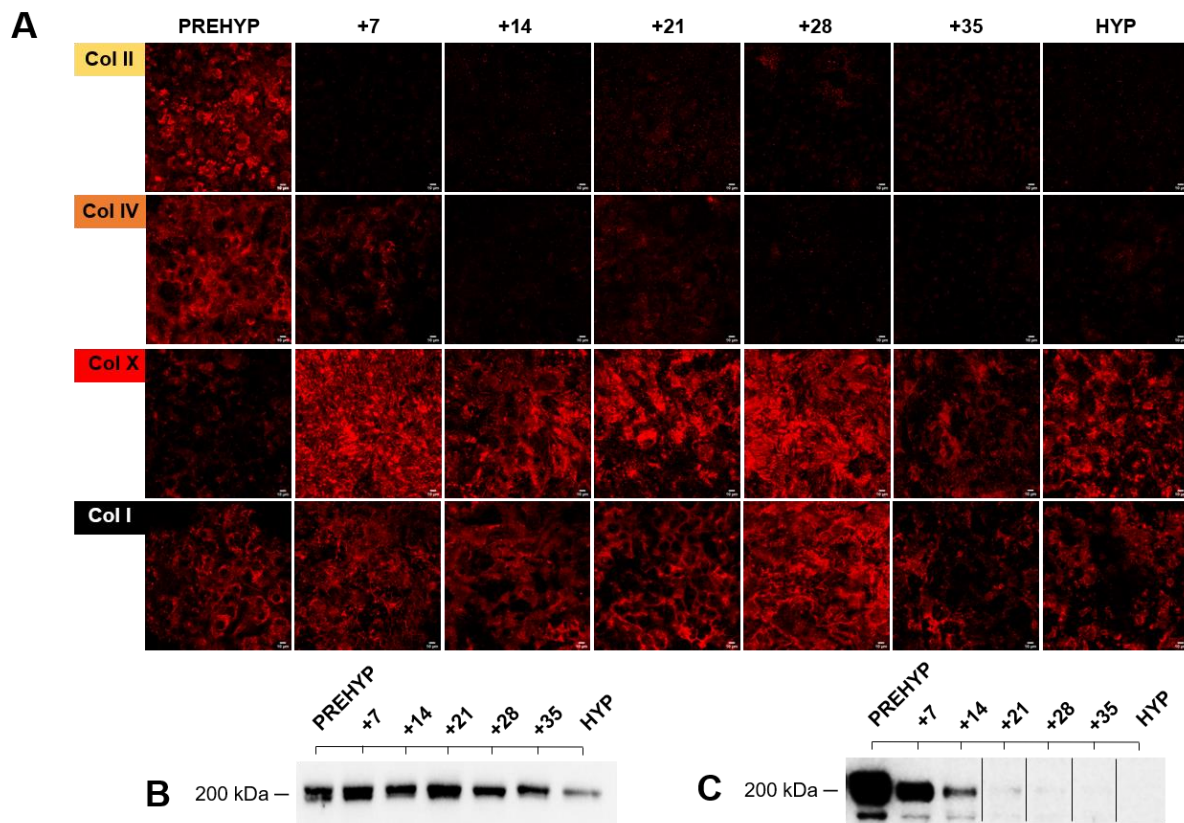


**Figure 50.** (A-B and D-E) Variation in the gene expression of col2a1, col6a2, col10a1 and colla1 encoded for type II, VI, X and I collagens, respectively (C) Variation in the gene expression of Acan, the aggrecan encoded gene (F) Variation in the gene expression of Vcan, the versican encoded gene (G-H) Assaying GAG, constituent unit of proteoglycans, level associated with Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes in lysate and conditioned media, respectively.

This changes in matrix organization and structure may result from an alteration of its composition. Indeed, the differentiation of iMACs into prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes was associated with a progressive drop in the mRNA expression of Col2a1, Col9a1 and Acan (**Figure S9**, Supplementary Information). When Prehyp chondrocytes differentiated into Hyp chondrocytes, this decrease occurred during the 7 first days (4.8-, 17.9- and 15.4-fold decrease for Col2a1, Col9a1 and Acan, respectively), then the mRNA expression remained constant until the end of the 42-day kinetics (**Figure 50A,C** and **Figure S9** in Supplementary Information). A similar pattern of expression was observed for Col6a1 after the induction of hypertrophy ( $p = 0.0092$ ) (**Figure 50B**). However, the mRNA expression of Col6a1 was strongly induced when iMACs differentiated into prehypertrophic chondrocytes (**Figure S9**, Supplementary Information). In contrast, there was an increase in the mRNA expression of Col10a1 and versican during hypertrophic differentiation of prehypertrophic

chondrocytes ( $p = 0.013$  and  $p = 0.0071$  for Col10a1 and versican, respectively) (**Figure 50D and F**). This increase in Col10a1 expression reached a peak at day 28 before decreasing, whereas the expression of versican progressively increased by day 21 to the end of the kinetics.

In addition to changes in the gene expression pattern of ECM components, deep modifications of the composition of the ECM were also observed. The concentration of GAG in cell and matrix lysates progressively increased after hypertrophic induction and reached a plateau at day 28 (1.6-fold increase,  $p = 0.0084$ ) (**Figure 50G**). In contrast, a 2.1-fold decrease in GAG release in chondrocyte conditioned media was found during the first 7 days after hypertrophic induction (**Figure 50H**). Similarly, type II and type VI collagens accumulated in the matrix of prehypertrophic chondrocytes, whereas 7 days after induction of hypertrophy, both collagens can only be weakly observed (**Figure 51A**).

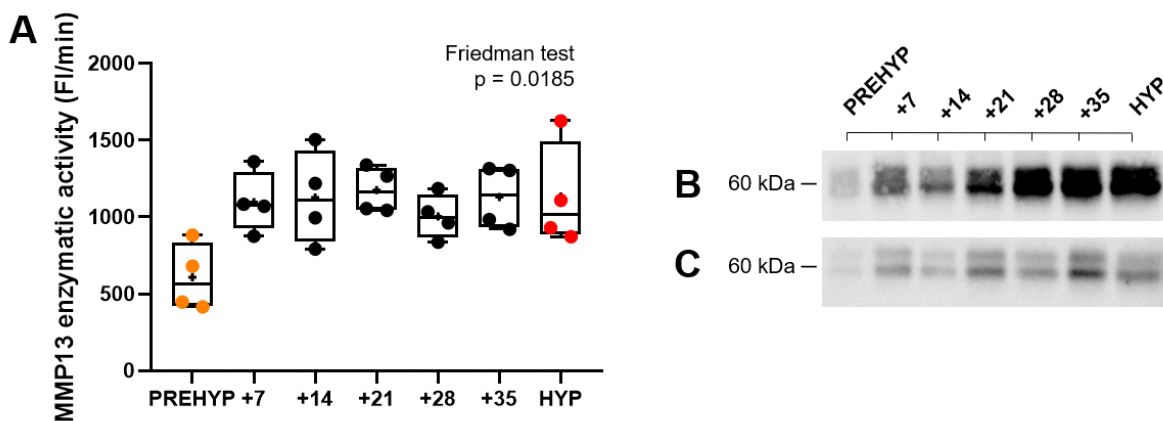


**Figure 51.** Collagenic matrix remodeling during Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes (A) CLSM images recorded on matrix of chondrocytes undergoing Hyp differentiation. Immunofluorescence labeling show the evolution of the different collagen type mentioned above. (B,C) Assaying the variation of type VI and type II collagen level in cell lysate, left and right WB panels respectively.



Western blot analysis of cell lysates also showed the gradual decrease in type VI collagen and the disappearance of type II collagen in cell lysates after the induction of chondrocyte hypertrophy (**Figure 51B and C**). Conversely, type X collagen mostly accumulated in chondrocyte matrix during the first 7 days after hypertrophic induction and remained present in chondrocyte matrix until the end of the kinetics (**Figure 51A**). Type I collagen was also observed in matrix of chondrocyte cultures whatever their hypertrophic state and without any apparent modification of its quantity (**Figure 51A**). Moreover, no variation in the expression of Colla1 was detected during the culture time (**Figure 50E**).

The remodeling of ECM was associated with an increase in MMP-13 after the induction of hypertrophy (**Figure 52A**). Whereas low levels of MMP-13 protein were detected in cell lysates and conditioned media of prehypertrophic chondrocytes, MMP-13 levels increased as early as 7 days after hypertrophic induction both in cell lysates and conditioned media and then accumulated gradually during the course of the 42-day kinetics (**Figure 52B and C**). Interestingly, the increase in MMP-13 protein was mainly observed in cell lysates, as compared to conditioned media. Moreover, a strong MMP-13 enzymatic activity was measured in cell cultures. This activity, already detected in prehypertrophic chondrocytes, showed a 1.8-fold increase 7 days after the induction of hypertrophy and then remained constant ( $p = 0.0185$ ) (**Figure 52A**).

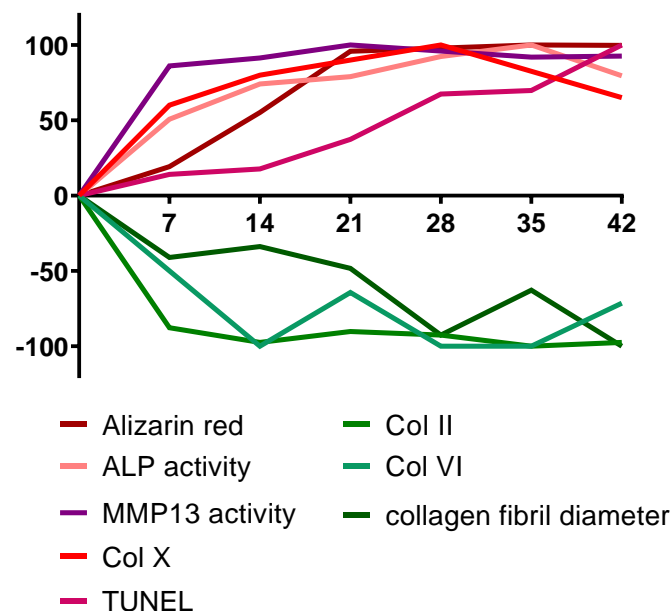


**Figure 52.** (A) Measurement of MMP-13 activity on lived cells. The latter is the main collagenase degrading type II collagen (B,C) Assaying the variation of MMP-13 level in cell lysate and conditioned media, high and low WB panels respectively.

Together, these results show that prehypertrophic to hypertrophic differentiation of chondrocytes resulted in strong modifications in matrix organization and composition. Notably, the replacement of type II to type X collagen rich matrix, which was an early event after induction of hypertrophy, was associated with the increase in MMP-13 enzymatic activity.

#### 4.4. Discussion

Calcified cartilage is mainly composed of hexagonal type X collagen and large amount of CaP mineral, primarily HAP, which represents about 65 % of its weight.<sup>331,332</sup> This mineralized tissue, located between articular cartilage and bone as well as in the growth plate represents the transitional zone between the non-calcified cartilage and subchondral bone, diminishing the existing mechanical gradient. Calcified cartilage seems, also, to play a pivotal role in the tissue transition allowing non-calcified articular cartilage to be replaced by bone through endochondral ossification process. Such a process is thought to be orchestrated by hypertrophic chondrocytes, which produce type X collagen and mineralize their matrix. Furthermore, hypertrophic differentiation of chondrocytes is observed in OA cartilage and is suspected to play a pivotal role in cartilage degradation and its replacement by sclerotic subchondral bone.<sup>383,385,575–578</sup> Nevertheless, the sequence of remodeling events of cartilage matrix associated with its mineralization is not completely characterized, especially for articular cartilage. Herein, we show, thanks to a model of progressive hypertrophic differentiation of articular chondrocytes,<sup>584</sup> that deep matrix remodeling events precede mineralization (**Figure 53**).



**Figure 53.** Synthetic representation of dynamics of mineralization and collagenic matrix remodeling during the hypertrophic differentiation of articular chondrocytes

#### 4.4.1. Mineralization of chondrocyte matrix

The Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes is associated with the growth of CaP mineral, which mainly developed between the 7<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> days after the induction of hypertrophy (**Figure 53**). This mineral is expected to be a precursor of HAP, most probably amorphous calcium phosphate (ACP). The accumulation of Ca<sup>2+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> within the matrix first results in precipitation into ACP mineral, that is then transformed into poorly crystalline carbonated hydroxyapatite.<sup>591</sup> Stoichiometric HAP is basically composed of calcium and phosphorus with molar ratio of Ca/P equal to 1.67<sup>592</sup>. But biological HAP is non-stoichiometric and is either deficient in calcium or phosphorus. Ca/P molar ratio can thus slightly exceed 1.67, when CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> ions incorporated in the lattice replacing OH<sup>-</sup> and/or PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ions.<sup>593</sup> The computed Ca/P ratio of 1.72 ± 0.06 extracted from EDX analysis and XRD data support, indeed of substitute et poorly crystalline HAP formed during Hyp differentiation of chondrocyte.

#### 4.4.2. Increase of Alkaline phosphatase activity

ALP is a major partner involved in mineralization. The regulation of mineralization is accomplished by the ratio of Pi to inorganic pyrophosphate (PPi). ALP activity hydrolyzed PPi to Pi for its incorporation into basic CaP crystals,<sup>594,595</sup> avoiding the excess of inhibitory PPi levels that prevents the transformation of ACP to HAP *in vitro*.<sup>596-598</sup> We observed that ALP activity in cell lysates increased early after the induction hypertrophy and preceded the strong increase in matrix mineralization observed between the 7<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> days after the induction of hypertrophy. However, prehypertrophic chondrocytes already display a strong alkaline phosphatase activity but did not mineralize their matrix. This suggests that despite the activity of alkaline phosphatase, prehypertrophic chondrocytes either express also an inhibitor of mineralization or do not express another partner required for the mineralization of the matrix.

#### 4.4.3. Increase of chondrocyte death

Our results reveal the rising presence of apoptotic chondrocyte bodies in the matrix. During the process of endochondral ossification chondrocytes progress through stages of terminal hypertrophic differentiation culminating in apoptotic death. As they degenerate, hypertrophic chondrocytes release large quantities of phosphate ions, which would promote



mineralization of the extracellular matrix<sup>573,599-601</sup> Indeed, apoptotic bodies can, themselves, be mineralization initiators<sup>572,587,590,602,603</sup> The apoptotic bodies have a size of 0.5 to 2  $\mu\text{m}$  which could correspond to the "debris" we observed in SEM but also to the phosphate rich spots observed in EDX. However, these spots did not contain the calcium necessary for mineralization. In addition, the increase in the number of TUNEL-positive cells followed a different kinetic from that of mineralization, which increases abruptly from day 7 to reach a plateau at 21 days (**Figure 53**). In contrast, chondrocyte apoptosis progressively increased during the course of hypertrophic differentiation. This suggests that, in the present model of hypertrophic differentiation of chondrocytes and matrix mineralization, apoptosis do not play an important role in the mineral formation.

#### 4.4.4. ECM remodeling

The calcification of the matrix associated with the Hyp differentiation of Prehyp chondrocytes is accompanied by the remodeling of the collagenic matrix, where the degradation of type II fibrillar collagen gives way to a matrix rich in type X collagens. Our results reveal, indeed, a drop in type II collagen (mRNA and matrix immunolabelling) and aggrecan (mRNA) as early as 7 days after the induction of hypertrophy. Conversely, a strong increase in Col10a1 mRNA was observed. The deposition of type X collagen in the matrix occurred mainly during the first 7 days. Interestingly, the type X collagen and ALP, two markers of chondrocyte hypertrophy, showed the same kinetics (**Figure 53**). These matrix changes were accompanied by an increase in MMP-13 activity. The irreversible loss of type II collagen fibrils seems therefore to result from both the cessation of its expression by chondrocytes undergoing Hyp differentiation and its degradation by MMP-13. The latter, is, indeed, the primary MMP involved in the cleavage of type II collagen and plays a key role in cartilage breakdown during OA progression<sup>604-606</sup> In contrast, Col1a1 expression and type I collagen deposition in the matrix remained stable throughout the hypertrophic differentiation process. . Few amounts of type I collagen are detected in healthy hyaline articular cartilage. Type I collagen is also present in OA cartilage.<sup>607-613</sup> Nevertheless, its expression in chondrocyte cultures may also reflect the presence of some dedifferentiated chondrocytes or chondrocytes differentiated into osteoblasts. Type I and II collagens are fibrillar collagens, which organize into fibrils. Interestingly, we observed a progressive decrease in the diameter of collagen fibrils during chondrocyte hypertrophic differentiation. This could reflect the disappearance of type II collagen fibrils due

to their proteolysis by MMP-13; the only remaining fibrils would then be made up of type I collagen. Consistently, the diameter of type I collagen fibrils found in the matrix of murine osteoblast cultures is similar to that of the matrix fibrils of hypertrophic chondrocyte (**Figure S13**)

Chondrocyte matrix is also characterized by high content of proteoglycans, especially, aggrecan, the most abundant proteoglycan of non-calcified cartilage matrix. Acan gene expression dropped during the 7 days after hypertrophic induction. Similarly, the decrease in the release of GAGs in chondrocyte conditioned media mainly occurred during the first 7 days of the kinetic. In contrast, the content of GAGs within cell lysates progressively increased at the beginning of the kinetic. This may be explained by an increased expression of other proteoglycans. Moreover, versican, another large chondroitin sulfate proteoglycan, showed an increased mRNA expression during the hypertrophic differentiation of prehypertrophic chondrocytes. Nevertheless, versican may not form aggregates with HA as a result of rise in both hyaluronidase 1 and 2 gene expression (**Figure S14**), which have been surmised to play key roles in HA degradation.

The remodeling of the matrix may be directly involved in its mineralization. Rather than the shift between type II and type X collagen rich matrices, changes in the pattern of proteoglycans expressed by chondrocytes may play a role in the mineralization process. Genge *et al.* indeed showed that both type II and X collagens markedly increased mineral formation,<sup>614</sup> suggesting that the inhibition of mineralization in cartilage is more attributed to the presence of highly anionic proteoglycans than to the collagen type. *In vitro* studies conducted by Chen *et al.* have shown that proteoglycans from cartilage inhibit HaP growth in solution.<sup>96,615</sup> However, Wojtas *et al.* recently suggest that GAGs play a crucial role in crystal nucleation and/or growth during collagen mineralization.<sup>616</sup> The proteoglycans may thus promote mineralization in a similar manner to SIBLING proteins, since both groups of molecules are highly negatively charged and are closely associated with collagen fibrils.<sup>616-618</sup> Therefore, cartilage matrix mineralization may be promoted or inhibited depending on the proteoglycans expressed by chondrocytes. Interestingly, it is noteworthy that versican is overexpressed in OA cartilage<sup>612,619</sup>, which show BCP calcifications.<sup>388</sup> Versican has been recently involved in the calcification of smooth muscle cells.<sup>620</sup>

During the differentiation of iMACs into Prehyp chondrocytes, chondrocytes synthesize a matrix mainly composed of type II, VI and IX collagen, in addition to aggrecan aggregates.

This ECM is remodeled during the hypertrophic differentiation of Prehyp chondrocytes, allowing the matrix to be mineralized (**Figure 53**) :

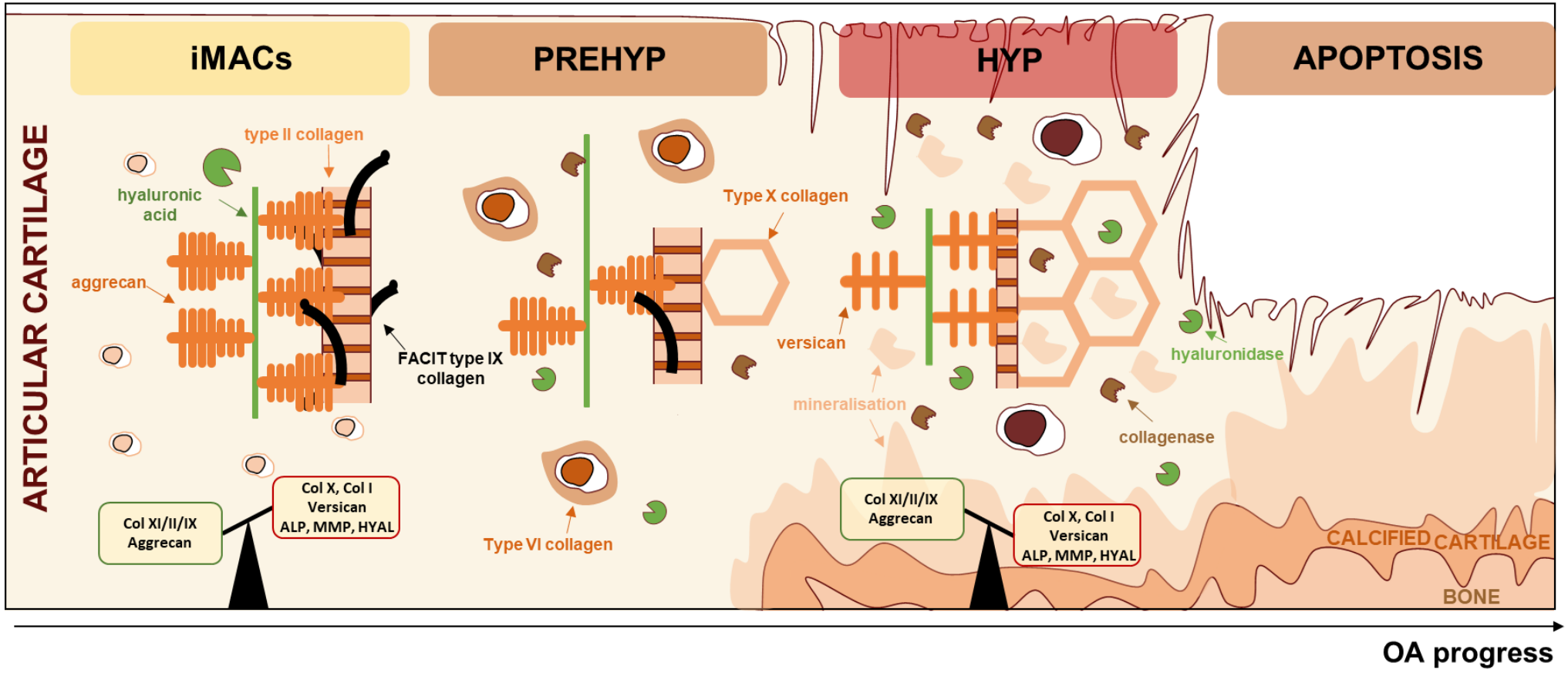
The first phase is characterized by the drop in aggrecan, type II and type IX FACIT collagen mRNA expression and by the rapid removal of type II collagen fibrils by MMP-13 collagenase. During this phase, type X collagen synthesis is initiated and mostly accumulated in ECM during the first 7 days after hypertrophic induction. In the same time, enzymatic activity of ALP reached its maximum and the first minerals are formed in the ECM. Iyama *et al.* showed also an inverse pattern of expression between type X collagen mRNA and types II and IX collagen mRNAs in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification.<sup>581</sup> A correlation between the extend of mineralization and the expression type X collagen was also observed.<sup>389</sup> As previously shown in ascorbate independent differentiation of fetus human chondrocytes *in vitro* model used by Kirsch *et al.*,<sup>621</sup> our results also demonstrate that the production of type X collagen by hypertrophic chondrocytes precedes mineralization of the ECM.<sup>580,621-623</sup> Mwale *et al.* showed that isolated fetal growth plate chondrocytes in culture synthesized an ECM enriched in type II collagen, proteoglycan aggrecan, and type IX collagen. Subsequently as mineralization progresses type II and type IX collagen but not the proteoglycan aggrecan, are resorbed coincident with a markedly increased cleavage of type II collagen by collagenase as mineral is deposited in the matrix.<sup>624</sup>

During the second phase, ALP activity remained constant until the end of the kinetics. Concurrently, minerals increased in size and number in ECM enriched with type I and type X collagen. The gradually decreased of the collagen fibrils diameter during the 42-day kinetics of hypertrophic differentiation may reflect the shift from type II to type I fibrillar collagen. In addition, versican progressively increased by day 21 to the end of the kinetics simultaneously with hyaluronidase. The number of apoptotic bodies increased significantly between days 21 and 35 after hypertrophic induction. Therefore, the formation and propagation of CaP mineral into the matrix seems to be promote by the presence of phosphorus rich apoptotic body and versican.

## 4.5. Conclusion

Hypertrophic differentiation of prehypertrophic chondrocytes induced a matrix turnover, *i.e.* drop in type II collagen and aggrecans and appearance of type X collagen, that precedes matrix mineralization. Matrix turnover is accompanied by an increase in the concentration and the enzymatic activity of MMP-13. EDX analyses revealed that the newly formed minerals are poorly crystalized hydroxyapatite. The chemical mapping also showed phosphorus concentrated in cellular debris, which may originate in part from chondrocyte apoptosis that increased during the hypertrophic differentiation of chondrocytes.

This *in vitro* model of progressive articular chondrocyte hypertrophic differentiation appears to be a good model to study the mineralization process whose mechanisms are still not completely elucidated. Our findings provide new insight into the dynamics of matrix events leading to cartilage mineralization resulting from hypertrophic chondrocyte differentiation. They give relevant guidelines for the understanding of remodeling events that occur at the osteochondral junction in osteoarthritis.





# **Chapitre 5**

**Les techniques de caractérisation de surface : des outils puissants pour élucider le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau supramoléculaire**

—

**Discussion générale et Perspectives**

Comme l'a démontré le premier chapitre consacré à une revue de la littérature sur les tissus mésenchymateux ostéoarticulaires, l'ECM des tissus conjonctifs est complexe tant dans sa composition que dans sa structure. Les propriétés biomécaniques essentielles au bon fonctionnement des tissus résultent de l'interaction subtile entre les composants de l'ECM au travers d'assemblages supramoléculaires. De petites variations en termes de composition et de structure peuvent avoir des conséquences significatives sur l'intégrité du tissu et sur ses propriétés biomécaniques, entraînant des troubles fonctionnelles et le développement de pathologies. Bien que les analyses biochimiques et histologiques soient couramment utilisées pour caractériser l'ECM des tissus, l'obtention d'information fine et quantitative *via* ces techniques conventionnelles reste difficile en raison de la complexité structurelle de l'ECM qui nécessite une analyse à l'échelle supramoléculaire. En outre, les analyses biochimiques telles que l'analyse protéomique sont destructives, car ces méthodes nécessitent la digestion préalable du tissu. En revanche, les techniques de caractérisation physicochimique telles que l'AFM et l'XPS permettent l'analyse de la structure, de la composition et de la réponse mécanique, à l'échelle supramoléculaire. Les objectifs de cette thèse étaient donc multiples, avec à la fois (1) le développement de méthodes permettant l'analyse de tissus biologiques par de puissantes techniques de caractérisation physico-chimique de surface et (2) la compréhension fondamentale des modifications de l'ECM dans les tissus ostéoarticulaires malades humains.

Au cours de ma thèse, je me suis concentrée sur l'utilisation de techniques physicochimiques de caractérisation de surface, essentiellement l'XPS et l'AFM, pour suivre les altérations de l'ECM et son remodelage à un niveau supramoléculaire. Cette approche interdisciplinaire, combinant la chimie des matériaux, la science des surfaces et la biologie, permet une meilleure compréhension :

- (1) Des effets d'un traitement modifiant la réticulation sur la structure et les propriétés mécaniques des fibrilles de collagène de l'ECM de capsules articulaires d'épaules humaines disloquées,
- (2) Des altérations matricielles du cartilage arthrosique et des mécanismes les régissant,
- (3) Du remodelage de l'ECM associé à sa minéralisation dans un modèle de différenciation hypertrophique de chondrocytes.



Dans le chapitre 2, l'AFM a été utilisée pour étudier l'effet de la procédure de réticulation UV/riboflavine sur la structure et les propriétés mécaniques de capsules d'épaule malades, qui sont principalement constituées de fibrilles de collagène de type I. Les résultats montrent que la procédure de réticulation a modifié les propriétés biomécaniques des capsules malades, en augmentant la rigidité des tissus sans modification de la structure et de la viabilité cellulaire.

Cependant, certaines limites ressortent de notre étude. Bien que nous montrions un effet du traitement UV/riboflavine sur la rigidité des tissus, nous ne sommes pas en mesure de confirmer que le module élastique mesuré correspond à celui d'un tissu sain. Il serait donc pertinent d'inclure des explants de capsule non luxée pour pouvoir comparer les caractéristiques de leurs fibrilles de collagène à celles des tissus « malade » et traités. Par ailleurs, l'effet du traitement UV/riboflavine a été uniquement analysé sur de petits échantillons de tissus tandis que l'analyse par AFM a été réalisée sur une surface est relativement réduite (quelques microns). On peut donc s'interroger sur l'effet du traitement sur l'ensemble du tissu et sa capacité à engendrer une modification de sa rigidité en profondeur. Le traitement UV/riboflavine pourrait devenir un traitement topique possible en complément de la chirurgie mais il faut pour cela que le traitement ait un effet sur la profondeur entière du tissu. Nous savons également que les mesures à l'échelle nanométrique peuvent différer des mesures mécaniques réalisées à plus grande échelle. La rigidification constatée à l'échelle supramoléculaire, à cette dose de riboflavine et à ce temps d'exposition aux UV, pourrait donc s'avérer insuffisante, autrement dit elle ne suffirait pas à rigidifier assez la capsule pour pouvoir empêcher les luxations de l'épaule. Des investigations supplémentaires, telles qu'une étude dose/réponse, *e.g.* effet de la variation de la concentration en riboflavine et du temps d'exposition aux UV sur la viabilité cellulaire, la structure et les propriétés mécaniques de la capsule, sont également nécessaires pour identifier les conditions cliniquement pertinentes pour le traitement riboflavine/UV. Par ailleurs, même si nous n'avons pas vu d'effet sur la mortalité des cellules évaluée par TUNEL tout de suite après le traitement, une augmentation de la mortalité des cellules à long terme ne peut pas être exclue ; une analyse à plus long terme de la viabilité cellulaire est donc nécessaire. Avant de commencer les études cliniques, il faudrait, également, déterminer l'efficacité et les effets à long terme de la réticulation, les modalités de combinaison de la réticulation et de la chirurgie ainsi qu'estimer les complications que peuvent engendrer une telle procédure. En effet, l'œil et la capsule articulaire de l'épaule n'ont ni les mêmes dimensions, ni la même géométrie, ni même la même matrice. Si la réticulation du collagène cornéen est non invasive

et peu se faire en ambulatoire, la réticulation du collagène de la capsule articulaire devrait nécessiter une intervention plus complexe.

Une étude mécanistique du traitement de réticulation serait également très informative. La structure hiérarchique des fibrilles de collagène définit les propriétés mécaniques des tissus qu'elles composent ; de faibles changements dans la microstructure des fibrilles conduisent souvent à des changements dramatiques des propriétés mécaniques. Il serait donc pertinent d'étudier les sous-structure des fibrilles de collagène dans les explants de tissu sain, luxé et traité.

Qiao *et al.* ont étudié la variation de la sous-structure des fibrilles de collagène lors des dislocations en menant une analyse quantitative des caractéristiques de leur périodicité. Pour cela, des explants murins de nerf sciatique ont été analysés *in situ* par microscopie optique à balayage de type diffusion infrarouge en champ proche (s-SNOM) couplée à l'AFM pour étudier les propriétés structurelles et optiques des fibrilles de collagène en condition physiologique.<sup>625</sup> Dans notre étude, nous avons mesuré la périodicité des fibrilles à partir des images AFM obtenues en mode contact. Bien que cette analyse ait révélé une variation de la périodicité non significative entre les explants de capsules luxées traités UV+R<sub>H</sub> et non traités ( $68.3 \pm 5.4$  nm *versus*  $66.9 \pm 3.2$  nm,  $p = 0.4601$ ), cela n'exclut pas un changement de la sous-structure de la fibrille. En effet, (1) la sous-structure des fibrilles est, par définition, différente après un traitement de réticulation (2) la caractérisation par imagerie AFM (sans couplage) semble être insuffisante pour obtenir des informations aussi fines. Par ailleurs, il convient de noter qu'ici le contrôle est un explant de tissu « malade », on peut donc s'interroger sur la pertinence de la comparaison des périodicités avec ce point de référence ; une comparaison des variations entre la périodicité des fibrilles de tissu sain et de tissu traité serait très utile.

Une étude mécanistique du traitement de réticulation pour déterminer la nature et la densité des réticulations formées seraient, également, très informative pour comprendre l'effet du traitement sur les propriétés mécaniques de la capsule. Depalle *et al.* ont développé un modèle tridimensionnel sur la caractérisation *in situ* de la structure du collagène de type I par cristallographie à rayons X. Ce modèle, qui fournit une représentation simplifiée de la structure des tropocollagènes de type I et de leur assemblage sous forme de fibrille, leur a permis de démontrer un effet de la nature (divalente, trivalente) et de la densité des réticulations sur la réponse mécanique des fibrilles.<sup>626,627</sup> Yoshida *et al.* ont, quant à eux, montré une corrélation positive entre la densité de réticulation et la rigidité du tissu.<sup>628</sup> Afin de déterminer la nature et

la densité des réticulations formées, nos échantillons pourraient être caractérisés par FTIR.<sup>629-</sup>  
632

Dans le chapitre 3, XPS et AFM ont été utilisés pour sonder, respectivement, la composition et la morphologie des cartilages humains, ainsi que les propriétés mécaniques à différents degrés de sévérité de l'arthrose. Le développement méthodologique utilisé dans cette étude a permis d'extraire des informations quantitatives fiables, *i.e.* le pourcentage massique de collagène et d'agrécan, composés majeurs du cartilage, à partir des résultats expérimentaux obtenus par XPS. La fiabilité de ces résultats a été évaluée *via* des corrélations entre les données spectrales. Le travail mené a donc permis de montrer qu'avec une préparation adéquate, il est possible d'analyser par XPS des tissus mous sans avoir de problèmes liés à l'effet de charge, la dégradation de l'échantillons, *etc.* Cette étude ouvre de nouveaux horizons pour la caractérisation de la composition chimique des tissus biologiques mous. Cette caractérisation à l'échelle supramoléculaire qui préserve l'intégrité du tissu, en termes de composition et de structure, pourrait être un outil de diagnostic performant.

Cependant, il convient de noter que l'approche méthodologique, qui fournit une composition supramoléculaire de l'ECM, doit être adaptée au tissu concerné. Ceci implique (1) l'identification de marqueurs spécifiques pour les macromolécules d'intérêt, (2) le développement d'un modèle décrivant la composition de l'ECM du tissu considéré, (3) l'évaluation de la contamination fortuite qui peut provenir de la préparation de l'échantillon, de l'atmosphère ambiante et du spectromètre XPS lui-même. Bien que l'XPS fournit des données quantitatives directes, ces dernières peuvent différer des données disponibles dans la littérature. Pour rappel l'XPS est une technique de caractérisation de surface, *i.e.* environ moins de 10 nm de profondeur est sondée. La contamination de la surface par adsorption de composés organiques est un phénomène omniprésent dans les conditions environnementales courantes.<sup>498</sup> Cette contamination fortuite peut être estimée et contrôlée mais sa présence biaise les pourcentages atomiques et pondéraux calculés.<sup>489,498,556</sup> Une comparaison avec les données de la littérature ne peut donc se faire que *via* la comparaison des ratios des composés d'intérêt. Par exemple, le ratio agrécane sur collagène calculé à partir des résultats XPS obtenus dans cette étude varie de 0,5 (cartilage sain) à 0,75 (cartilage atteint d'arthrose), ce qui est compris dans la gamme des rapports calculés à partir des données disponibles dans la littérature (0,33-0,75).<sup>258,259,544</sup>

D'autres limites doivent être prise en compte lors de l'analyse XPS. Cette dernière fournit une composition chimique fiable à une résolution nanométrique uniquement dans la direction perpendiculaire au plan de la surface. La résolution spatiale de l'XPS est en effet limitée par le diamètre du faisceau de rayons X et la distribution de l'intensité. Il reste donc difficile de se focaliser sur une zone spécifique du tissu sans couvrir la zone environnante, par exemple se focaliser sur le cartilage calcifié pendant l'analyse de la jonction ostéochondrale. Il est donc préférable d'effectuer une cartographie chimique élémentaire à haute résolution de la surface en utilisant d'autres techniques physico-chimiques, telles que l'EDX. Par ailleurs, l'analyse XPS nécessite un ultra-haut vide. L'échantillon doit donc être déshydraté et relativement de petite taille. Ces facteurs peuvent donc être limitants en fonction du tissu. Par exemple, l'analyse directe de bouchons ostéochondraux (**Figure 32C1**) entraîne un dégazage important qui empêche l'analyse. De plus, sectionner l'échantillon peut parfois entraîner une contamination supplémentaire de la zone d'intérêt. L'évaluation de l'impact de la préparation des échantillons est donc essentielle.

L'analyse s'effectuant sous ultra-haut vide, les caractérisations menées par XPS ne permettent pas d'évaluer la quantité d'eau. Il est tout de même possible d'avoir une contribution des molécules d'H<sub>2</sub>O dans le pic O 1s. Cependant, l'XPS ne permet pas de détecter l'hydrogène, ce qui rend donc le pic O 1s très difficilement interprétable. Or l'ECM du cartilage contient une quantité importante d'eau (65-85% en poids). L'XPS ne permet donc pas d'évaluer la présence de ce composant majeur qui peut jouer un rôle crucial dans le développement de la pathologie. Le suivi du taux d'hydratation peut être, en revanche, réalisé grâce à d'autres techniques de caractérisation physicochimique telle que la spectroscopie Raman.<sup>473,633-637</sup>

Comme chaque technique, l'XPS a ses propres avantages et limites. Néanmoins, cette technique puissante fournit des informations complémentaires à celles déjà acquises par d'autres caractérisations physico-chimiques de l'ECM du cartilage.<sup>473,638,639</sup>

Des études complémentaires concernant les changements structuraux et les propriétés mécaniques ont été réalisées par AFM. Bien que l'AFM soit largement utilisée pour sonder le cartilage, il existe une grande disparité dans la littérature en raison des différentes conditions et méthodologies expérimentales.<sup>399,431,509,563</sup> Dans ce document, une approche méthodologique pour les analyses AFM a été développée pour réaliser une caractérisation rigoureuse du cartilage. Elle concerne à la fois la préparation des échantillons, les conditions de caractérisation

et le traitement des données. Tous les bouchons ostéochondraux ont été prélevés au niveau du plateau tibial externe afin d'éviter toute variation dues à la localisation dans l'articulation.<sup>401</sup> Une minutie particulière a été dédiée aux choix des pointes AFM, qui peuvent induire de fortes variations dans les mesures. La même pointe a été utilisée pour chaque série d'échantillons. Toutes les images AFM et les courbes de force ont été enregistrées dans différentes zones de l'ECM identifiées grâce à la morphologie des chondrocytes. Les données quantitatives ont été, quant à elle, extraites des images enregistrées ; la périodicité a été calculée à partir de la superposition des lignes de scan extraites des images AFM et des dérivées secondes associées.

L'AFM présente deux limitations majeures:

- 1) L'échantillon à analyser doit être de petite dimension puisqu'il doit être déposé sur une lamelle de *c.a.* 12 mm de diamètre. Les lames couramment utilisées pour les colorations histologiques et les immunomarquages sont traités pour améliorer l'adhérence des tissus, ce qui n'est pas le cas pour les lamelles de verre. On assiste donc fréquemment à un détachement du tissu lors des analyses AFM en phase liquide, *i.e.* dans le PBS. Pour éviter une infiltration de liquide entre le tissu et la lamelle lors de l'analyse mécanique des explants de cartilage et de capsule articulaire, nous avons fonctionnalisé les lamelles de verre avec de la polydopamine. Cette dernière joue un rôle clé dans l'adhérence des moules aux surfaces humides.
- 2) Il convient de noter que la surface de la zone analysée par AFM est relativement faible (quelques microns). Pour s'assurer que la structure est représentative de la zone d'intérêt, il est donc essentiel de réaliser des images à plusieurs endroits différents. Pour étudier la structure du tissu sur une grande surface, il serait préférable d'utiliser le TEM. Cependant, une telle analyse requiert une préparation de l'échantillon plus stricte que par AFM.

Dans cette étude, l'évolution de l'ECM du cartilage humain au cours de l'arthrose a été évaluée, en termes de composition de structure et de propriétés mécaniques, à l'échelle supramoléculaire. Cette étude a permis de mettre en évidence 2 phases : (1) une tentative de réparation, *i.e.* augmentation de la concentration en collagène et agrécane, et (2) une dégradation irréversible du cartilage, *i.e.* diminution significative de la concentration en collagène et agrécane. Par ailleurs, des modifications structurales similaires à celles observées dans le cartilage arthrosique ont été observées sur des échantillons non arthrosiques traités par des enzymes, l'hyaluronidase et la collagénase, *i.e.* l'augmentation du diamètre des fibrilles qui s'explique par leur tendance à se coller les unes aux autres et à fusionner, et l'apparition de

particules sphériques pouvant être dus à l'agrégation de composés de dégradation, notamment de fibrilles de collagène. Nos travaux ont donc permis de souligner le rôle central de l'équilibre homéostatique sur la progression de l'arthrose. Il serait cependant nécessaire de (1) augmenter le nombre de patients par score pour valider ces observations et (2) intégrer des échantillons sains provenant de donneurs jeunes. Il convient, en effet, de noter que le vieillissement affecte également le remodelage de l'ECM. Par ailleurs, dans cette étude, nous avons conclu que la première phase d'arthrose se caractérise par une hausse de la synthèse en collagène et agrécane sans preuve directe, *i.e.* cette conclusion a été tirée à partir des données XPS qui révèlent une augmentation du contenu en collagène et en agrécane. Il serait donc instructif de procéder à un dosage des GAG et du collagène, *e.g.* dosage de l'hydroxyproline, afin de confronter ces résultats à ceux obtenus par XPS. Cependant, tout comme l'XPS, ces analyses biochimiques ne permettent pas de différencier les types de collagène présents dans le tissu. Il serait donc pertinent d'effectuer également une analyse protéomique et/ou transcriptomique.

Une dégradation de l'agrécane est observée au cours de la seconde phase d'arthrose. Cette perte d'agrécane peut résulter de multiples mécanismes de dégradation : (1) le clivage de l'HA par la hyaluronidase qui réduit les agrégats d'agrécane, (2) le clivage de la protéine centrale au niveau du domaine interglobulaire (Glu<sup>373</sup>-Ala<sup>374</sup>) et du domaine de la chondroïtine sulfate (Glu<sup>1480</sup>-Gly<sup>1481</sup>) par les agrécanasés, *e.g.* les ADAMTS-4,<sup>640,641</sup> (3) le clivage de la protéine centrale au niveau du domaine interglobulaire (Asn<sup>341</sup>-Phe<sup>342</sup>) par la stromélysine, *e.g.* MMP-3. Cependant, il convient de noter que la taille des fragments d'agrécane retrouvés dans le liquide synovial arthrosique correspondent majoritairement à ceux générés par le clivage des agrécanes par les ADAMT.<sup>642,643</sup> En effet, les résultats de l'étude de Struglics *et al.* suggèrent que les MMP sont principalement impliquées dans le remodelage normal de l'agrécane et pourraient avoir un rôle moins actif dans la dégradation de l'agrécane au cours de l'arthrose.<sup>644</sup> En effet, la dégradation pathologique de l'agrécane est principalement engendrée par les ADAMTS.<sup>642</sup> Bien que la hyaluronidase soit plus connue pour jouer un rôle dans la dégradation de l'HA due au vieillissement,<sup>645</sup> l'utilisation de cette enzyme nous permet d'étudier l'impact de la perte d'agrécane sur la structure du cartilage et de surmonter le manque d'ADAMTS commercialisées.

De manière intéressante, la digestion enzymatique par la collagénase conduit également à une perte d'agrécane. Cette dernière pourrait résulter de la dégradation du collagène FACIT de type IX localisé à la surface des fibrilles de collagène de type II.<sup>304</sup> Ce dernier, qui interagit

avec les agrécane, présente une triple hélice rompue qui serait plus sensible à l'action des collagénases. Cependant, cette étude n'apporte pas de preuve directe de l'implication du collagène FACIT de type IX dans la perte d'agrécane. Il serait donc intéressant de réaliser un immunomarquage du cartilage avant et après digestion par la collagénase et sur le cartilage arthrosique pour évaluer la présence du collagène FACIT de type IX. Des investigations supplémentaires sont donc nécessaires pour élucider le rôle du collagène FACIT de type IX dans l'interaction entre les fibrilles de collagène de type II et les agrégats d'agrécane.

L'étude de Budde *et al.* a démontré que les souris déficientes en collagène de type IX (KO Col9a1) présentent un cartilage articulaire avec des fibrilles de collagène de type II plus larges que celles des souris « contrôle » (un diamètre moyen de 68.7 nm *versus* 61.9 nm).<sup>152</sup> De la même manière, Stoltz *et al.* ont également démontré que l'absence de collagène de type IX engendre un épaississement des fibrilles qui ont tendance à se regrouper en faisceau.<sup>521</sup> Par ailleurs, les études de fibrillogenèse *in vitro* ont démontré que les mélanges de collagènes II et XI forment des fibrilles fines et uniformes d'un diamètre d'environ 20 nm qui ressemblent étroitement aux fibrilles présentes dans la PCM du cartilage.<sup>289,325,326,646,647</sup> Cependant, cette structure n'est pas stable en absence de collagène FACIT de type IX. Le collagène FACIT de type IX apparaît donc essentiel pour la formation des fibrilles de collagène hétérotypiques du cartilage puisqu'il fournit une stabilité à long terme.<sup>648</sup>

D'autre part, Hecht *et al.* ont montré que les mutations des COMP engendrent une diminution de la sécrétion de collagène de type IX et de matriline-3 dans la matrice entraînant une désorganisation de l'ECM.<sup>156</sup> L'étude menée par Nicolae *et al.* sur des souris KO matrilin-3 a, quant à elle, démontré qu'une déficience en matriline-3 engendre une augmentation du diamètre des fibrilles de collagène.<sup>157</sup> Le mécanisme régulant la croissance latérale des fibrilles dans le cartilage semblent donc être un mécanisme complexe impliquant plusieurs acteurs : le collagène FACIT de type IX, les COMP et la matriline-3.

Les SLRP semblent également jouer un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité structurelle du cartilage. Ces dernières interagissent avec les agrécane<sup>312,649</sup>, régulent le diamètre des fibrilles de collagène et facilite les interactions entre les fibrilles de collagène et les autres composants de la matrice<sup>98,145,159-167</sup> Han *et al.* ont démontré que la présence de décorine augmente significativement l'adhérence entre les molécules d'agrécane et les fibrilles de collagène de type II.<sup>649</sup>

Au cours de l'arthrose, un grand nombre de SLRP, dont la décorine, le biglycane et la fibromoduline, continue à être synthétisés.<sup>650-652</sup> Cependant, ces SLRP sont différemment glycosylés.<sup>170</sup> Parallèlement, une fragmentation de la protéine centrale de la fibromoduline et de la décorine associée à la dégradation du cartilage articulaire humain a été rapportée par Melrose *et al.*<sup>653,654</sup> Plusieurs études sur les souris déficientes en fibromoduline et/ou biglycane, ont montré que ces dernières ont développé des modifications de l'ECM semblables à celles observées dans le cartilage arthrosique. Cette constatation démontre le rôle important des SLRP dans le maintien de l'intégrité de l'ECM.<sup>164,176,346,655-658</sup> Tous les tissus de l'articulation, tels que les os, les cartilages et les membranes synoviales, sont sujets à l'arthrose.<sup>659</sup> Les SLRP sont présentes dans l'ECM de ces tissus conjonctifs musculosquelettiques où elles jouent un rôle important dans l'intégrité de l'ECM. Les SLRP semblent donc être des acteurs clés dans le développement de l'arthrose.

Le relargage des agrécanes et la déstructuration du réseau fibrillaire du collagène pourraient donc avoir pour origine une défaillance dans les interactions entre (1) agrégats d'agrécanes, (2) collagène FACIT de type IX (3) COMP, (4) matriline-3 et (5) les SLRP, *i.e.* la décorine, le biglycane et la fibromoduline. Afin d'explorer cet axe de recherche, nous pourrions adopter la même méthodologie, *i.e.* effectuer une analyse de la composition, de la structure et des propriétés mécaniques à l'échelle nanométrique.

Il convient de noter que les fragments d'agrécane issus de la dégradation enzymatique sont relargués dans le liquide synovial où ils peuvent être utilisés comme biomarqueurs.<sup>262</sup>

Dans le chapitre 4, un éventail de techniques de caractérisation a été utilisé pour déterminer la dynamique de minéralisation et les modifications de la matrice au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Les analyses moléculaires, biochimiques et physicochimiques nous ont permis d'acquérir des informations complémentaires concernant les processus de minéralisation et le remodelage associé de l'ECM. Cette étude a permis de montrer que la différenciation hypertrophique des chondrocytes préhypertrophiques induit un remodelage de l'ECM qui précède la minéralisation. Les analyses chimiques ont, par ailleurs, révélé que les minéraux nouvellement formés sont de l'hydroxyapatite carbonatée faiblement cristallisée. La cartographie chimique a également montré que le phosphore est concentré dans



des débris cellulaires. Ces derniers pourraient être générés par l'apoptose croissante des chondrocytes.

Ces résultats ouvrent le chemin à d'autres investigations nécessaires pour comprendre le mécanisme de la formation du minéral d'HAP au sein de la matrice.

### Le lien entre apoptose et minéralisation

Notre étude a mis en évidence la présence croissante de corps apoptotiques au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Cependant l'augmentation du nombre de chondrocytes apoptotiques suit une cinétique différente de celle de la minéralisation. Ceci suggère que ces corps apoptotiques riches en phosphore ne jouent pas un rôle important dans la minéralisation de la matrice des chondrocytes hypertrophiques. Les corps apoptotiques sont présents au sein même de la matrice. Par ailleurs, une matrice résiduelle recouvrant les minéraux nouvellement formés semble indiquer que ces derniers nucléent et croissent également au sein de la matrice elle-même. Il est généralement admis dans la littérature que l'ossification endochondrale de la plaque de croissance est accompagnée d'une apoptose des chondrocytes Hyp, *i.e.* que la minéralisation du cartilage nécessite l'apoptose des chondrocytes.<sup>572,590,599</sup> En effet, les chondrocytes hypertrophiques, qui entrent en apoptose, semblent pouvoir produire des vésicules matricielles à l'intérieur desquelles les premiers cristaux d'hydroxyapatite de calcium sont générés.<sup>572</sup>

Un des prochains axes de recherche serait donc de caractériser ses vésicules lors de la minéralisation associée à la différenciation hypertrophique des chondrocytes. Les vésicules matricielles peuvent en effet être détectées grâce à un marquage à l'annexine 5 et caractérisé par AFM (couplage AFM, immunofluorescence).<sup>383,614,660</sup> Il convient de noter que les analyses SEM, menées dans le cadre de notre étude, ont permis de détecter de petites structures qui pourraient bien être des vésicules matricielles.

### La cinétique de la minéralisation

La minéralisation a été suivie par (1) rouge alizarine, couramment utilisé en histologie pour mettre en évidence les dépôts calciques des tissus en se fixant au calcium par un processus de chélation (2) variation de la bande IR du phosphate inorganique. Or, c'est deux analyses montrent deux cinétiques de minéralisation différentes. Même si les deux techniques sont

basées sur des données de nature différente, des investigations complémentaires sont nécessaires pour fournir des informations plus précises sur la cinétique de minéralisation.

Par ailleurs, la régulation de la minéralisation par le rapport entre Pi et pyrophosphate inorganique (PPi) est accomplie par les activités concertées de l'ALP, qui hydrolyse le PPi pour générer du Pi,<sup>594,595</sup> de l'ectonucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1), qui génère du PPi à partir de nucléosides triphosphates (ATP, CTP, UTP),<sup>661,662</sup> et de la protéine d'ankylose (ANK), une protéine transmembranaire à passages multiples, qui assure le transport du PPi du cytoplasme vers la matrice extracellulaire.<sup>663-665</sup> L'activité ALP hydrolyse le PPi en Pi pour son incorporation dans la phase minérale, évitant l'excès de niveaux inhibiteurs de PPi qui empêche la transformation de l'ACP en HAP *in vitro*.<sup>596-598</sup> Il est intéressant de noter que la **Figure S12A** montre une surexpression significative du gène Ank aux derniers stades de la différenciation de l'Hyp. En outre, la **Figure S12B** suggère une tendance à l'augmentation de l'expression du gène codé ENPP1. Il serait donc très informatif d'effectuer une étude mécanistique de la formation du minéral associée à la différenciation hypertrophique des chondrocytes, *i.e.* mécanisme de nucléation et de propagation du minéral formé au cours de la calcification de la matrice associée à la différenciation hypertrophique des chondrocytes.

### L'influence des composés de l'ECM sur la minéralisation

Notre étude a permis de montrer le remplacement de la matrice non minéralisée riche en collagène de type II et d'agrécan par une matrice minéralisée enrichie en collagène de type I, X et versicane. L'agrécan et le versicane contiennent tous deux des GAG sulfatés anioniques. Cependant, le versicane ne contient qu'une dizaine de chaînes latérales contrairement à l'agrécan qui en compte une centaine.<sup>666</sup> Nos données suggèrent que les versicanes pourraient favoriser la propagation du minéral nouvellement formé alors que les agrégats d'agrécan l'inhiberaient. En effet, le caractère fortement anionique des agrécans leur confère la capacité de séquestrer le Ca<sup>2+</sup> ionique et donc d'inhiber la propagation des minéraux dans la matrice du cartilage et de la plaque de croissance. Par ailleurs, le versicane est exprimé par les chondrocytes de cartilage arthrosique.<sup>613,619,667</sup> Le rôle du versicane dans la minéralisation n'est à ce jour pas élucidé.<sup>616,666</sup>

Il serait donc intéressant d'étudier le rôle des protéoglycanes sur la minéralisation afin de pouvoir mieux comprendre pourquoi le cartilage articulaire est non minéralisé.

Les protéines non collagéniques peuvent également influencer la minéralisation du cartilage, *e.g.* les small integrin-binding ligand N-glycosylated proteins (SIBLING) retrouvées dans les matrices minéralisées.<sup>668</sup> Cette famille regroupe cinq protéines: l'ostéopontine (OPN), la sialoprotéine osseuse (BSP), la protéine matricielle de dentine 1 (DMP1), la sialophosphoprotéine de dentine (DSPP) et la phosphoglycoprotéine de matrice extracellulaire (MEPE). Il est intéressant de noter que l'expression de DMP1 augmente au cours de la différenciation hypertrophique des chondrocytes (**Figure S9**). L'implication de ces protéines dans le processus de minéralisation associée à la différenciation hypertrophique des chondrocytes est en effet actuellement étudiée au sein de notre équipe de recherche.

#### L'influence des composés de l'ECM sur l'apoptose

Le cartilage contient également des quantités minoritaires de plusieurs autres collagènes, tels que le collagène de type VI.<sup>298</sup> Les images IF révèlent que le collagène de type VI est uniquement présent dans l'ECM du chondrocyte Prehyp. Peters *et al.* ont démontré que le collagène de type VI, localisé exclusivement dans la PCM, joue un rôle fonctionnel important puisqu'il protège les chondrocytes du stress environnant et les empêche ainsi d'entrer en apoptose.<sup>320</sup>

L'absence de collagène de type VI lors de la différenciation hypertrophique des chondrocytes sembleraient donc être délétère aux chondrocytes.

**Ce travail a donc permis de développer une approche méthodologique originale qui apporte de nouvelles connaissances sur le remodelage pathologique de l'ECM. Les perspectives envisagées sont multiples. Par ailleurs, l'utilisation de techniques de caractérisation performante telles que l'XPS ouvre une nouvelle voie pour la détection précoce des pathologies.**

**Je suis donc convaincue que les découvertes majeures de demain naitront de collaborations interdisciplinaires ouvrant le champ des possibles.**



## **Informations supplémentaires**

**I - Chapitre 3 - Deciphering Pathological Remodeling of Human Cartilage Extracellular Matrix in Osteoarthritis at the supramolecular level - *Supplementary Information***

**II - Chapitre 4 - Dynamics of extracellular matrix remodeling associated with calcification during the hypertrophic differentiation of articular chondrocytes - *Supplementary Information***

## **Tableaux et Figures**

Table S1. Parameters used for the calculation of the electron inelastic mean free path. ....	190
Table S2. Computation of the electron inelastic mean free path (IMFP). ....	191
Table S3. Characteristics and assignment of XPS peaks components. ....	191
Table S4. Elemental composition measured by XPS on treated cartilages.....	192
Table S5. Elemental composition of type II collagen, computed from amino acid amounts and composition. ....	193
Table S6. Chemical functions in type II collagen (triple-helix) computed from composition (Uniprot) and pooled according to the expected contribution in XPS peaks. ....	193
Table S7. Elemental composition of type IX collagen, computed from amino acid amounts and composition. ....	194
Table S8. Chemical functions in type IX collagen computed from composition (Uniprot) and pooled according to the expected contribution in XPS peaks.....	194
Table S9. Elemental composition of aggrecan.....	194
Table S10. Elemental composition of sulphated GAG. ....	195
Table S11. Chemical functions in sulphated GAG computed from composition and pooled according to the expected contribution .....	195
Table S12. Elemental composition of collagen, computed from amino acid amounts and compositions.....	195
Table S13. Chemical functions in core protein computed from composition (Uniprot) and pooled according to the expected contribution in XPS peaks.....	196
Table S14. Chemical functions in aggrecan computed from composition and pooled according to the expected contribution in XPS peaks.....	196
Table S15. Elemental composition of hyaluronic acid. ....	196
Table S16. Chemical functions in hyaluronic acid computed from composition and pooled according to the expected contribution in XPS peaks.....	196
Table S17. Expected molar concentration ratios from XPS computed on the basis of amino acid amount and composition of type II collagen, aggrecan and hyaluronic acid. ....	197
Table S18. Nanomechanical properties measured by AFM on cartilage tissues from the literature. ....	202
Table S19. Forward and reverse PCR primer sequences.....	204
Table S20. Reference and dilution of the antibody used for this study .....	204
Figure S1. Evolution of the osteochondral junction due to OA. ....	197
Figure S2. AFM height (left) and deflection (right) images recorded on human articular cartilage submitted to different treatments (see Table 5). ....	198
Figure S3. AFM height (top) and deflection (bottom) images recorded on OA cartilage ECM at low, moderate and high scores, showing the presence of spheroid-shaped particles.....	199
Figure S4. Typical (A, C) force-distance and (B, D) force-indentation curves recorded on cartilage ECM showing different stiffness.....	200
Figure S5. AFM height and deflection images (as indicated) recorded on a healthy cartilage after enzymatic hyaluronidase/collagenase treatment.....	200
Figure S6. Evolution of the weight percentages (wt.%) of (A) collagen and (B) Aggrecan prior to and after hyaluronidase (HA treat.) and collagenase (COL treat.) treatments.....	201
Figure S7. Correlation between the amount of collagen and aggrecan with a discrimination by histopathological OA severity.....	201
Figure S8. Schematic illustration of the retrieval of the glass slides covered with cells and ECM at the end of cell culture. ....	205

Figure S9. Hypertrophic differentiation markers assessed in iMACs differentiated into Prehyp and Hyp chondrocytes.....	205
Figure S10. (A) EDX spectra extracted from chemical mapping of the matrix (1) and (2) the mineral (B) XRD analysis performed on the mineral powder gathered from Hyp chondrocytes matrices .....	206
Figure S11. IR spectra recorded on the matrices of Prehyp and Hyp chondrocytes after 7, 21, 28, 35 and 42 days after Hyp induction. ....	207
Figure S12. Variation in the gene expression of (A) Ank and (B) Enpp1, two regulators of matrix calcification.....	207
Figure S13. Osteoblasts has been thus isolated from the calvaria of the same newborn than chondrocytes. (A, input) Alizarin red staining reveals that osteoblast calcify also their matrix, while (A,B) the AFM images exhibits a fibrillar matrix. (C,D) Thanks to immunolabeling, the latter seems to be identified as type I collagen fibril. (E) The quantitative analysis of fibril diameter reveals that the mean diameter. ....	208
Figure S14. Variation in the gene expression of Hyal1 and 2, that encode hyaluronidase 1 and 2, respectively.....	208





# **Deciphering Pathological Remodeling of Human Cartilage Extracellular Matrix in Osteoarthritis at the supramolecular level**

## ***Supplementary Information***

Ilhem Lilia Jaabar, Pauline Cornette, Antoine Miche, Kristell Wanherdrick, Vincent Dupres, François-Paul Ehkirch, Francis Berenbaum, Xavier Houard, Jessem Landoulsi

### **Content**

#### **S1. XPS data**

##### **S1.1. Analysis depth**

##### **S1.2. Spectral components and chemical functions**

##### **S1.3. Elemental composition**

#### **S2. Concentrations of elements and chemical functions expected for ECM main compounds**

##### **S2.1. Type II collagen**

##### **S2.2. FACIT type IX collagen**

##### **S2.3. Aggrecan**

###### **S2.3.1. Sulphated GAG**

###### **S2.3.2. Core protein**

##### **S2.4. Hyaluronic acid**

#### **S3. Molar concentration ratios computed on the basis of amino acid amount and composition of ECM main compounds**

#### **S4. OA samples scoring**

#### **S5. AFM data**

#### **S6. XPS data**

#### **S7. Nanomechanical properties**

## S1. XPS data

### S1.1. Analysis depth

XPS probes a thickness of only few nanometres. In fact, an electron photoemitted at depth  $z$  in a flat and smooth solid in a direction making the angle  $\theta$  with the normal to the surface of the solid has a probability  $Q$  to leave the solid in this direction without energy loss:  $Q = \exp(-z / \lambda \cos\theta)$  where  $z / \cos\theta$  is the distance  $d$  travelled by the photoelectron in the solid and  $\lambda$  is the inelastic mean free path (IMFP), i.e. the average distance between inelastic collisions ( $\lambda = -dd/dQ$ ). The IMFP depends on the kinetic energy of the photoemitted electron and on the properties of the matrix, particularly its density. The contribution to the intensity decreases exponentially with the depth: 95 % from a layer of thickness  $3\lambda \cos\theta$ .<sup>489</sup>

IMFP values were calculated according to Tanuma et al.<sup>669</sup> using the Quases program<sup>670</sup> using the parameters given in **Table S1**. These calculations lead to the values detailed in **Table S2**. The thickness probed by XPS for each cryo-sectioned sample is thus about 5.5 nm.

**Table S1.** Parameters used for the calculation of the electron inelastic mean free path (IMFP). (Abbreviations. Col: collagen, Agg: aggrecan, HA: hyaluronic acid and HC: hydrocarbon compounds)

Quases program input data	Col	Agg	HA	HC
Carbon quantity	12321	65800	14	1
Mw (g/mol)	289639	2421399	379	14
Carbon concentration (mol/g)	0.043	0.027	0.037	0.071
Density (g/cm <sup>3</sup> )	1.4	1.5	1.5	0.9
Valence electrons	113043	173	148	6
C <sup>ECM</sup> (mol/cm <sup>3</sup> )	0.0596	0.0408	0.0554	0.0643
C <sup>ECM</sup> (mol/cm <sup>3</sup> )	0.055			

**Table S2.** Computation of the electron inelastic mean free path (IMFP).

Energy Gap (eV)		2	4	6	8	$\lambda_{\text{mov}}^{\text{Matrix}}$
Col	$\lambda_{\text{C}}$	3.3	3.4	3.6	4.0	3.6
	$\lambda_{\text{N}}$	3.0	3.2	3.4	3.7	3.3
Agg	$\lambda_{\text{C}}$	3.3	3.4	3.6	3.9	3.5
	$\lambda_{\text{N}}$	3.0	3.2	3.3	3.6	3.3
HA	$\lambda_{\text{C}}$	3.3	3.4	3.7	4.0	3.6
	$\lambda_{\text{N}}$	3.1	3.2	3.4	3.7	3.3
Others	$\lambda_{\text{C}}$	3.3	3.5	3.8	4.2	3.7
	$\lambda_{\text{N}}$	3.1	3.2	3.5	3.9	3.4
$\lambda_{\text{mov}}^{\text{Org}}$ (nm)		3.2	3.3	3.5	3.9	3.5
$3\lambda_{\text{mov}}^{\text{Org}}$ (nm)		9.5	9.9	10.6	11.6	10.4
$3\lambda_{\text{mov}}^{\text{Org}} \cos(\theta)$ (nm)		5.0	5.2	5.6	6.1	5.5

### S1.2. Spectral components and chemical functions

**Table S3.** Characteristics and assignment of XPS peaks components for human cartilage samples.

Peak	Binding energy (eV)	Functional groups
<b>C 1s</b>	284.8 * †	<u>C</u> -(C,H) hydrocarbon
	286.1 ± 0.2 †	<u>C</u> -(O,N) alcohol, ether, ester, amide, amine
	287.5 ± 0.3 †	O- <u>C</u> -O acetal, hemiacetal
		C-( <u>C</u> =O)-N amide
	288.9 ± 0.2 †	C-( <u>C</u> =O)-O carboxylic acid, ester
<b>N 1s</b>	399.8 ± 0.1	(C=O)- <u>N</u> H amine / amide
	401.5 ± 0.4	C-( <u>N</u> H <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) protonated amine
	402.4 ± 0.3	R <sub>4</sub> - <u>N</u> <sup>+</sup> quaternary amine
<b>S 2p</b>	163.7 ± 0.3 §	R- <u>S</u> - <u>S</u> -R' protein disulfide bond
	168.6 ± 0.3 §	<u>S</u> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> sulfate

\* Component fixed at 284.8 eV and used to set the binding energy of other components or peaks.

† Components imposed to have the same FWHM, found in the range of 1.1 to 1.6 eV.

§ Component <sup>3/2</sup>

### S1.3. Elemental composition

**Table S4.** Elemental composition measured by XPS on treated cartilages. Molar concentrations over all elements except hydrogen. (Abbreviations. bdl: below the detect limit)

<b>Treatment</b>	<b>Analysed zone</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>O</b>	<b>S</b>	<b>Si</b>	<b>Zn</b>	<b>Na</b>	<b>Ca</b>	<b>P</b>
<b>NF</b>	A	73.00	1.91	24.43	0.40	0.23	0.02	0.01	bdl	bdl
	B	71.09	6.62	20.72	1.06	0.22	bdl	0.24	0.05	bdl
	C	67.70	9.45	20.35	1.20	0.65	bdl	0.55	0.10	bdl
<b>F</b>	A	69.46	0.37	29.11	0.07	0.77	0.07	0.15	bdl	bdl
	B	70.39	2.56	25.87	0.27	0.65	0.03	0.21	0.02	bdl
	C	67.39	7.02	23.51	0.59	0.82	0.02	0.55	0.10	bdl
<b>F - Pa</b>	A	79.16	5.52	14.06	0.52	0.37	bdl	0.07	0.22	0.08
	B	80.42	4.25	13.54	0.50	1.00	bdl	0.05	0.22	0.02
	C	84.69	2.33	10.54	0.36	1.90	bdl	0.03	0.15	bdl
<b>F - d</b>	A	79.98	4.64	14.19	0.42	0.42	0.01	0.34	bdl	bdl
	B	86.03	1.70	11.23	0.18	0.69	0.04	0.13	bdl	bdl
	C	72.01	2.01	18.56	0.18	6.79	0.15	0.30	bdl	bdl
<b>F - d - us</b>	A	66.33	10.63	20.54	1.19	0.29	bdl	1.02	bdl	bdl
	B	67.28	8.38	21.18	1.40	0.91	0.03	0.82	bdl	bdl
	C	74.98	2.41	20.09	0.57	1.76	0.04	0.15	bdl	bdl



## S2.2. FACIT type IX collagen

**Table S7.** Elemental composition of type IX collagen, computed from amino acid amounts and composition.

amino acids	AMINO ACID					per ALPHA CHAIN 1					per ALPHA CHAIN 2					per ALPHA CHAIN 3					TROPICOLLAGEN							
	C	H	N	O	S	qties	C	H	N	O	S	qties	C	H	N	O	S	qties	C	H	N	O	S	C	H	N	O	S
A	3	7	1	2		47	141	329	47	94	0	42	126	294	42	84	0	45	135	315	45	90	0	402	938	134	268	0
C	3	7	1	2	1	11	33	77	11	22	11	4	12	28	4	8	4	6	18	42	6	12	6	63	147	21	42	21
D	4	7	1	4		39	156	273	39	156	0	24	96	168	24	96	0	28	112	196	28	112	0	364	637	91	364	0
E	5	9	1	4		47	235	423	47	188	0	31	155	279	31	124	0	32	160	288	32	128	0	550	990	110	440	0
F	9	11	1	2		22	198	242	22	44	0	4	36	44	4	8	0	4	36	44	4	8	0	270	330	30	60	0
G	2	5	1	2		217	434	1085	217	434	0	203	406	1015	203	406	0	210	420	1050	210	420	0	1260	3150	630	1260	0
H	6	9	3	2		8	48	72	24	16	0	8	48	72	24	16	0	4	24	36	12	8	0	120	180	60	40	0
I	6	13	1	2		36	216	468	36	72	0	23	138	299	23	46	0	14	84	182	14	28	0	438	949	73	146	0
K	6	14	2	2		42	252	588	84	84	0	38	228	532	76	76	0	29	174	406	58	58	0	654	1526	218	218	0
L	6	13	1	2		57	342	741	57	114	0	28	168	364	28	56	0	40	294	637	40	98	0	804	1742	134	268	0
M	5	11	1	2	1	12	60	132	12	24	12	11	55	121	11	22	11	6	30	66	6	12	6	145	319	29	58	29
N	4	8	2	3		20	80	160	40	60	0	6	24	48	12	18	0	5	20	40	10	15	0	124	248	62	93	0
P	5	9	1	2		153	765	1377	153	306	0	138	690	1242	138	276	0	137	685	1233	137	274	0	2140	3852	428	856	0
Q	5	10	2	3		39	195	390	78	117	0	34	170	340	68	102	0	25	125	250	50	75	0	490	980	196	294	0
R	6	14	4	2		54	324	756	216	108	0	27	162	378	108	54	0	37	222	448	128	64	0	678	1582	452	226	0
S	3	7	1	3		42	126	294	42	126	0	18	54	126	18	54	0	25	75	175	25	75	0	255	595	85	255	0
T	4	9	1	3		26	104	234	26	78	0	15	60	135	15	45	0	11	44	99	11	33	0	208	468	52	156	0
V	5	11	1	2		37	185	407	37	74	0	29	145	319	29	58	0	20	100	220	20	40	0	430	946	86	172	0
W	11	12	2	2		6	66	72	12	12	0	1	6	6	6	6	0	1	6	6	6	6	0	66	72	12	12	0
Y	9	11	1	3		6	54	66	6	18	0	6	54	66	6	18	0	7	18	27	7	6	0	126	154	14	42	0
<b>TOTAL</b>						<b>921</b>	<b>4014</b>	<b>8186</b>	<b>1206</b>	<b>2147</b>	<b>23</b>	<b>689</b>	<b>2827</b>	<b>5870</b>	<b>864</b>	<b>1567</b>	<b>15</b>	<b>684</b>	<b>2746</b>	<b>5749</b>	<b>847</b>	<b>1556</b>	<b>12</b>	<b>9587</b>	<b>19805</b>	<b>2917</b>	<b>5270</b>	<b>50</b>
H <sub>2</sub> O removed during peptide bond formation						920	1840			920	23	688		1376					1366		683							
total number of each element						<b>4014</b>	<b>6346</b>	<b>1206</b>	<b>1227</b>	<b>23</b>		<b>2827</b>	<b>4494</b>	<b>864</b>	<b>879</b>	<b>15</b>		<b>2746</b>	<b>4383</b>	<b>847</b>	<b>873</b>	<b>12</b>	<b>9587</b>	<b>19805</b>	<b>2917</b>	<b>5270</b>	<b>50</b>	
molar mass of each element (g/mol)						12.01	1.01	14.01	16.00	32.06		12.01	1.01	14.01	16.00	32.06		12.01	1.01	14.01	16.00	32.06		12.01	1.01	14.01	16.00	32.06
<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>								<b>91870</b>						<b>65131</b>					<b>63616</b>						<b>261889</b>			

**Table S8.** Chemical functions in type IX collagen computed from composition (Uniprot) and pooled according to the expected contribution in XPS peaks : C 1s, O 1s and N 1s.

amino acids	TROPICOLLAGEN																	
	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	CCC	C-O	C-N	C-S	N-C=O, N-C-N, C-N	O=C-OH	C <sub>alk</sub>	(C <sub>N</sub> )=O	C-N(H,C)	N <sub>alk</sub>	OH	O=C-OH	O=C-OH	N-C=O	O <sub>alk</sub>
A	134						134	134		402	134		134				134	134
C							21	21	21	63		21			21		21	42
D		91					91	91	91	364	91	91		91	91	91	91	273
E		220					110	110	110	550	110	110		110	110	110	110	330
F		30	150	30			30	30	30	270	30	30		30			30	30
G							630	630	630	1260	630	630		630			630	630
H		20					60	40		120	20	40	60				20	20
I	146	73	73				73	73	438	73	73		73				73	73
K		327					218	109	654	109	109	218	218				109	109
L	268	134	134				134	134	804	134	134	134					134	134
M		29					29	58	145	29	29	29					29	29
N		31					31	62	124	62	62	62					62	62
P		856					856	428	2140	428	428	428					428	428
Q		196					98	196	490	196	196	196					196	196
R		226					226	226	678	113	339	452					113	113
S					85	85	85	85	255	85	85	85	85				85	170
T		52				52	52	52	208	52	52	52	52				52	104
V		172		86			86	86	430	86	86	86					86	86
W			6	24	12		18		6	66		12	12		6	6		12
Y			14	56	14	14	14	14	126	14	14	14	14				14	28
<b>SUM</b>	<b>772</b>	<b>2253</b>	<b>523</b>	<b>56</b>	<b>151</b>	<b>2996</b>	<b>79</b>	<b>2529</b>	<b>228</b>	<b>9587</b>	<b>2396</b>	<b>521</b>	<b>2917</b>	<b>151</b>	<b>228</b>	<b>228</b>	<b>2396</b>	<b>3003</b>
subtraction of chemical ending								-3	3	0	-3	3	0		3	3	-3	3
<b>TOTAL</b>	<b>772</b>	<b>2253</b>	<b>523</b>	<b>56</b>	<b>151</b>	<b>2996</b>	<b>79</b>	<b>2526</b>	<b>231</b>	<b>9587</b>	<b>2393</b>	<b>524</b>	<b>2917</b>	<b>151</b>	<b>231</b>	<b>231</b>	<b>2393</b>	<b>3006</b>

## S2.3. Aggrecan

**Table S9.** Elemental composition of aggrecan.

molecules	quantities	C	H	N	O	S
CS	100	58800	88200	4200	58800	4200
KS	50	7000	11500	500	7000	500
PC	1	11374	17633	2979	3982	47
<b>total number of each element</b>		<b>77174</b>	<b>117333</b>	<b>7679</b>	<b>69782</b>	<b>4747</b>
molar mass of each element		12.01	1.01	14.01	16.00	32.06
<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>				<b>2421399</b>		

### S2.3.1. Sulphated GAG

**Table S10.** Elemental composition of sulphated GAG.

molecules	quantities	C	H	N	O	S
CS	100	58800	88200	4200	58800	4200
KS	50	7000	11500	500	7000	500
<b>total number of each element</b>		<b>65800</b>	<b>99700</b>	<b>4700</b>	<b>65800</b>	<b>4700</b>
molar mass of each element		12.01	1.01	14.01	16.00	32.06
<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>		<b>2160071</b>				

**Table S11.** Chemical functions in sulphated GAG (chondroitin sulphate and keratan sulphate) computed from composition and pooled according to the expected contribution in XPS peaks : C 1s, O 1s and N 1s.

MOLECULE																			
GAGs	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	CCC	ξ-O	ξ-N	ξ-S	N-ξ-O, N-C-N, C=N	O=ξ-OH	C <sub>ox</sub>	(CN)=O	C-N(H,C)	N <sub>ox</sub>	OH	Q=C-OH	O=C-QH	N-C-Q	S=O, S-Q	O <sub>ox</sub>
CS	42				336	42		126	42	588	42		42	294	42	42	42	168	588
KS	10				80	10		40	0	140	10		10	90			10	40	140

### S2.3.2. Core protein

**Table S12.** Elemental composition of collagen, computed from amino acid amounts and compositions.

amino acids	quantities	AMINO ACID						CORE PROTEIN												
		C	H	N	O	S	C	H	N	O	S									
A	178	3	7	1	2		534	1246	178	356										
C	34	3	7	1	2	1	102	238	34	68	34									
D	114	4	7	1	4		456	798	114	456										
E	284	5	9	1	4		1420	2556	284	1136										
F	68	9	11	1	2		612	748	68	136										
G	309	2	5	1	2		618	1545	309	618										
H	33	6	9	3	2		198	297	99	66										
I	88	6	13	1	2		528	1144	88	176										
K	28	6	14	2	2		168	392	56	56										
L	195	6	13	1	2		1170	2535	195	390										
M	13	5	11	1	2	1	65	143	13	26	13									
N	30	4	8	2	3		120	240	60	90										
P	231	5	9	1	2		1155	2079	231	462										
Q	63	5	10	2	3		315	630	126	189										
R	79	6	14	4	2		474	1106	316	158										
S	309	3	7	1	3		927	2163	309	927										
T	204	4	9	1	3		816	1836	204	612										
V	196	5	11	1	2		980	2156	196	392										
W	25	11	12	2	2		275	300	50	50										
Y	49	9	11	1	3		441	539	49	147										
<b>TOTAL</b>	<b>2530</b>						<b>11374</b>	<b>22691</b>	<b>2979</b>	<b>6511</b>	<b>47</b>									
2529 H <sub>2</sub> O removed during peptide bond formation																5058		2529		
<b>total number of each element</b>												<b>11374</b>	<b>17633</b>	<b>2979</b>	<b>3982</b>	<b>47</b>				
molar mass of each element (g/mol)												12.01	1.01	14.01	16.00	32.06				
<b>M<sub>w</sub> (g/mol)</b>												<b>261329</b>								

**Table S13.** Chemical functions in core protein computed from composition (Uniprot) and pooled according to the expected contribution in XPS peaks : C 1s, O 1s and N 1s.

CORE PROTEIN																		
amino acids	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	CCC	C-O	C-N	C-S	N-C=O, N-C-N, C=N	O=C-OH	C <sub>tot</sub>	(CN)=O	C-N(H,C)	N <sub>tot</sub>	OH	O=C-OH	O=C-OH	N-C=O	O <sub>tot</sub>
A	178					178		178		534	178		178	0	0	0	178	178
C						34	34	34		102	34		34	0	0	0	34	34
D		114				114		114	114	456	114		114	0	114	114	114	342
E		568				284		284	284	1420	284		284	0	284	284	284	852
F		68	340	68		68		68		612	68		68	0	0	0	68	68
G						309		309		618	309		309	0	0	0	309	309
H		33				99		66		198	33	66	99	0	0	0	33	33
I	176	88	88			88		88		528	88		88	0	0	0	88	88
K		84				56		28		168	28	28	56	0	0	0	28	28
L	390	195	195			195		195		1170	195		195	0	0	0	195	195
M		13				13	26	13		65	13		13	0	0	0	13	13
N		30				30		60		120	60		60	0	0	0	60	60
P		462				462		231		1155	231		231	0	0	0	231	231
Q		126				63		126		315	126		126	0	0	0	126	126
R		158				158		158		474	79	237	316	0	0	0	79	79
S					309	309		309		927	309		309	309	0	0	309	618
T	204				204	204		204		816	204		204	204	0	0	204	408
V	392		196			196		196		980	196		196	0	0	0	196	196
W		25	100	50		75		25		275	25	25	50	0	0	0	25	25
Y		49	196	49	49	49		49		441	49		49	49	0	0	49	98
SUM	1340	2013	1115	167	562	2984	60	2735	398	11374	2623	357	2979	562	398	398	2623	3981
substraction of chemical ending								-1	1	0	-1	1	0		1	1	-1	1
TOTAL	1340	2013	1115	167	562	2984	60	2734	399	11374	2622	357	2979	562	399	399	2622	3982

**Table S14.** Chemical functions in aggrecan computed from composition and pooled according to the expected contribution in XPS peaks: C 1s, O 1s and N1s.

AGGREGAN																			
molecules	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	CCC	C-O	C-N	C-S	N-C=O, N-C-N, C=N	O=C-OH	C <sub>tot</sub>	(CN)=O	C-N(H,C)	N <sub>tot</sub>	OH	O=C-OH	O=C-OH	N-C=O	S=O, S-O	O <sub>tot</sub>
CS	4200				33600	4200		12600	4200	58800	4200		4200	29400	4200	4200	4200	16800	58800
KS	500				4000	500		2000		7000	500		500	4500			500	2000	7000
PC	1340	2013	1115	167	562	2984	60	2734	399	11374	2622	357	2979	562	399	399	2622		3982
TOTAL	6040	2013	1115	167	38162	7684	60	17334	4599	77174	7322	357	7679	34462	4599	4599	7322	18800	69782

## S2.4. Hyaluronic acid

**Table S15.** Elemental composition of hyaluronic acid.

HYALURONIC ACID	MONOMER				MOLECULE				
	C	H	N	O	degree of polymerization	C	H	N	O
	14	21	1	11	10000	140000	210000	10000	110000
molar mass of each element (g/mol)	12.01	1.01	14.01	16.00	M <sub>w</sub> (g/mol)	3793180			

**Table S16.** Chemical functions in hyaluronic acid computed from composition and pooled according to the expected contribution in XPS peaks : C 1s, O 1s and N 1s.

HYALURONIC ACID																			
GAG	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	CH	CCC	C-O	C-N	C-S	N-C=O, N-C-N, C=N	O=C-OH	C <sub>tot</sub>	(CN)=O	C-N(H,C)	N <sub>tot</sub>	OH	O=C-OH	O=C-OH	N-C=O	S=O, S-O	O <sub>tot</sub>
HA	10000				80000	10000		30000	10000	140000	10000		10000	80000	10000	10000	10000		110000

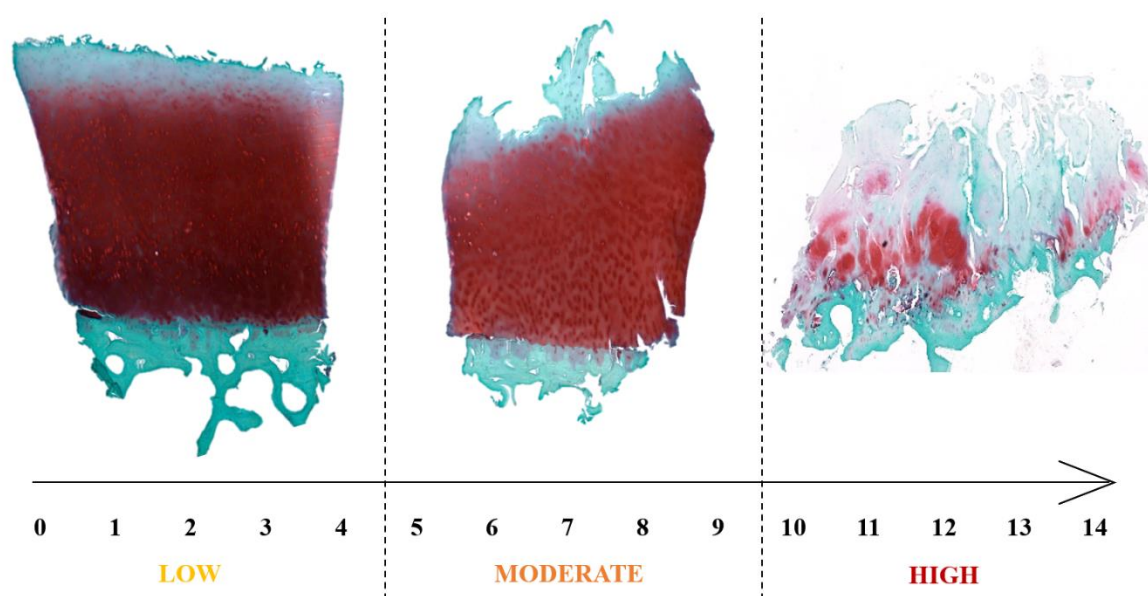


### S3. Molar concentration ratios computed on the basis of amino acid amount and composition of ECM main compounds

**Table S17.** Expected molar concentration ratios from XPS computed on the basis of amino acid amount and composition of type II collagen, aggrecan and hyaluronic acid.

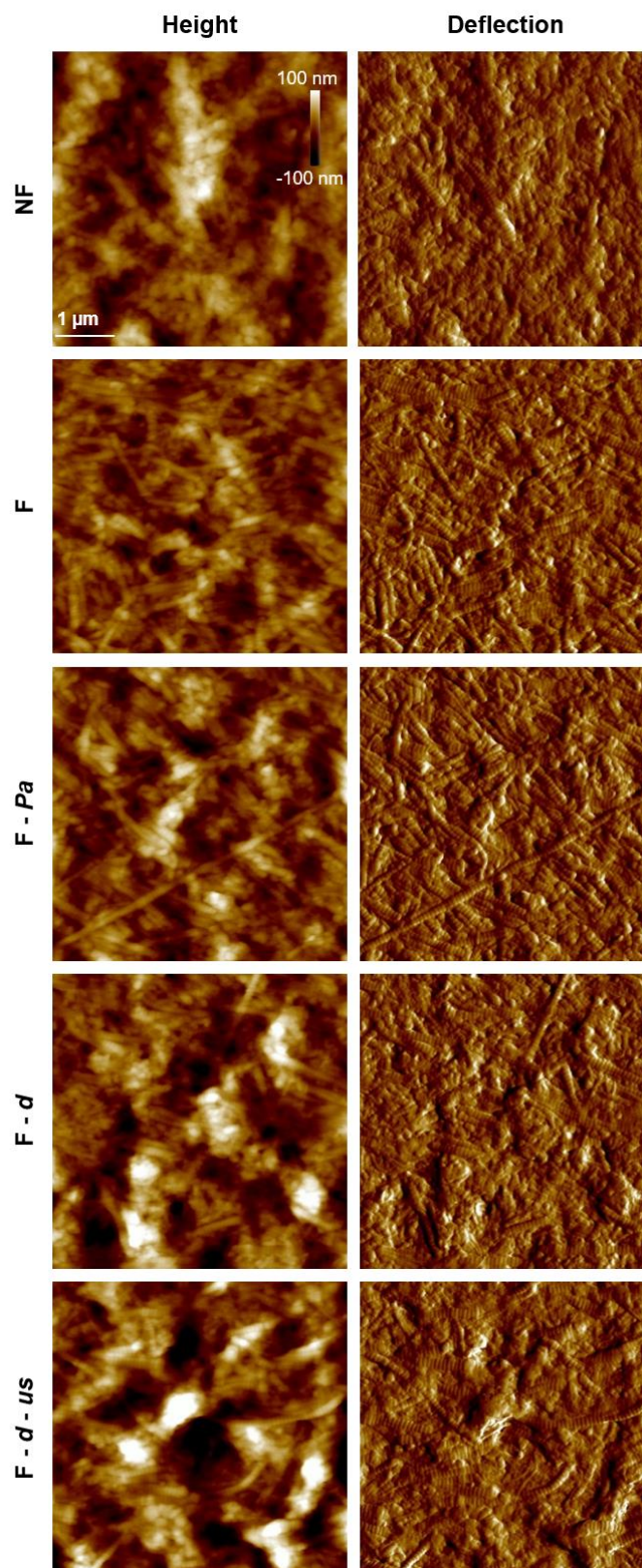
COMPONENT	$C/N$ $\alpha$	$C_{ox}/N$ $\beta$	$C_{284.8}/N$ $\delta$	$C_{287.5}/N$ -	$C_{286.1}/C$ $\gamma_x$	$C/S_{ox}$ $\eta$
Col	3.12	2.08	1.03	0.89	0.36	-
Agg	-	-	-	2.26	0.59	16.42
HA	-	-	-	3.00	0.64	-

### S4. OA samples scoring

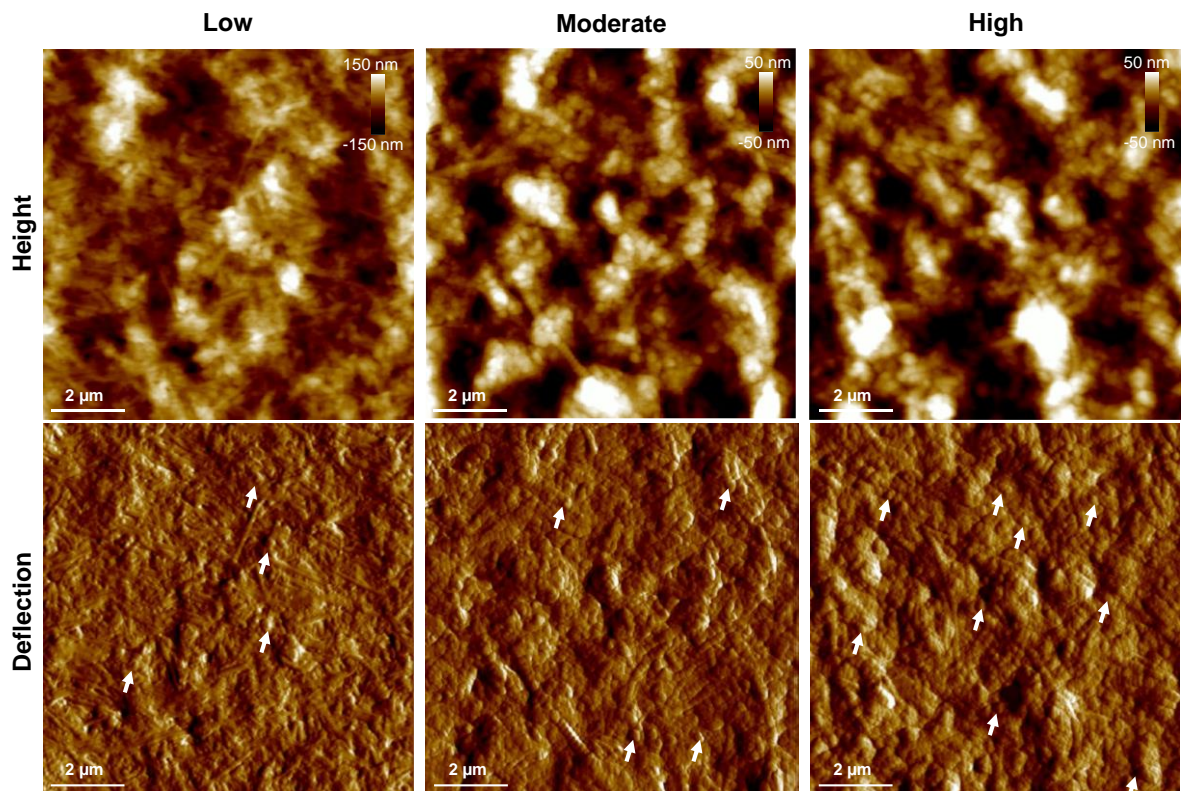


**Figure S1.** Evolution of the osteochondral junction due to OA. Tissues were stained with Safranin O/Fast Green. Degradation of articular cartilage was determined by the Mankin score on stained tissues. OA samples were then classified into groups with increasing OA severity: the group ‘Low’ (score 0 - 4), the group ‘Moderate’ (score 5 - 9) and the group ‘High’ (score 10 - 14).

## S5. AFM data

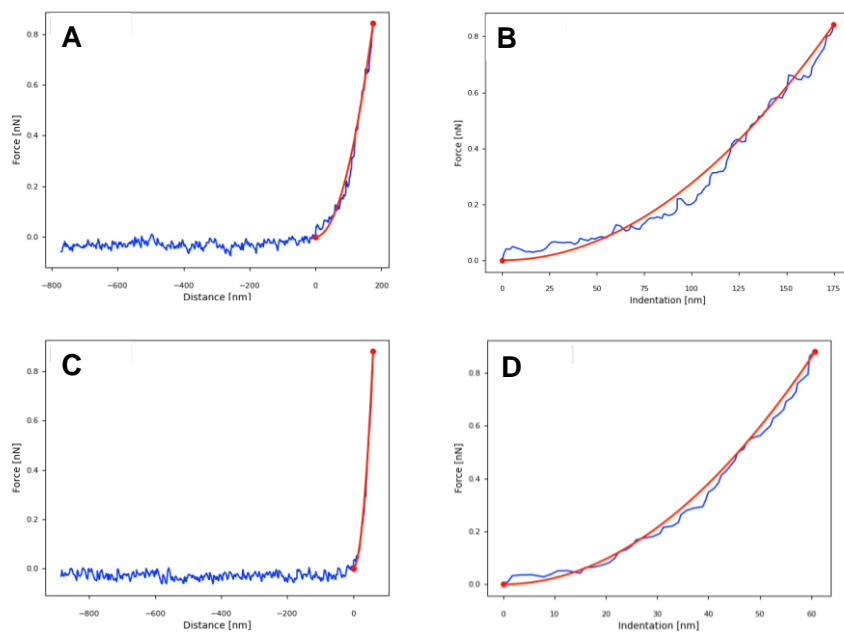


**Figure S2.** AFM height (left) and deflection (right) images recorded on human articular cartilage submitted to different treatments (see **Table 5**).

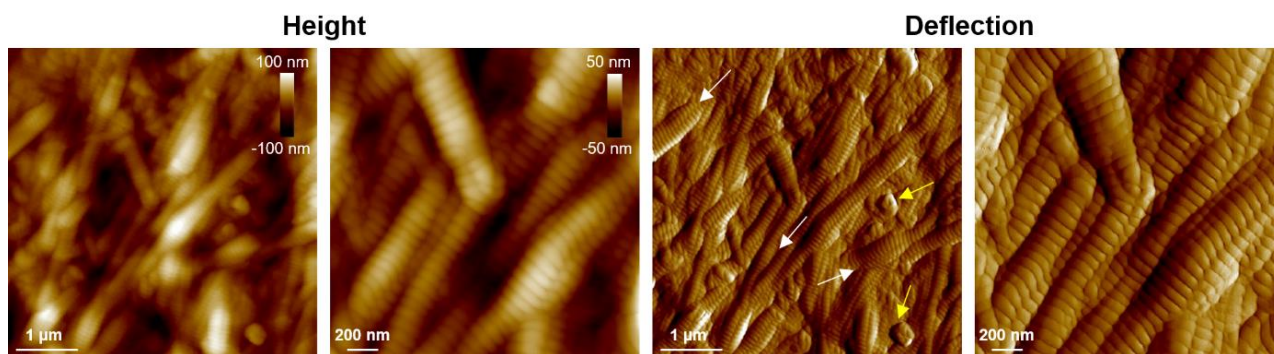


**Figure S3.** AFM height (top) and deflection (bottom) images recorded on OA cartilage ECM at low, moderate and high scores, showing the presence of spheroid-shaped particles (see arrows).



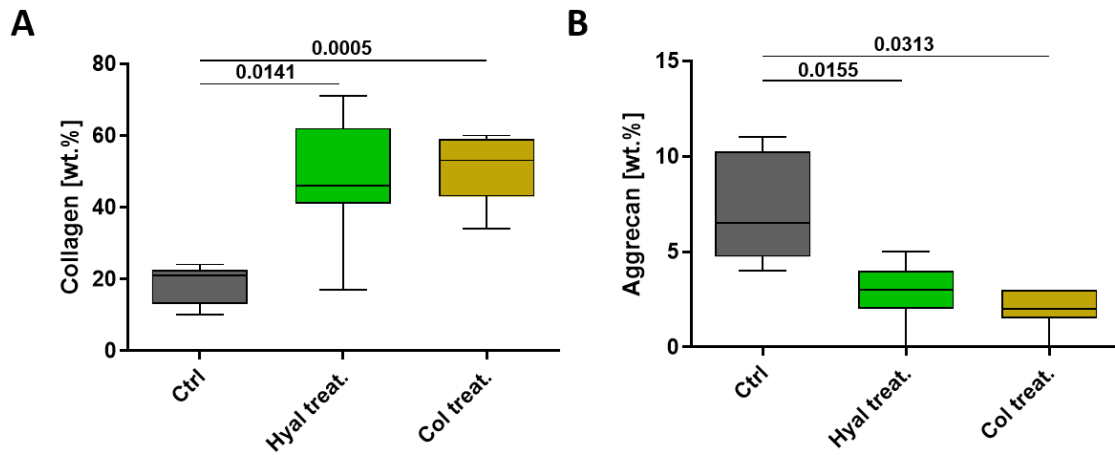


**Figure S4.** Typical (A, C) force-distance and (B, D) force-indentation curves recorded on cartilage ECM showing different stiffness. Experimental approach curves and the corresponding fitting curves, obtained using the Bilodeau model, are shown, respectively, in blue and in red.

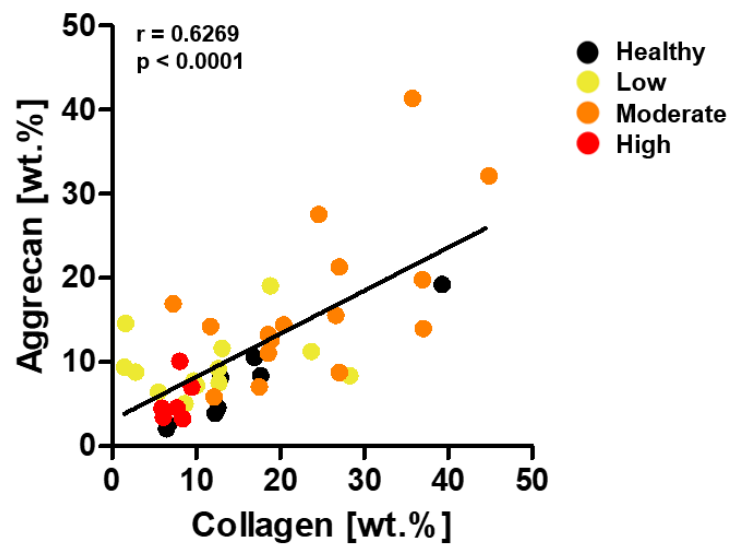


**Figure S5.** AFM height and deflection images (as indicated) recorded on a healthy cartilage after enzymatic hyaluronidase/collagenase treatment. Lateral fusion of collagen fibrils and spheroid-shaped nanostructures are indicated by white and yellow arrows, respectively.

## S6. XPS data



**Figure S6.** Evolution of the weight percentages (wt.%) of (A) collagen and (B) Aggrecan prior to and after hyaluronidase (Hyal treat.) and collagenase (Col treat.) treatments.



**Figure S7.** Correlation between the amount of collagen and aggrecan with a discrimination by histopathological OA severity. Statistical analysis: Spearman correlation of 0.06269;  $p < 0.0001$ :\*\*\*\*

## S7. Nanomechanical properties

**Table S18.** Nanomechanical properties measured by AFM on cartilage tissues from the literature.

Ref	TISSUE							SCORING	AFM MODE			RESULTS
	species	joint	localisation within joint	sample preparation (shape, treatment, storage and cutting)					mode	parameters	localisation and direction	
Tschaikowsky et al., Acta Biomater., 2021	Human	knee	femoral condyle	discs (4 mm ;300 µm)	dapi staining	PBS, -80°C	/	SCSO	indentation	k=0.35 N.m <sup>-1</sup> , v=120-130 µm.s <sup>-1</sup> , F=0.7-1.0 N	cartilage surface; perpendicular	Softening with OA severity
Tang et al., Soft Materials, 2014	Human	hip; knee	NI	piece of 2mm <sup>2</sup>	collagen extraction	H <sub>2</sub> O w/ 2%SDS, 4°C	/	/	indentation	/	NI : extracted collagen fibrils	Stiffening with OA
Shao et al., RSC Adv., 2014	Human	knee	NI	piece of 2mm <sup>2</sup>	/	OCT, -24°C	sectioned parallelly to surface (5-20 µm)	Outerbridge	indentation	k=20.36 nN.nm <sup>-1</sup>	cartilage surface; perpendicular	Stiffening with OA severity
Wilusz et al., Osteo. and Cart.,2013	Human	knee	femoral condyle	explant (8mm)	/	OCT, -20°C	sectioned perpendicularly to surface	Collin	indentation	k=7.5 N.m <sup>-1</sup> , v=15 µm.s <sup>-1</sup> , F=750 nN	cartilage depth; parallel	Softening with OA severity
Wen, Osteo. and Cart., 2012	Human	hip; knee	femoral head, lateral plateau tibial	osteocondral plug (5mm)	/	OCT, -20°C	sectioned parallelly to surface (50 mm)	Outerbridge	Indentation	/	cartilage different depth, perpendicular	Stiffening with OA severity
Stolz et al., Nat. Nano, 2009	Human	hip, knee	NI	osteocondral plug (2mm)	/	PBS, ice	/	Outerbridge	Indentation	k=0.06 N.m <sup>-1</sup> , v=3Hz, F=1.8 nN	cartilage surface; perpendicular	Softening with OA severity

# **Dynamics of extracellular matrix remodeling associated with calcification during the hypertrophic differentiation of articular chondrocytes**

## ***Supplementary Information***

Ilhem Lilia Jaabar, Brittany Foley, Alberto Mezzetti, Françoise Pillier, Francis Berenbaum, Jessem Landoulsi, Xavier Houard

### **Content**

#### **S1. Materials and Methods**

**S1.1. Forward and reverse PCR primer sequences**

**S1.2. Antibody used for immunofluorescence and western blot**

**S1.3. Collect of chondrocyte matrix-covered glass slides**

#### **S2. *In vitro* model validation: chondrocyte phenotype markers**

#### **S3. Mineralization**

**S3.1. EDX and XRD data**

**S3.2. IR data**

**S3.3. Inorganic phosphate regulators**

#### **S4. Matrix remodeling**

**S4.1. Osteoblast matrix**

**S4.2. Hyaluronidase RNA expression**

## S1. Materials and Methods

### S1.1. Forward and reverse PCR primer sequences

**Table S19.** Forward and reverse PCR primer sequences

Name	Encoded gene	Forward	Reverse
Aggrecan	Acan	CAG AGT TAG TGG AGG GTG TGA	AGA CCC TGG GAA GTT TGT
Progressive ankylosis	Ank	CTC CTC CTC CCA TCA AGT	AGC GAT TCT GAG TTA CAA AGC
Bone morphogenetic protein 2	Bmp2	GAG GCG AAG AAA AGC AAC AG	GGG GAA GCA GCA ACA CTA GA
Type I collagen	Col1a1	CTG GCA AGA ATG GCG AT	ATG ACC CTT TAT GCC TCT G
Type II collagen	Col2	GGC AAC AGC AGG TTC ACA TA	ATG GGT GCG ATG TCA ATA AT
Type III collagen	Col3a1	GTT CCC CAG GCC CAC TTG GAA T	GAG GAC CAC GTT CCC CAT TAT GGC
Type VI collagen	Col6a2	CAC CAA GCC AGC CAC TCA TAA	GGC ACT GTT CTC CGT GAC TT
Type IX collagen	Col9a1	CCC CAG GAG AGG TTG GAC	TCC TAC CGG GCC TCT ACT G
Type X collagen	Col10a1	CCT TGT GGG TGG CAG TA	TTT CTG GCT TAG GAG TGG GA
Type XI collagen	Col11a1	CCC GGG ATG CTT GTT GAA GCA C	TCA CCC CCA TAG CGG AAT GGT AAC
Dentin matrix acidic phosphoprotein 1	Dmp1	AGG AAT CGC ATC CCA ATA TG	TCA GTA TTG TGG TAT CTG GCA ACT
Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1	Enpp1	ACC ACA GAA GAT GAT GAC ATT T	TGA GGA AGG TGT AAG ACG C
Hyaluronidase	Hyal1	TAG GGT GGT TGT GGA ACC AGA GCT AT	CGG TGT CGA ACG TAC ATC TGT GAC T
Hyaluronidase	Hyal2	AAC GTG CCC ACA CAA GAA TGT GC	TGA AAA AAC CCT CAT TCG GTG TAG CCT TC
Indian hedgehog	Ihh	CAC CTT CAG TGA TGT GCT TAT TT	GGG CTG CTG GTT CTG TA
Matrix metalloproteinase 13	Mmp13	GAT GGC ACT GCT GAC ATC AT	TGT AGC CTT TGG AAC TGC TT
Osteocalcin	Osteocalcin	GGA GGG CAA TAA GGT AGT GAA C	CAA GCA GGG TTA AGC TCA CA
Osteomodulin	Osteomodulin	TTC CAA GGA ATT TGG AAC ATC T	TGT TAA ATG GTG ATG GTG TAC TGG
Small novel rich in cartilage	Snorc	GGC AAT TCA ATA GGC TCG TT	TGC TCA TCT CTG GGG TCC T
Versican	Vcan	GAT GTG TCC AAT GAA GTT AGA ATG CTC	GTT TGA GGC AGA AAA GCA GTG G

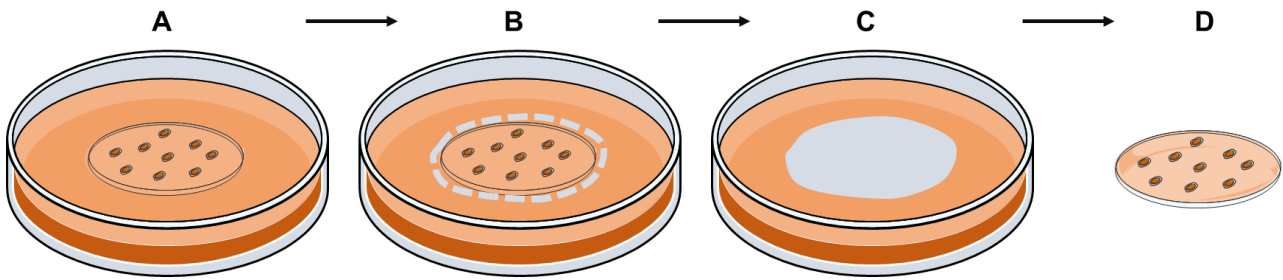
### S1.2. Antibody used for immunofluorescence and western blot

**Table S20.** Reference and dilution of the antibody used for this study

Antibody	Host species	Product reference	Application	Dilution
Anti-collagen I	Rabbit monoclonal	Ab260043	IF	1:200
Anti-collagen II	Rabbit polyclonal	Ab34712	IF / WB	1:200 / 1:500
Anti-collagen VI	Rabbit polyclonal	Ab6588	IF / WB	1:200
Anti-collagen X	Rabbit polyclonal	ARG23686,	IF	1:200
Anti-Mmp13	Rabbit polyclonal	Sc30073	WB	1:500
Anti-Rabbit igG (H+L) Alexa fluor 647	Chicken	A-21443	IF	1:100
Draq5		Ab108410	IF	1:1000

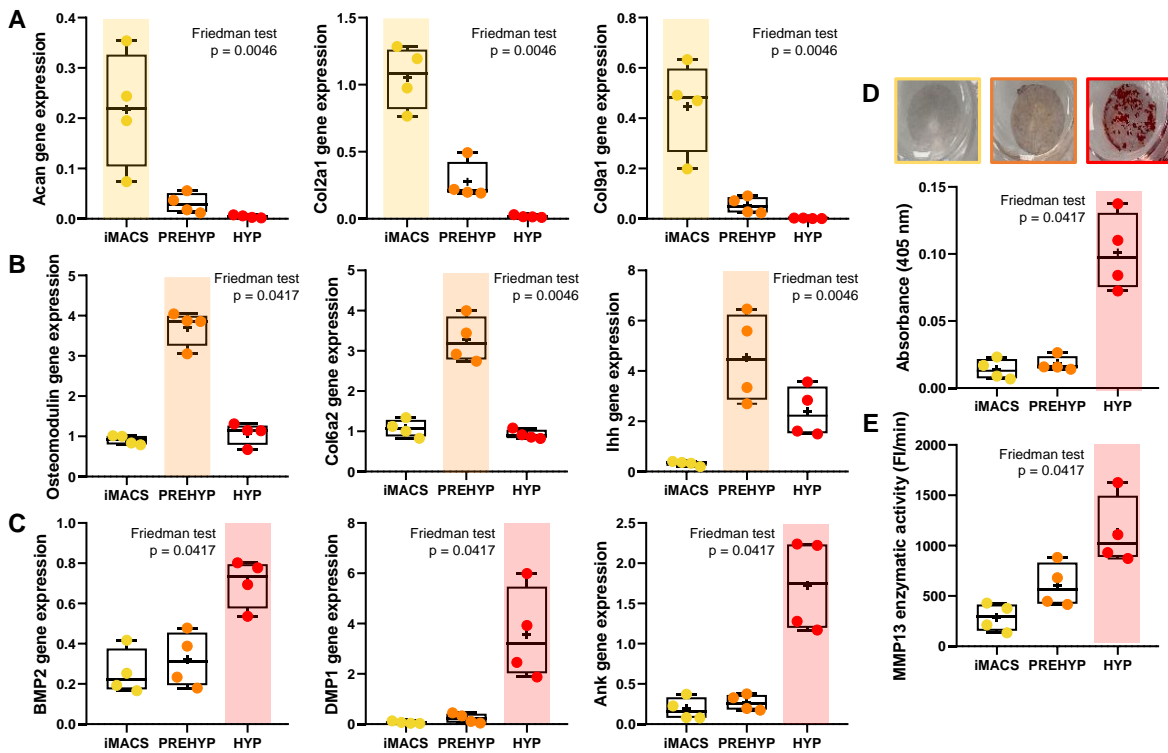


### S1.3. Collect of chondrocyte matrix-covered glass slides



**Figure S8.** Schematic illustration of the retrieval of the glass slides covered with cells and ECM at the end of cell culture.

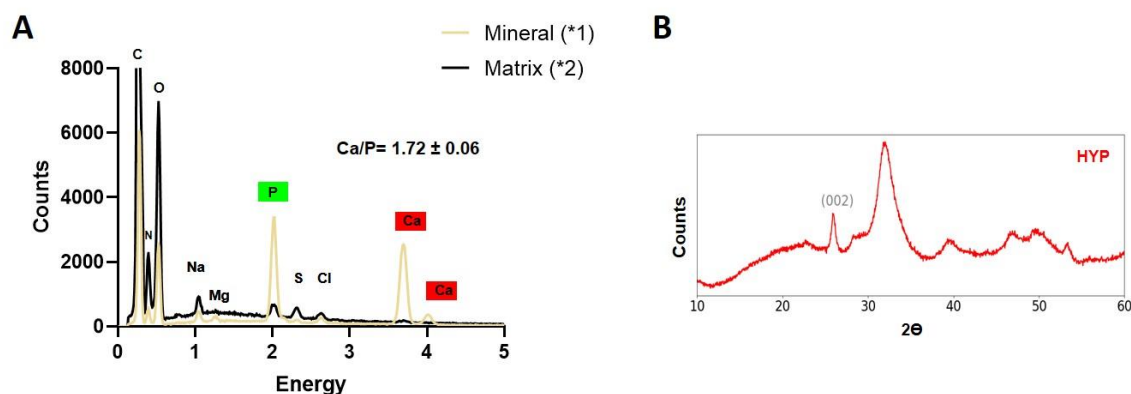
## S2. *In vitro* model validation: chondrocyte phenotype markers



**Figure S9.** Hypertrophic differentiation markers assessed in iMACs differentiated into Prehyp and Hyp chondrocytes. (A-B) Gene expression pattern of iMACs, Prehyp and Hyp chondrocytes (D) Representative photomicrographs of alizarin red staining of iMACs, Prehyp and Hyp chondrocytes, upper panels, and the calcification quantification by the measuring of the associated optical density. Only Hyp chondrocytes showed a positive alizarin red staining. (E) Measurement of MMP-13 activity associated with iMACs, Prehyp and Hyp chondrocytes.

### S3. Mineralization

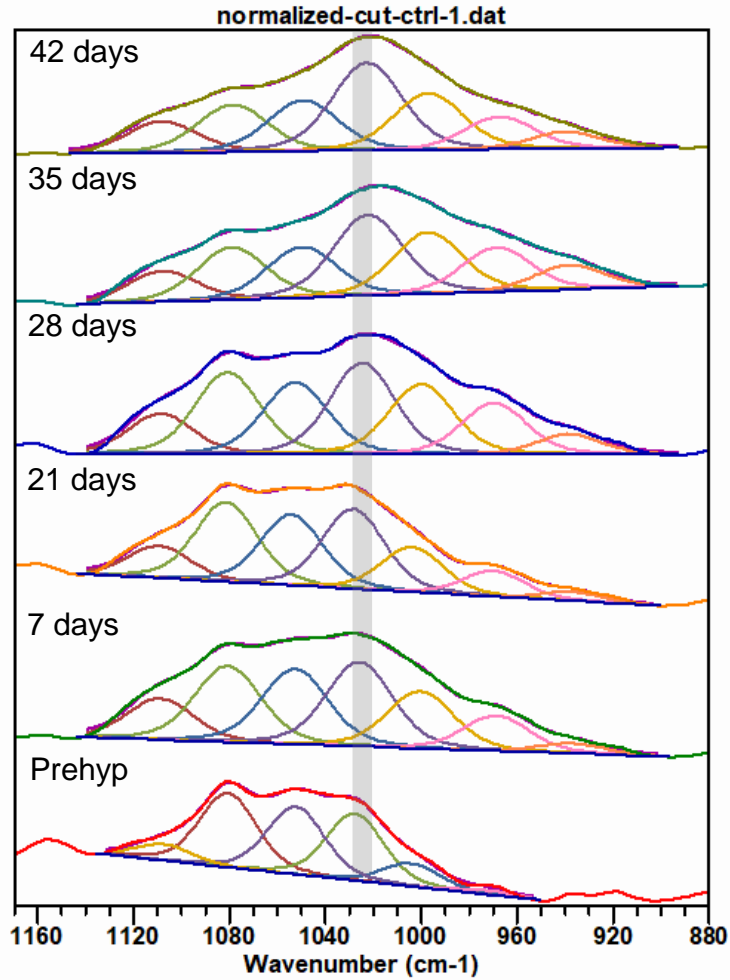
#### S3.1. EDX and XPS data



**Figure S10.** (A) EDX spectra extracted from chemical mapping of the matrix (1) and (2) the mineral (B) XRD analysis performed on the mineral powder gathered from Hyp chondrocytes matrices

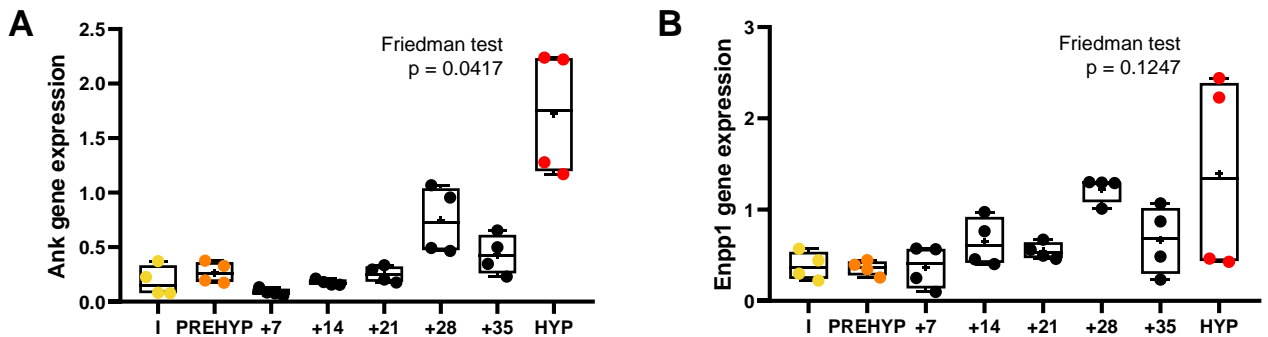
#### S3.2. IR data

Visualization and annotation of the resulting spectra was achieved using the OriginPro 2018 software (Origin(Pro), Version b9.5.1.195. OriginLab Corporation, Northhampton, MA, USA). The software also used in part for quantitative analysis of the spectra, specifically in identifying poorly resolved peaks by consideration of the second derivative function (height filtered, 10% threshold) over the  $\nu_1$ - $\nu_3$  phosphate band region ( $1200$ - $900\text{ cm}^{-1}$ ). Peak fitting of the normalized spectra was then based on the second derivative findings. For each of the amide ( $1770$ - $1350\text{ cm}^{-1}$ ) and  $\nu_1$ - $\nu_3$  phosphate absorption band regions, a linear baseline was applied and constituent peaks were fitted with a Gaussian line shape. The amide region was fitted with two constrained-FWHM contributions at either  $\sim 1640$  and  $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ , assigned to the amide I and amide II contributions, respectively. The phosphate region was fitted with either six or seven contributions, according to the corresponding second derivative filtering, constrained to have the same FWHM. No constraints on peak position were enforced; both were iteratively refined until convergence was achieved for all regions. The ratio of phosphate contribution at  $1027$ , presumably due to inorganic phosphate, to amide contribution ( $I_{1027}/I_{\text{amide}}$ ) was then defined as the integrated peak area of the fourth fitted component in the phosphate band region (at approximately  $1027\text{ cm}^{-1}$ ) divided by the combined integrated peak areas of the amide I and amide II components.



**Figure S11.** IR spectra recorded on the matrices of Prehyp and Hyp chondrocytes after 7, 21, 28, 35 and 42 days after Hyp induction. Peak fitting over the v1-v3 phosphate band region

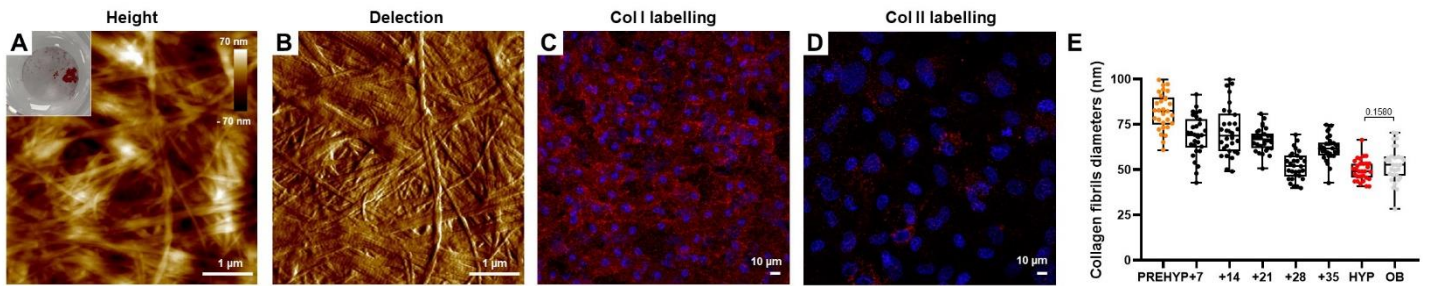
### S3.3. Inorganic phosphate regulators



**Figure S12.** Variation in the gene expression of (A) Ank and (B) Enpp1, two regulators of matrix calcification

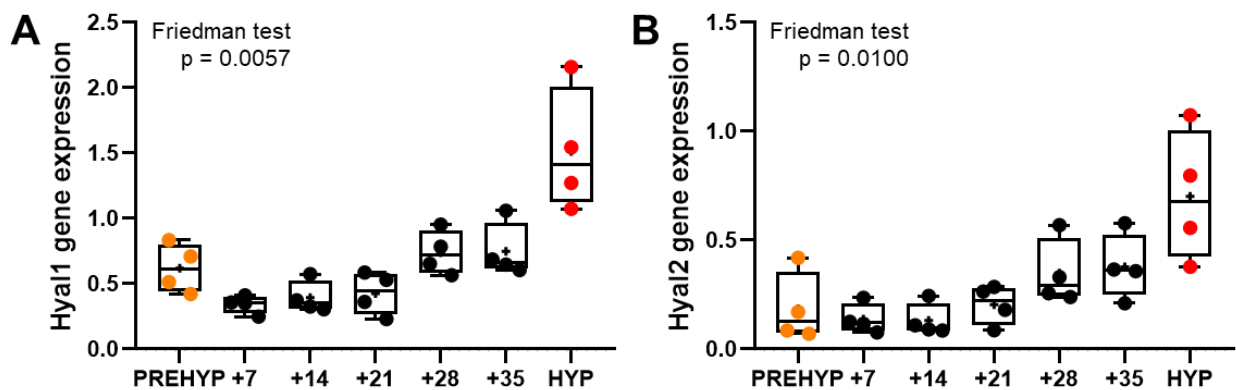
## S4. Matrix remodeling

### S4.1. Osteoblast matrix



**Figure S13.** Osteoblasts has been thus isolated from the calvaria of the same newborn than chondrocytes. (A, input) Alizarin red staining reveals that osteoblast calcify also their matrix, while (A,B) the AFM images exhibits a fibrillar matrix. (C,D) Thanks to immunolabeling, the latter seems to be identified as type I collagen fibril. (E) The quantitative analysis of fibril diameter reveals that the mean diameter measured in osteoblast matrix is similar to the one measure in Hyp matrix.

### S4.2. Hyaluronidase RNA expression



**Figure S14.** Variation in the gene expression of Hyal1 and 2, that encode hyaluronidase 1 and 2, respectively. The latter may prevent the aggregation of proteoglycans by degrading the hyaluronic chain which act as a branching chain

# Appendices

## Communication orale et poster

### Communication orale

- **JAABAR et al.** Journées de Spectroscopies d'Electrons (JSE), Paris, Janvier 2020
- **JAABAR et al.** Doctoral School Days (JED397), Paris, Novembre 2020
- **JAABAR et al.** Journée de l'Interface pour le vivant (IPV day), Paris, Septembre 2021
- **JAABAR et al.** Séminaire annuel du CRSA, Lieusaint, Novembre 2021
- **JAABAR et al.** Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), La Baule, Avril 2022

### Communication poster

- **JAABAR et al.** Séminaire ProMin, Paris, Juillet 2018
- **JAABAR et al.** Séminaire annuel du CRSA, Montvillargene, Novembre 2018
- **JAABAR et al.** Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), Boulogne-sur-Mer, Juin 2019
- **JAABAR et al.** Conférence Internationale sur les Vésicules Matricielles (ICBMS), Lyon, Juin 2019
- **JAABAR et al.** Journée de l'Interface pour le vivant (IPV day), Paris, Septembre 2019
- **JAABAR et al.** Journées de l'Ecole Doctorale (JED397), Paris, Novembre 2020
- **JAABAR et al.** Osteoarthritis Research Society International congress (OARSI), Denver (en ligne), Mars 2021
- **JAABAR et al.** Séminaire annuel du CRSA, Lieusaint, Novembre 2021
- **JAABAR et al.** congrès OARSI, Berlin (en ligne), Avril 2022
- **JAABAR et al.** congrès OARSI, Berlin (en ligne), Avril 2022 (2<sup>nd</sup> poster)
- **JAABAR et al.** Journées Françaises de Biologie des Tissus Minéralisés (JFBTM), La Baule, Avril 2022

## Activités annexes

### Enseignement – Département de chimie UFR 926, Sorbonne Université

64h / an

- Licence 1 – Chimie des Solutions (1CI002) – Travaux Dirigés et Travaux Pratiques
- Licence 2 – Chimie Analytique (2C015) – Chromatographie phase gazeuse – Travaux Pratiques

### Autres

- Membre de la Commission de Recherche de Sorbonne Université: *remplaçante*
- Membre du comité d'animation du Séminaire annuel du CRSA 2019
- Coanimation du jeu scientifique « la traversée du squelette infernal », fête de la science 2020 : <https://view.genial.ly/5f5fa3673c6c490cee94a042/interactive-content-fete-de-la-science-la-traversee-du-squelette-infernal>

# Références

1. Manou, D. *et al.* The Complex Interplay Between Extracellular Matrix and Cells in Tissues. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1952**, 1–20 (2019).
2. Teti, A. Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2**, S83-87 (1992).
3. Hynes, R. O. Extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216–1219 (2009).
4. Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y.-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139–1143 (2005).
5. Pelham, R. J. & Wang, Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 13661–13665 (1997).
6. Yue, B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. *J. Glaucoma* S20–S23 (2014) doi:10.1097/IJG.000000000000108.
7. Mecham, R. P. Overview of extracellular matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 10**, Unit 10.1 (2001).
8. Karamanos, N. K., Theocharis, A. D., Neill, T. & Iozzo, R. V. Matrix modeling and remodeling: A biological interplay regulating tissue homeostasis and diseases. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **75–76**, 1–11 (2019).
9. Rozario, T. & DeSimone, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* **341**, 126–140 (2010).
10. Halper, J. & Kjaer, M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **802**, 31–47 (2014).
11. Ricard-Blum, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004978 (2011).
12. Ricard-Blum, S., Dublet, B. & Rest, M. V. *Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI and XIX.* (Oxford University Press, 2000).
13. Gordon, M. K. & Hahn, R. A. Collagens. *Cell Tissue Res.* **339**, 247–257 (2010).
14. Ruggiero, F. *The Collagen Superfamily and Collagenopathies.* (Springer Nature, 2021).
15. Basak, T. *et al.* Comprehensive Characterization of Glycosylation and Hydroxylation of Basement Membrane Collagen IV by High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **15**, 245–258 (2016).
16. Hennet, T. Collagen glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **56**, 131–138 (2019).
17. Beck, K. *et al.* Destabilization of osteogenesis imperfecta collagen-like model peptides correlates with the identity of the residue replacing glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4273–4278 (2000).
18. Bodian, D. L., Madhan, B., Brodsky, B. & Klein, T. E. Predicting the Clinical Lethality of Osteogenesis Imperfecta from Collagen Glycine Mutations. *Biochemistry* **47**, 5424–5432 (2008).
19. Berg, R. A. & Prockop, D. J. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 115–120 (1973).
20. Sakakibara, S. *et al.* Synthesis of (Pro-Hyp-Gly)<sub>n</sub> of defined molecular weights Evidence for the stabilization of collagen triple helix by hydroxyproline. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct.* **303**, 198–202 (1973).
21. Suzuki E, Fraser RDB, & MacRae TP. Role of hydroxyproline in the stabilization of the collagen molecule via water molecules. *nt. J. Biol. Macromol.* **2**, 54–56 (1980).
22. Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B. & Berman, H. M. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**, 75–81 (1994).
23. Bella, J., Brodsky, B. & Berman, H. M. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* **3**, 893–906 (1995).
24. Holmgren, S. K., Taylor, K. M., Bretscher, L. E. & Raines, R. T. Code for collagen’s stability deciphered. *Nature* **392**, 666–667 (1998).
25. Holmgren, S. K., Bretscher, L. E., Taylor, K. M. & Raines, R. T. A hyperstable collagen mimic. *Chem. Biol.* **6**, 63–70 (1999).

26. Kotch, F. W., Guzei, I. A. & Raines, R. T. Stabilization of the Collagen Triple Helix by O-Methylation of Hydroxyproline Residues. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2952–2953 (2008).
27. Dunitz, J. D. & Taylor, R. Organic Fluorine Hardly Ever Accepts Hydrogen Bonds. *Chem. - Eur. J.* **3**, 89–98 (1997).
28. Shoulders, M. D., Hodges, J. A. & Raines, R. T. Reciprocity of Steric and Stereoelectronic Effects in the Collagen Triple Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8112–8113 (2006).
29. Cadamuro, S. A. *et al.* Conformational Properties of 4-Mercaptoproline and Related Derivatives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 2143–2146 (2008).
30. Boryskina, O. P., Bolbukh, T. V., Semenov, M. A., Gasan, A. I. & Maleev, V. Ya. Energies of peptide–peptide and peptide–water hydrogen bonds in collagen: Evidences from infrared spectroscopy, quartz piezogravimetry and differential scanning calorimetry. *J. Mol. Struct.* **827**, 1–10 (2007).
31. Bella, J. & Berman, H. M. Crystallographic Evidence for C $\alpha$ –H $\cdots$ O=C Hydrogen Bonds in a Collagen Triple Helix. *J. Mol. Biol.* **264**, 734–742 (1996).
32. Persikov, A. V., Ramshaw, J. A. M., Kirkpatrick, A. & Brodsky, B. Electrostatic interactions involving lysine make major contributions to collagen triple-helix stability. *Biochemistry* **44**, 1414–1422 (2005).
33. Fallas, J. A., Gauba, V. & Hartgerink, J. D. Solution structure of an ABC collagen heterotrimer reveals a single-register helix stabilized by electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* **284**, 26851–26859 (2009).
34. Okuyama, K. *et al.* Crystal structures of collagen model peptides with Pro-Hyp-Gly repeating sequence at 1.26 Å resolution: implications for proline ring puckering. *Biopolymers* **76**, 367–377 (2004).
35. Newberry, R. W. & Raines, R. T. The n $\rightarrow$  $\pi^*$  Interaction. *Acc. Chem. Res.* **50**, 1838–1846 (2017).
36. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen Structure and Stability. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929–958 (2009).
37. Bornstein, P. The Biosynthesis of Collagen. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 567–603 (1974).
38. Fratzl, P. *et al.* Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J. Struct. Biol.* **122**, 119–122 (1998).
39. Hulmes, D. J. S. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J. Struct. Biol.* **137**, 2–10 (2002).
40. Siegel, R. C. Biosynthesis of Collagen Crosslinks: Increased Activity of Purified Lysyl Oxidase with Reconstituted Collagen Fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 4826–4830 (1974).
41. Rucker, R. B. & Murray, J. Cross-linking amino acids in collagen and elastin. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**, 1221–1236 (1978).
42. Bielajew, B. J., Hu, J. C. & Athanasiou, K. A. Collagen: quantification, biomechanics and role of minor subtypes in cartilage. *Nat. Rev. Mater.* **5**, 730–747 (2020).
43. Ponsioen, T. L. *et al.* Mature Enzymatic Collagen Cross-Links, Hydroxylysylpyridinoline and Lysylpyridinoline, in the Aging Human Vitreous. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 1041–1046 (2009).
44. Eyre, D. R. & Glimcher, M. J. Collagen cross-linking. Isolation of cross-linked peptides from collagen of chicken bone. *Biochem. J.* **135**, 393–403 (1973).
45. Lucero, H. A. & Kagan, H. M. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **63**, 2304–2316 (2006).
46. Eyre, D. R., Weis, M. A. & Wu, J.-J. Advances in collagen cross-link analysis. *Methods San Diego Calif* **45**, 65–74 (2008).
47. Engel, J. & Bächinger, H. P. Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix. in *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly* (eds. Brinckmann, J., Notbohm, H. & Müller, P. K.) 7–33 (Springer, 2005). doi:10.1007/b103818.
48. Morozova, S. & Muthukumar, M. Electrostatic effects in collagen fibril formation. *J. Chem. Phys.* **149**, 163333 (2018).
49. Chapman, J. A. The staining pattern of collagen fibrils. I. An analysis of electron micrographs. *Connect. Tissue Res.* **2**, 137–150 (1974).
50. Olsen, B. R. ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON COLLAGEN. III. TRYPTIC DIGESTION OF TROPICOLLAGEN MACROMOLECULES. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948* **61**, 913–919 (1964).
51. Petruska, J. A. & Hodge, A. J. A SUBUNIT MODEL FOR THE TROPICOLLAGEN MACROMOLECULE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **51**, 871–876 (1964).



52. Hulmes, D. J. & Miller, A. Quasi-hexagonal molecular packing in collagen fibrils. *Nature* **282**, 878–880 (1979).
53. Hulmes, D. J., Wess, T. J., Prockop, D. J. & Fratzl, P. Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils. *Biophys. J.* **68**, 1661–1670 (1995).
54. Orgel, J. P. R. O., Irving, T. C., Miller, A. & Wess, T. J. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 9001–9005 (2006).
55. Schmitt, F. O., Hall, C. E. & Jakus, M. A. Electron microscope investigations of the structure of collagen. *J. Cell. Comp. Physiol.* **20**, 11–33 (1942).
56. Sorushanova, A. *et al.* The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **31**, e1801651 (2019).
57. Wu, J.-J., Weis, M. A., Kim, L. S. & Eyre, D. R. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *J. Biol. Chem.* **285**, 18537–18544 (2010).
58. Cheng, W., Yan-hua, R., Fang-gang, N. & Guo-an, Z. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *Afr. J. Biotechnol.* **10**, 2524–2529 (2011).
59. Smith, L. T., Holbrook, K. A. & Madri, J. A. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am. J. Anat.* **175**, 507–521 (1986).
60. Birk, D. E., Fitch, J. M. & Linsenmayer, T. F. Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **27**, 1470–1477 (1986).
61. Niyibizi, C. & Eyre, D. R. Identification of the cartilage  $\alpha$  1(XI) chain in type V collagen from bovine bone. *FEBS Lett.* **242**, 314–318 (1989).
62. Birk, D. E. & Bruckner, P. Collagen Suprastructures. in *Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly* (eds. Brinckmann, J., Notbohm, H. & Müller, P. K.) 185–205 (Springer, 2005). doi:10.1007/b103823.
63. Olsen, B. R. Collagen IX. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 555–558 (1997).
64. Nishiyama, T., McDonough, A. M., Bruns, R. R. & Burgeson, R. E. Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability. *J. Biol. Chem.* **269**, 28193–28199 (1994).
65. Keene, D. R., Lunstrum, G. P., Morris, N. P., Stoddard, D. W. & Burgeson, R. E. Two type XII-like collagens localize to the surface of banded collagen fibrils. *J. Cell Biol.* **113**, 971–978 (1991).
66. Vasios, G. *et al.* Cartilage type IX collagen-proteoglycan contains a large amino-terminal globular domain encoded by multiple exons. *J. Biol. Chem.* **263**, 2324–2329 (1988).
67. Huber, S. *et al.* Identification of the type IX collagen polypeptide chains. The alpha 2(IX) polypeptide carries the chondroitin sulfate chain(s). *J. Biol. Chem.* **261**, 5965–5968 (1986).
68. McCormick, D. *et al.* Structure of the glycosaminoglycan domain in the type IX collagen-proteoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 4044–4048 (1987).
69. Vaughan, L., Mendler, M. & Huber, S. P. BRUCKNER, KH WINTERHALTER, MH IRWIN & R. MayNE. 1988. -*Period. Distrib. Collagen Type IX Carti-Lage-Fibrils J Cell Biol* **106**, 991–997.
70. Ameys, L. & Young, M. F. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* **12**, 107R–16R (2002).
71. Kalamajski, S. & Oldberg, A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **29**, 248–253 (2010).
72. Wenstrup, R. J. *et al.* Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J. Biol. Chem.* **279**, 53331–53337 (2004).
73. Ansoorge, H. L. *et al.* Type XIV Collagen Regulates Fibrillogenesis: PREMATURE COLLAGEN FIBRIL GROWTH AND TISSUE DYSFUNCTION IN NULL MICE. *J. Biol. Chem.* **284**, 8427–8438 (2009).
74. Kadler, K. E., Hill, A. & Canty-Laird, E. G. Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 495–501 (2008).
75. Tu, H., Huhtala, P., Lee, H.-M., Adams, J. C. & Pihlajaniemi, T. Membrane-associated collagens with interrupted triple-helices (MACITs): evolution from a bilaterian common ancestor and functional conservation in *C. elegans*. *BMC Evol. Biol.* **15**, 281 (2015).
76. Izzi, V. *et al.* Exploring the roles of MACIT and multiplexin collagens in stem cells and cancer. *Semin. Cancer Biol.* **62**, 134–148 (2020).

77. Veit, G. *et al.* Shedding of Collagen XXIII Is Mediated by Furin and Depends on the Plasma Membrane Microenvironment\*. *J. Biol. Chem.* **282**, 27424–27435 (2007).
78. Väisänen, M.-R., Väisänen, T. & Pihlajaniemi, T. The shed ectodomain of type XIII collagen affects cell behaviour in a matrix-dependent manner. *Biochem. J.* **380**, 685–693 (2004).
79. Wakabayashi, T. Transmembrane Collagens in Neuromuscular Development and Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* **13**, (2021).
80. Abreu-Velez, A. M. & Howard, M. S. Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. *North Am. J. Med. Sci.* **4**, 1–8 (2012).
81. Sand, J. M. B., Genovese, F. & Karsdal, M. A. Chapter 4 - Type IV Collagen. in *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin* (ed. Karsdal, M. A.) 31–41 (Academic Press, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-809847-9.00004-0.
82. Li, D., Clark, C. C. & Myers, J. C. Basement Membrane Zone Type XV Collagen Is a Disulfide-bonded Chondroitin Sulfate Proteoglycan in Human Tissues and Cultured Cells \*. *J. Biol. Chem.* **275**, 22339–22347 (2000).
83. Halfter, W., Dong, S., Schurer, B. & Cole, G. J. Collagen XVIII Is a Basement Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan \*. *J. Biol. Chem.* **273**, 25404–25412 (1998).
84. Davis, G. E., Bayless, K. J., Davis, M. J. & Meininger, G. A. Regulation of Tissue Injury Responses by the Exposure of Matricryptic Sites within Extracellular Matrix Molecules. *Am. J. Pathol.* **156**, 1489–1498 (2000).
85. Marneros, A. G. & Olsen, B. R. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol.* **20**, 337–345 (2001).
86. Ortega, N. & Werb, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* **115**, 4201–4214 (2002).
87. Ricard-Blum, S. Implication des matricryptines issues des collagènes non fibrillaires, de MMP-2 et de SPARC dans le contrôle de l'angiogenèse. *J. Société Biol.* **197**, 41–44 (2003).
88. Ylikärppä, R. *et al.* Double knockout mice reveal a lack of major functional compensation between collagens XV and XVIII. *Matrix Biol.* **22**, 443–448 (2003).
89. Kielty, C. M. & Grant, M. E. The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix. in *Connective Tissue and Its Heritable Disorders* 159–221 (John Wiley & Sons, Ltd, 2002). doi:10.1002/0471221929.ch2.
90. Ball, S., Bella, J., Kielty, C. & Shuttleworth, A. Structural basis of type VI collagen dimer formation. *J. Biol. Chem.* **278**, 15326–15332 (2003).
91. Knupp, C. & Squire, J. A new twist in the collagen story - the type VI segmented supercoil. *EMBO J.* **20** (3), 372–376 (2001).
92. Van Der Rest, M. & Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* **5**, 2814–2823 (1991).
93. Seibel, M. J., Robins, S. P. & Bilezikian, J. P. *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications*. (Elsevier, 2006).
94. Baldock, C., Sherratt, M. J., Shuttleworth, C. A. & Kielty, C. M. The supramolecular organization of collagen VI microfibrils. *J. Mol. Biol.* **330**, 297–307 (2003).
95. Bruns, R. R., Press, W., Engvall, E., Timpl, R. & Gross, J. Type VI collagen in extracellular, 100-nm periodic filaments and fibrils: identification by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* **103**, 393–404 (1986).
96. Chen, S. & Birk, D. E. The regulatory roles of small leucine-rich proteoglycans in extracellular matrix assembly. *FEBS J.* **280**, 2120–2137 (2013).
97. Wiberg, C., Heinegård, D., Wenglé, C., Timpl, R. & Mörgelin, M. Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J. Biol. Chem.* **277**, 49120–49126 (2002).
98. Wiberg, C. *et al.* Complexes of Matrilin-1 and Biglycan or Decorin Connect Collagen VI Microfibrils to Both Collagen II and Aggrecan. *J. Biol. Chem.* **278**, 37698–37704 (2003).
99. Chung, H. J. & Uitto, J. Type VII Collagen: The Anchoring Fibril Protein at Fault in Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Dermatol. Clin.* **28**, 93–105 (2010).
100. Colombo, M. *et al.* Procollagen VII self-assembly depends on site-specific interactions and is promoted by cleavage of the NC2 domain with procollagen C-proteinase. *Biochemistry* **42**, 11434–11442 (2003).

101. Burgeson, R. E. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **101**, 252–255 (1993).
102. Muragaki, Y. *et al.* The alpha 2(VIII) collagen gene. A novel member of the short chain collagen family located on the human chromosome 1. *J. Biol. Chem.* **266**, 7721–7727 (1991).
103. Illidge, C., Kielty, C. & Shuttleworth, A. Type VIII collagen: heterotrimeric chain association. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**, 521–529 (2001).
104. Illidge, C., Kielty, C. & Shuttleworth, A. The  $\alpha 1$ (VIII) and  $\alpha 2$ (VIII) Chains of Type VIII Collagen Can Form Stable Homotrimeric Molecules \*. *J. Biol. Chem.* **273**, 22091–22095 (1998).
105. Shuttleworth, C. A. Type VIII collagen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1145–1148 (1997).
106. Sawada, H., Konomi, H. & Hirosawa, K. Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's membrane: its relation to type VIII collagen. *J. Cell Biol.* **110**, 219–227 (1990).
107. Kwan, A. P., Cummings, C. E., Chapman, J. A. & Grant, M. E. Macromolecular organization of chicken type X collagen in vitro. *J. Cell Biol.* **114**, 597–604 (1991).
108. Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B. & Cohen, R. E. Collagen: An Overview. *Implant Dent.* **11**, 280–285 (2002).
109. Toole, B. P. Glycosaminoglycans in Morphogenesis. in *Cell Biology of Extracellular Matrix* (ed. Hay, E. D.) 259–294 (Springer US, 1981). doi:10.1007/978-1-4613-0881-2\_10.
110. Zhang, L. Glycosaminoglycans in development, health and disease. Preface. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **93**, xvii–xviii (2010).
111. Deepa, S. S. *et al.* Composition of Perineuronal Net Extracellular Matrix in Rat Brain: A DIFFERENT DISACCHARIDE COMPOSITION FOR THE NET-ASSOCIATED PROTEOGLYCANS\* \*The work at Cambridge University was supported by the Wellcome Trust, the UK Medical Research Council, the Christopher Reeve Foundation, and the Henry Smith Charity. The work at Kobe Pharmaceutical University was supported in part by HAITEKU from the Japan Private School Promotion Foundation, Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of the Japan Science and Technology (JST) Corporation, and grants-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Culture, and Sports of Japan (MEXT). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact. *J. Biol. Chem.* **281**, 17789–17800 (2006).
112. Simon Davis, D. A. & Parish, C. R. Heparan sulfate: a ubiquitous glycosaminoglycan with multiple roles in immunity. *Front. Immunol.* **4**, 470 (2013).
113. Karamanos, N. K. *et al.* Proteoglycan Chemical Diversity Drives Multifunctional Cell Regulation and Therapeutics. *Chem. Rev.* **118**, 9152–9232 (2018).
114. Iozzo, R. V. & Schaefer, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **42**, 11–55 (2015).
115. Korpetinou, A. *et al.* Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy. *Front. Oncol.* **3**, 327 (2014).
116. Bouris, P. *et al.* Serglycin promotes breast cancer cell aggressiveness: Induction of epithelial to mesenchymal transition, proteolytic activity and IL-8 signaling. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **74**, 35–51 (2018).
117. Korpetinou, A. *et al.* Increased Expression of Serglycin in Specific Carcinomas and Aggressive Cancer Cell Lines. *BioMed Res. Int.* **2015**, 690721 (2015).
118. Afratis, N. A. *et al.* Syndecans - key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J.* **284**, 27–41 (2017).
119. Gondelaud, F. & Ricard-Blum, S. Structures and interactions of syndecans. *FEBS J.* **286**, 2994–3007 (2019).
120. Couchman, J. R. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 89–114 (2010).
121. Teng, Y. H.-F., Aquino, R. S. & Park, P. W. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **31**, 3–16 (2012).
122. Leonova, E. I. & Galzitskaya, O. V. Comparative characteristics of the structure and function for animal syndecan-1 proteins. *Mol. Biol.* **47**, 446–452 (2013).
123. Sarrazin, S., Lamanna, W. C. & Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a004952 (2011).

124. Choi, Y., Chung, H., Jung, H., Couchman, J. R. & Oh, E.-S. Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **30**, 93–99 (2011).
125. Bishop, J. R., Schuksz, M. & Esko, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037 (2007).
126. Pozzi, A., Yurchenco, P. D. & Iozzo, R. V. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **57–58**, 1–11 (2017).
127. *Essentials of Glycobiology*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015).
128. Johnson, K. & Terkeltaub, R. Upregulated ank expression in osteoarthritis can promote both chondrocyte MMP-13 expression and calcification via chondrocyte extracellular PPI excess. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 321–335 (2004).
129. Häcker, U., Nybakken, K. & Perrimon, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 530–541 (2005).
130. Maeda, N., Ishii, M., Nishimura, K. & Kamimura, K. Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem. Res.* **36**, 1228–1240 (2011).
131. Iozzo, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609–652 (1998).
132. Neame, P. J. & Barry, F. P. The link proteins. *Experientia* **49**, 393–402 (1993).
133. Fraser, J. R., Laurent, T. C. & Laurent, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **242**, 27–33 (1997).
134. Nusgens, B.-V. [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. *Ann. Dermatol. Venereol.* **137 Suppl 1**, S3-8 (2010).
135. Wight, T. N., Toole, B. P. & Hascall, V. C. Hyaluronan and the Aggregating Proteoglycans. in *The Extracellular Matrix: an Overview* (ed. Mecham, R. P.) 147–195 (Springer, 2011). doi:10.1007/978-3-642-16555-9\_5.
136. Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J. & Yang, B. B. Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* **12**, 19–32 (2002).
137. Han, E., Chen, S. S., Klisch, S. M. & Sah, R. L. Contribution of Proteoglycan Osmotic Swelling Pressure to the Compressive Properties of Articular Cartilage. *Biophys. J.* **101**, 916–924 (2011).
138. Sheng, W. *et al.* The Roles of Versican V1 and V2 Isoforms in Cell Proliferation and Apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1330–1340 (2005).
139. Schaefer, L., Tredup, C., Gubbiotti, M. A. & Iozzo, R. V. Proteoglycan neofunctions: regulation of inflammation and autophagy in cancer biology. *FEBS J.* **284**, 10–26 (2017).
140. Karamanou, K. *et al.* Lumican effectively regulates the estrogen receptors-associated functional properties of breast cancer cells, expression of matrix effectors and epithelial-to-mesenchymal transition. *Sci. Rep.* **7**, 45138 (2017).
141. Buraschi, S., Neill, T. & Iozzo, R. V. Decorin is a devouring proteoglycan: Remodeling of intracellular catabolism via autophagy and mitophagy. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **75–76**, 260–270 (2019).
142. Kram, V., Kilts, T. M., Bhattacharyya, N., Li, L. & Young, M. F. Small leucine rich proteoglycans, a novel link to osteoclastogenesis. *Sci. Rep.* **7**, 12627 (2017).
143. Neill, T., Buraschi, S., Kapoor, A. & Iozzo, R. V. Proteoglycan-driven Autophagy: A Nutrient-independent Mechanism to Control Intracellular Catabolism. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **68**, 733–746 (2020).
144. Schaefer, L. & Iozzo, R. V. Biological Functions of the Small Leucine-rich Proteoglycans: From Genetics to Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **283**, 21305–21309 (2008).
145. Parsons, P. *et al.* Type IX Collagen Interacts with Fibronectin Providing an Important Molecular Bridge in Articular Cartilage. *J. Biol. Chem.* **286**, 34986–34997 (2011).
146. Blumbach, K. *et al.* Combined role of type IX collagen and cartilage oligomeric matrix protein in cartilage matrix assembly: cartilage oligomeric matrix protein counteracts type IX collagen-induced limitation of cartilage collagen fibril growth in mouse chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum.* **60**, 3676–3685 (2009).
147. Eyre, D. R., Pietka, T., Weis, M. A. & Wu, J.-J. Covalent cross-linking of the NC1 domain of collagen type IX to collagen type II in cartilage. *J. Biol. Chem.* **279**, 2568–2574 (2004).
148. Eyre, D. R., Apon, S., Wu, J. J., Ericsson, L. H. & Walsh, K. A. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett.* **220**, 337–341 (1987).

149. van der Rest, M. & Mayne, R. Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J. Biol. Chem.* **263**, 1615–1618 (1988).
150. Wu, J. J., Woods, P. E. & Eyre, D. R. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J. Biol. Chem.* **267**, 23007–23014 (1992).
151. Diab, M., Wu, J. J. & Eyre, D. R. Collagen type IX from human cartilage: a structural profile of intermolecular cross-linking sites. *Biochem. J.* **314** ( Pt 1), 327–332 (1996).
152. Budde, B. *et al.* Altered integration of matrilin-3 into cartilage extracellular matrix in the absence of collagen IX. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10465–10478 (2005).
153. Pihlajamaa, T. *et al.* Characterization of recombinant amino-terminal NC4 domain of human collagen IX: interaction with glycosaminoglycans and cartilage oligomeric matrix protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 24265–24273 (2004).
154. Tillgren, V., Onnerfjord, P., Haglund, L. & Heinegård, D. The tyrosine sulfate-rich domains of the LRR proteins fibromodulin and osteoadherin bind motifs of basic clusters in a variety of heparin-binding proteins, including bioactive factors. *J. Biol. Chem.* **284**, 28543–28553 (2009).
155. Fresquet, M. *et al.* Structural and Functional Characterization of Recombinant Matrilin-3 A-domain and Implications for Human Genetic Bone Diseases. *J. Biol. Chem.* **282**, 34634–34643 (2007).
156. Hecht, J. T., Hayes, E., Haynes, R. & Cole, W. G. COMP mutations, chondrocyte function and cartilage matrix. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **23**, 525–533 (2005).
157. Nicolae, C. *et al.* Abnormal collagen fibrils in cartilage of matrilin-1/matrilin-3-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 22163–22175 (2007).
158. Halász, K., Kassner, A., Mörgelin, M. & Heinegård, D. COMP Acts as a Catalyst in Collagen Fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 31166–31173 (2007).
159. Schinagl, R. M., Gurskis, D., Chen, A. C. & Sah, R. L. Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage. *J. Orthop. Res.* **15**, 499–506 (1997).
160. Tomkoria, S., Patel, R. V. & Mao, J. J. Heterogeneous nanomechanical properties of superficial and zonal regions of articular cartilage of the rabbit proximal radius condyle by atomic force microscopy. *Med. Eng. Phys.* **26**, 815–822 (2004).
161. Knudson, C. B. & Knudson, W. Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**, 69–78 (2001).
162. Roughley, P. J. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur. Cell. Mater.* **12**, 92–101 (2006).
163. Vogel, K. G., Paulsson, M. & Heinegård, D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem. J.* **223**, 587–597 (1984).
164. Xu, T. *et al.* Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* **20**, 78–82 (1998).
165. Chakravarti, S. *et al.* Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell Biol.* **141**, 1277–1286 (1998).
166. Alexopoulos, L. G., Williams, G. M., Upton, M. L., Setton, L. A. & Guilak, F. Osteoarthritic changes in the biphasic mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage. *J. Biomech.* **38**, 509–517 (2005).
167. Kim, E., Guilak, F. & Haider, M. A. An axisymmetric boundary element model for determination of articular cartilage pericellular matrix properties in situ via inverse analysis of chondron deformation. *J. Biomech. Eng.* **132**, 031011 (2010).
168. Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D. & Worch, H. Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* **7**, 2388–2393 (2006).
169. Viola, M. *et al.* Fibromodulin Interactions with Type I and II Collagens. *Connect. Tissue Res.* **48**, 141–8 (2007).
170. Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, Å., Chervoneva, I. & Birk, D. E. Differential Expression of Lumican and Fibromodulin Regulate Collagen Fibrillogenesis in Developing Mouse Tendons. *J. Cell Biol.* **151**, 779–788 (2000).
171. Neame\*, P. J., Kay, C. J., McQuillan, \*\*, D. J., Beales, M. P. & Hassell, J. R. Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **57**, 859–863 (2000).

172. Danielson, K. G. *et al.* Targeted Disruption of Decorin Leads to Abnormal Collagen Fibril Morphology and Skin Fragility. *J. Cell Biol.* **136**, 729–743 (1997).
173. Stamov, D. R., Müller, A., Wegrowski, Y., Brezillon, S. & Franz, C. M. Quantitative analysis of type I collagen fibril regulation by lumican and decorin using AFM. *J. Struct. Biol.* **183**, 394–403 (2013).
174. Zhang, G. *et al.* Genetic Evidence for the Coordinated Regulation of Collagen Fibrillogenesis in the Cornea by Decorin and Biglycan \*. *J. Biol. Chem.* **284**, 8888–8897 (2009).
175. Chakravarti, S., Zhang, G., Chervoneva, I., Roberts, L. & Birk, D. E. Collagen fibril assembly during postnatal development and dysfunctional regulation in the lumican-deficient murine cornea. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **235**, 2493–2506 (2006).
176. Svensson, L., Närlid, I. & Oldberg, A. Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett.* **470**, 178–182 (2000).
177. Kalamajski, S. & Oldberg, Å. Homologous sequence in lumican and fibromodulin leucine-rich repeat 5-7 competes for collagen binding. *J. Biol. Chem.* **284**, 534–539 (2009).
178. Chakravarti, S. Functions of lumican and fibromodulin: Lessons from knockout mice. *Glycoconj. J.* **19**, 287–293 (2002).
179. Hedbom, E. & Heinegård, D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J. Biol. Chem.* **268**, 27307–27312 (1993).
180. Goldberg, M. *et al.* Differential effects of fibromodulin deficiency on mouse mandibular bones and teeth: a micro-CT time course study. *Cells Tissues Organs* **194**, 205–210 (2011).
181. Verzijl, N. *et al.* Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* **275**, 39027–39031 (2000).
182. Sivan, S.-S. *et al.* Collagen turnover in normal and degenerate human intervertebral discs as determined by the racemization of aspartic acid. *J. Biol. Chem.* **283**, 8796–8801 (2008).
183. Leung, D. Y., Glagov, S. & Mathews, M. B. Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science* **191**, 475–477 (1976).
184. Li, Q., Muragaki, Y., Hatamura, I., Ueno, H. & Ooshima, A. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta. *J. Vasc. Res.* **35**, 93–103 (1998).
185. O’Callaghan, C. J. & Williams, B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertens. Dallas Tex 1979* **36**, 319–324 (2000).
186. Prajapati, R. T., Chavally-Mis, B., Herbage, D., Eastwood, M. & Brown, R. A. Mechanical loading regulates protease production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **8**, 226–237 (2000).
187. Csiszar, K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **70**, 1–32 (2001).
188. Kagan, H. M. & Li, W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell. Biochem.* **88**, 660–672 (2003).
189. Summey, B. T., Graff, R. D., Lai, T.-S., Greenberg, C. S. & Lee, G. M. Tissue transglutaminase localization and activity regulation in the extracellular matrix of articular cartilage. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **20**, 76–82 (2002).
190. Collighan, R. J. & Griffin, M. Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids* **36**, 659–670 (2009).
191. Schnider, S. L. & Kohn, R. R. Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **66**, 1179–1181 (1980).
192. Mosher, D. F. & Schad, P. E. Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *J. Clin. Invest.* **64**, 781–787 (1979).
193. Avery, N. C. & Bailey, A. J. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol. Biol. (Paris)* **54**, 387–395 (2006).
194. Willett, T. L., Kandel, R., De Croos, J. N. A., Avery, N. C. & Grynepas, M. D. Enhanced levels of non-enzymatic glycation and pentosidine crosslinking in spontaneous osteoarthritis progression. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 736–744 (2012).
195. McMahon, M., Ye, S., Pedrina, J., Dlugolenski, D. & Stambas, J. Extracellular Matrix Enzymes and Immune Cell Biology. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 703868 (2021).

196. Klein, T. & Bischoff, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* **41**, 271–290 (2011).
197. Brocker, C. N., Vasiliou, V. & Nebert, D. W. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum. Genomics* **4**, 43–55 (2009).
198. Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N. & McGowan, P. M. The role of ADAMs in disease pathophysiology. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **403**, 31–36 (2009).
199. Mead, T. J. *et al.* The metalloproteinase-proteoglycans ADAMTS7 and ADAMTS12 provide an innate, tendon-specific protective mechanism against heterotopic ossification. *JCI Insight* **3**, 92941 (2018).
200. Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Do, L. D. & Hritz, B. G. Metalloproteinases and Their Inhibitors: Potential for the Development of New Therapeutics. *Cells* **9**, E1313 (2020).
201. Ra, H.-J. & Parks, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **26**, 587–596 (2007).
202. Chantrain, C. & DeClerck, Y. A. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *médecine/sciences* **18**, 565–575 (2002).
203. Lum, L., Reid, M. S. & Blobel, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* **273**, 26236–26247 (1998).
204. Roghani, M. *et al.* Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 3531–3540 (1999).
205. Kang, T., Zhao, Y.-G., Pei, D., Sucic, J. F. & Sang, Q.-X. A. Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. *J. Biol. Chem.* **277**, 25583–25591 (2002).
206. Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N. & Edwards, D. R. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* **16**, 113 (2015).
207. Longpré, J.-M. *et al.* Characterization of proADAMTS5 processing by proprotein convertases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1116–1126 (2009).
208. Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* **200**, 448–464 (2003).
209. Arpino, V., Brock, M. & Gill, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* **44–46**, 247–254 (2015).
210. Siddhartha, R. & Garg, M. Molecular and clinical insights of matrix metalloproteinases into cancer spread and potential therapeutic interventions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **426**, 115593 (2021).
211. Nelson, A., Fingleton, B., Rothenberg, M. & Matrisian, L. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* (2000) doi:10.1200/JCO.2000.18.5.1135.
212. Marchenko, G. N. *et al.* Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cells of epithelial origin. *Biochem. J.* **356**, 705–718 (2001).
213. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **10**, 415–433 (2000).
214. DeClerck, Y. A. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **36**, 1258–1268 (2000).
215. Shofuda, K. *et al.* Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in regulation of pro-gelatinase A activation catalyzed by membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in human cancer cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 462–470 (1998).
216. Reiss, K. & Saftig, P. The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 126–137 (2009).
217. Black, R. A. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729–733 (1997).
218. Abbaszade, I. *et al.* Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J. Biol. Chem.* **274**, 23443–23450 (1999).
219. Boerboom, D. *et al.* Partially redundant functions of Adamts1 and Adamts4 in the perinatal development of the renal medulla. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **240**, 1806–1814 (2011).

220. Dancevic, C. M. & McCulloch, D. R. Current and emerging therapeutic strategies for preventing inflammation and aggrecanase-mediated cartilage destruction in arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 429 (2014).
221. Dancevic, C. M. *et al.* Biosynthesis and expression of a disintegrin-like and metalloproteinase domain with thrombospondin-1 repeats-15: a novel versican-cleaving proteoglycanase. *J. Biol. Chem.* **288**, 37267–37276 (2013).
222. Elsevier & R, M. PASS Anatomie Organisation des appareils et des systèmes. *Elsevier Connect* <https://www.elsevier.com/fr-fr/connect/etudes-de-medecine/paces-ue-5-organisation-des-appareils-et-des-systemes>.
223. Can You Identify All 3 Types of Joints in the Human Body? *ThoughtCo* <https://www.thoughtco.com/types-of-joints-in-the-body-4173736>.
224. Fibrous Joints | Boundless Anatomy and Physiology. <https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/fibrous-joints/>.
225. Cartilaginous Joints | Boundless Anatomy and Physiology. <https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/cartilaginous-joints/>.
226. Synovial Joints | Boundless Anatomy and Physiology. <https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/synovial-joints/>.
227. Joint Capsule - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/joint-capsule>.
228. Ralphs, J. R. & Benjamin, M. The joint capsule: structure, composition, ageing and disease. *J. Anat.* **184**, 503–509 (1994).
229. Synovium - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/synovium>.
230. Synovial Membrane - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/veterinary-science-and-veterinary-medicine/synovial-membrane>.
231. Johnson, Z. I., Shapiro, I. M. & Risbud, M. V. Extracellular osmolarity regulates matrix homeostasis in the intervertebral disc and articular cartilage: evolving role of TonEBP. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **40**, 10–16 (2014).
232. Dijkgraaf, L. C., De Bont, L. G., Boering, G. & Liem, R. S. Function, biochemistry, and metabolism of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **54**, 95–100 (1996).
233. Kitamura, H. P., Yanase, H., Kitamura, H. & Iwanaga, T. Unique localization of protein gene product 9.5 in type B synoviocytes in the joints of the horse. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **47**, 343–352 (1999).
234. Revell, P. A., al-Saffar, N., Fish, S. & Osei, D. Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann. Rheum. Dis.* **54**, 404–407 (1995).
235. Smith, M. D. The Normal Synovium. *Open Rheumatol. J.* **5**, 100–106 (2011).
236. de Sousa, E. B., Casado, P. L., Neto, V. M., Duarte, M. E. L. & Aguiar, D. P. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res. Ther.* **5**, 112 (2014).
237. Kaltsas, D. S. Comparative study of the properties of the shoulder joint capsule with those of other joint capsules. *Clin. Orthop.* 20–26 (1983).
238. Kleftogiannis, F., Handley, C. J. & Campbell, M. A. Characterization of extracellular matrix macromolecules from bovine synovial capsule. *J. Orthop. Res.* **12**, 365–374 (1994).
239. Debski, R. E., Moore, S. M., Mercer, J. L., Sacks, M. S. & McMahon, P. J. The collagen fibers of the anteroinferior capsulolabrum have multiaxial orientation to resist shoulder dislocation. *J. Shoulder Elbow Surg.* **12**, 247–252 (2003).
240. Parry, D. A., Barnes, G. R. & Craig, A. S. A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relation between fibril size distribution and mechanical properties. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **203**, 305–321 (1978).
241. Gohlke, F., Essigkrug, B. & Schmitz, F. The pattern of the collagen fiber bundles of the capsule of the glenohumeral joint. *J. Shoulder Elbow Surg.* **3**, 111–128 (1994).



242. Naumann, A. *et al.* Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **50**, 1049–1058 (2002).
243. Eyre, D. R. & Wu, J. j. Collagen of fibrocartilage: a distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *FEBS Lett.* **158**, 265–270 (1983).
244. Elliott, D. M., Mauck, R. L., Shah, R. P., Schaer, T. P. & Maher, S. A. 5.524 - Biomaterials for Replacement and Repair of the Meniscus and Annulus Fibrosus. in *Comprehensive Biomaterials* (ed. Ducheyne, P.) 317–332 (Elsevier, 2011). doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00173-2.
245. Wachsmuth, L., Söder, S., Fan, Z., Finger, F. & Aigner, T. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. *Histol. Histopathol.* (2006).
246. de Chalain, T., Phillips, J. H. & Hinek, A. Bioengineering of elastic cartilage with aggregated porcine and human auricular chondrocytes and hydrogels containing alginate, collagen, and  $\kappa$ -elastin. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**, 280–288 (1999).
247. Krishnan, Y. & Grodzinsky, A. J. Cartilage diseases. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **71–72**, 51–69 (2018).
248. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* **1**, 461–468 (2009).
249. Matzat, S. J., van Tiel, J., Gold, G. E. & Oei, E. H. G. Quantitative MRI techniques of cartilage composition. *Quant. Imaging Med. Surg.* **3**, 162–174 (2013).
250. Maroudas, A., Bayliss, M. T. & Venn, M. F. Further studies on the composition of human femoral head cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **39**, 514–523 (1980).
251. Chevalier, X. & Richette, P. Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC - Rhumatol.-Orthopédie* **2**, 41–58 (2005).
252. Goldring, M. B. & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 224 (2009).
253. Mobasheri, A. *et al.* Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol. Histopathol.* **17**, 1239–1267 (2002).
254. Murphy, C. L. & Sambanis, A. Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tissue Eng.* **7**, 791–803 (2001).
255. Zhou, S., Cui, Z. & Urban, J. P. G. Factors influencing the oxygen concentration gradient from the synovial surface of articular cartilage to the cartilage-bone interface: a modeling study. *Arthritis Rheum.* **50**, 3915–3924 (2004).
256. Lane, J. M., Brighton, C. T. & Menkowitz, B. J. Anaerobic and aerobic metabolism in articular cartilage. *J. Rheumatol.* **4**, 334–342 (1977).
257. Aicher, W. K. & Rolauffs, B. The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 645–653 (2014).
258. Han, L., Grodzinsky, A. J. & Ortiz, C. Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 133–168 (2011).
259. Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health Multidiscip. Approach* **1**, 461–468 (2009).
260. Foldager, C. B. *et al.* Collagen Type IV and Laminin Expressions during Cartilage Repair and in Late Clinically Failed Repair Tissues from Human Subjects. *Cartilage* **7**, 52–61 (2016).
261. Eyre, D. Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **4**, 30 (2001).
262. Roughley, P. J. & Mort, J. S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J. Exp. Orthop.* **1**, 8 (2014).
263. Camarero-Espinosa, S., Rothen-Rutishauser, B., Foster, E. J. & Weder, C. Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomater. Sci.* **4**, 734–767 (2016).
264. Poole, A. R. *et al.* Composition and Structure of Articular Cartilage: A Template for Tissue Repair. *Clin. Orthop.* **391**, S26–S33 (2001).
265. Fujioka, R., Aoyama, T. & Takakuwa, T. The layered structure of the articular surface. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 1092–1098 (2013).

266. Minns, R. J. & Steven, F. S. The collagen fibril organization in human articular cartilage. *J. Anat.* **123**, 437–457 (1977).
267. Jay, G. & Waller, K. The Biology of Lubricin: Near Frictionless Joint Motion. *Matrix Biol.* **39**, (2014).
268. Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A. & Guilak, F. Zonal variations in the three-dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 889–897 (2006).
269. Aspden, R. M., Hukins, D. W. L. & Muir, I. H. M. Collagen organization in articular cartilage, determined by X-ray diffraction, and its relationship to tissue function. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **212**, 299–304 (1981).
270. Moger, C. J. *et al.* Regional variations of collagen orientation in normal and diseased articular cartilage and subchondral bone determined using small angle X-ray scattering (SAXS). *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 682–687 (2007).
271. Greene, G. W. *et al.* Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5255–5259 (2011).
272. Blalock, D., Miller, A., Tilley, M. & Wang, J. Joint instability and osteoarthritis. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* **8**, 15–23 (2015).
273. Zhang, Z. Chondrons and the Pericellular Matrix of Chondrocytes. *Tissue Eng. Part B Rev.* **21**, 267–277 (2015).
274. Müller, C. *et al.* Quantitative proteomics at different depths in human articular cartilage reveals unique patterns of protein distribution. *Matrix Biol.* **40**, 34–45 (2014).
275. Zuscik, M. J., Hilton, M. J., Zhang, X., Chen, D. & O’Keefe, R. J. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J. Clin. Invest.* **118**, 429–438 (2008).
276. Mow, V. C., Ratcliffe, A. & Robin Poole, A. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials* **13**, 67–97 (1992).
277. Chandrasekhar, S., Harvey, A. K., Johnson, M. G. & Becker, G. W. Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1221**, 7–14 (1994).
278. Imabuchi, R. *et al.* Gene expression profile of the cartilage tissue spontaneously regenerated in vivo by using a novel double-network gel: Comparisons with the normal articular cartilage. *BMC Musculoskelet. Disord.* **12**, 213 (2011).
279. Hale, J. E., Fraser, J. D. & Price, P. A. The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J. Biol. Chem.* **263**, 5820–5824 (1988).
280. Laenoi, W. *et al.* Molecular characterization and methylation study of matrix gla protein in articular cartilage from pig with osteochondrosis. *Gene* **459**, 24–31 (2010).
281. Pullig, O., Weseloh, G., Gauer, S. & Swoboda, B. Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **19**, 245–255 (2000).
282. Clark, J. M. Variation of collagen fiber alignment in a joint surface: a scanning electron microscope study of the tibial plateau in dog, rabbit, and man. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **9**, 246–257 (1991).
283. Changoor, A. *et al.* Structural characteristics of the collagen network in human normal, degraded and repair articular cartilages observed in polarized light and scanning electron microscopies. *Osteoarthritis Cartilage* **19**, 1458–1468 (2011).
284. Venn, M. & Maroudas, A. Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition. *Ann. Rheum. Dis.* **36**, 121–129 (1977).
285. Rolauffs, B. *et al.* Stress-vs-time signals allow the prediction of structurally catastrophic events during fracturing of immature cartilage and predetermine the biomechanical, biochemical, and structural impairment. *J. Struct. Biol.* **183**, 501–511 (2013).
286. Krishnan, R., Park, S., Eckstein, F. & Ateshian, G. A. Inhomogeneous cartilage properties enhance superficial interstitial fluid support and frictional properties, but do not provide a homogeneous state of stress. *J. Biomech. Eng.* **125**, 569–577 (2003).
287. Klein, T. J., Chaudhry, M., Bae, W. C. & Sah, R. L. Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage. *J. Biomech.* **40**, 182–190 (2007).

288. Rolauffs, B. *et al.* Vulnerability of the superficial zone of immature articular cartilage to compressive injury. *Arthritis Rheum.* **62**, 3016–3027 (2010).
289. Vanden Berg-Foels, W. s., Scipioni, L., Huynh, C. & Wen, X. Helium ion microscopy for high-resolution visualization of the articular cartilage collagen network. *J. Microsc.* **246**, 168–176 (2012).
290. Altman, G. H. *et al.* Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. *J. Biomech. Eng.* **124**, 742–749 (2002).
291. Buschmann, M. D., Gluzband, Y. A., Grodzinsky, A. J. & Hunziker, E. B. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J. Cell Sci.* **108 ( Pt 4)**, 1497–1508 (1995).
292. Grodzinsky, A. J. Electromechanical and physicochemical properties of connective tissue. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **9**, 133–199 (1983).
293. Davisson, T., Kunig, S., Chen, A., Sah, R. & Ratcliffe, A. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **20**, 842–848 (2002).
294. Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 432–463 (2002).
295. Mauck, R. L. *et al.* Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels. *J. Biomech. Eng.* **122**, 252–260 (2000).
296. Pei, M., Seidel, J., Vunjak-Novakovic, G. & Freed, L. E. Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 149–154 (2002).
297. Vunjak-Novakovic, G. *et al.* Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **17**, 130–138 (1999).
298. Wilusz, R. E., Sanchez-Adams, J. & Guilak, F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* **39**, 25–32 (2014).
299. Poole, C. A. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J. Anat.* **191 ( Pt 1)**, 1–13 (1997).
300. Poole, C. A., Flint, M. H. & Beaumont, B. W. Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **5**, 509–522 (1987).
301. Alexopoulos, L. G., Haider, M. A., Vail, T. P. & Guilak, F. Alterations in the mechanical properties of the human chondrocyte pericellular matrix with osteoarthritis. *J. Biomech. Eng.* **125**, 323–333 (2003).
302. Poole, C. A., Ayad, S. & Schofield, J. R. Chondrons from articular cartilage: I. Immunolocalization of type VI collagen in the pericellular capsule of isolated canine tibial chondrons. *J. Cell Sci.* **90 ( Pt 4)**, 635–643 (1988).
303. Poole, C. A., Gilbert, R. T., Herbage, D. & Hartmann, D. J. Immunolocalization of type IX collagen in normal and spontaneously osteoarthritic canine tibial cartilage and isolated chondrons. *Osteoarthritis Cartilage* **5**, 191–204 (1997).
304. Hu, K. *et al.* Pathogenesis of osteoarthritis-like changes in the joints of mice deficient in type IX collagen. *Arthritis Rheum.* **54**, 2891–2900 (2006).
305. SundarRaj, N., Fite, D., Ledbetter, S., Chakravarti, S. & Hassell, J. R. Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J. Cell Sci.* **108 ( Pt 7)**, 2663–2672 (1995).
306. Melrose, J. *et al.* The Structure, Location, and Function of Perlecan, a Prominent Pericellular Proteoglycan of Fetal, Postnatal, and Mature Hyaline Cartilages \*. *J. Biol. Chem.* **281**, 36905–36914 (2006).
307. Guilak, F., Hayes, A. J. & Melrose, J. Perlecan in Pericellular Mechanosensory Cell-Matrix Communication, Extracellular Matrix Stabilisation and Mechanoregulation of Load-Bearing Connective Tissues. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2716 (2021).
308. Poole, C. A., Glant, T. T. & Schofield, J. R. Chondrons from articular cartilage. (IV). Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated canine tibial chondrons. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **39**, 1175–1187 (1991).
309. Knudson, C. B. Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J. Cell Biol.* **120**, 825–834 (1993).
310. Poole, A. R., Pidoux, I., Reiner, A. & Rosenberg, L. An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *J. Cell Biol.* **93**, 921–937 (1982).

311. Kavanagh, E. & Ashhurst, D. E. Development and Aging of the Articular Cartilage of the Rabbit Knee Joint: Distribution of Biglycan, Decorin, and Matrilin-1. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1603–1615 (1999).
312. Chery, D. R. *et al.* Decorin regulates cartilage pericellular matrix micromechanobiology. *Matrix Biol.* **96**, 1–17 (2021).
313. Glant, T. T., Hadházy, C., Mikecz, K. & Sipos, A. Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II. *Histochemistry* **82**, 149–158 (1985).
314. Kvist, A. J. *et al.* The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix — A cartilage basement membrane equivalent? *Matrix Biol.* **27**, 22–33 (2008).
315. Pericellular Matrix - an overview | ScienceDirect Topics.  
<https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/pericellular-matrix>.
316. Guilak, F. *et al.* The Pericellular Matrix as a Transducer of Biomechanical and Biochemical Signals in Articular Cartilage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1068**, 498–512 (2006).
317. Chu, W. C. *et al.* Distribution of pericellular matrix molecules in the temporomandibular joint and their chondroprotective effects against inflammation. *Int. J. Oral Sci.* **9**, 43–52 (2017).
318. Darling, E. M., Wilusz, R. E., Bolognesi, M. P., Zauscher, S. & Guilak, F. Spatial Mapping of the Biomechanical Properties of the Pericellular Matrix of Articular Cartilage Measured In Situ via Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **98**, 2848–2856 (2010).
319. Alexopoulos, L. G., Youn, I., Bonaldo, P. & Guilak, F. Developmental and osteoarthritic changes in Col6a1-knockout mice: biomechanics of type VI collagen in the cartilage pericellular matrix. *Arthritis Rheum.* **60**, 771–779 (2009).
320. Peters, H. C. *et al.* The protective role of the pericellular matrix in chondrocyte apoptosis. *Tissue Eng. Part A* **17**, 2017–2024 (2011).
321. Allen, D. M. & Mao, J. J. Heterogeneous nanostructural and nanoelastic properties of pericellular and interterritorial matrices of chondrocytes by atomic force microscopy. *J. Struct. Biol.* **145**, 196–204 (2004).
322. Michalek, A. J. & Iatridis, J. C. A numerical study to determine pericellular matrix modulus and evaluate its effects on the micromechanical environment of chondrocytes. *J. Biomech.* **40**, 1405–1409 (2007).
323. Guilak, F., Jones, W. R., Ting-Beall, H. P. & Lee, G. M. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 59–70 (1999).
324. Wilusz, R. E. & Guilak, F. High resistance of the mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix to proteoglycan digestion by chondroitinase, aggrecanase, or hyaluronidase. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **38**, 183–197 (2014).
325. Yingst, S. *et al.* Characterization of collagenous matrix assembly in a chondrocyte model system. *J. Biomed. Mater. Res. A* **90**, 247–255 (2009).
326. Holmes, D. F. & Kadler, K. E. The 10+4 microfibril structure of thin cartilage fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17249–17254 (2006).
327. Parry, D. A. D. & Craig, A. S. Ultrastructure of the connective tissue matrix. *Martinous Nijhoff Hague* (1984).
328. Müller-Gerbl, M., Schulte, E. & Putz, R. The thickness of the calcified layer of articular cartilage: a function of the load supported? *J. Anat.* **154**, 103–111 (1987).
329. Redler, I., Mow, V. C., Zimny, M. L. & Mansell, J. The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin. Orthop.* 357–362 (1975).
330. Fawns, H. T. & Landells, J. W. Histochemical Studies of Rheumatic Conditions: I. Observations on the Fine Structures of the Matrix of Normal Bone and Cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* **12**, 105–113 (1953).
331. Zhang, Y. *et al.* Analysis of the Mineral Composition of the Human Calcified Cartilage Zone. *Int. J. Med. Sci.* **9**, 353–360 (2012).
332. Girkontaite, I. *et al.* Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol.* **15**, 231–238 (1996).
333. Cameron, K. L., Mauntel, T. C. & Owens, B. D. The Epidemiology of Glenohumeral Joint Instability: Incidence, Burden, and Long-term Consequences. *Sports Med. Arthrosc. Rev.* **25**, 144–149 (2017).
334. Abrams, R. & Akbarnia, H. Shoulder Dislocations Overview. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
335. Labriola, J. E., Lee, T. Q., Debski, R. E. & McMahon, P. J. Stability and instability of the glenohumeral joint: the role of shoulder muscles. *J. Shoulder Elbow Surg.* **14**, 32S–38S (2005).

336. Kim, S. *et al.* A Genetic Marker Associated with Shoulder Dislocation. *Int. J. Sports Med.* **38**, 508–514 (2017).
337. Pyeritz, R. E. The Marfan Syndrome. *Annu. Rev. Med.* **51**, 481–510 (2000).
338. Dietz, H. C. Marfan Syndrome: From Molecules to Medicines. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 662–667 (2007).
339. Godfrey, M. *et al.* Cosegregation of elastin-associated microfibrillar abnormalities with the Marfan phenotype in families. *Am. J. Hum. Genet.* **46**, 652–660 (1990).
340. Benke, K. *et al.* The role of transforming growth factor-beta in Marfan syndrome. *Cardiol. J.* **20**, 227–234 (2013).
341. Mizuguchi, T. *et al.* Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 855–860 (2004).
342. Buckwalter, J. A. & -Y. Woo, S. L. Age-Related Changes in Ligaments and Joint Capsules: Implications for Participation in Sports. *Sports Med. Arthrosc. Rev.* **4**, 250–262 (1996).
343. Rodeo, S. A., Suzuki, K., Yamauchi, M., Bhargava, M. & Warren, R. F. Analysis of Collagen and Elastic Fibers in Shoulder Capsule in Patients with Shoulder Instability. *Am. J. Sports Med.* **26**, 634–643 (1998).
344. Eekhoff, J. D., Fang, F. & Lake, S. P. Multiscale mechanical effects of native collagen cross-linking in tendon. *Connect. Tissue Res.* **59**, 410–422 (2018).
345. Corsi, A. *et al.* Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **17**, 1180–1189 (2002).
346. Jepsen, K. J. *et al.* A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **277**, 35532–35540 (2002).
347. Raghunath, M., Superti-Furga, A., Godfrey, M. & Steinmann, B. Decreased extracellular deposition of fibrillin and decorin in neonatal Marfan syndrome fibroblasts. *Hum. Genet.* **90**, 511–515 (1993).
348. Rodeo, S. A., Suzuki, K., Yamauchi, M., Bhargava, M. & Warren, R. F. Analysis of Collagen and Elastic Fibers in Shoulder Capsule in Patients with Shoulder Instability. *Am. J. Sports Med.* **26**, 634–643 (1998).
349. Miniaci, A. & Codsì, M. J. Thermal Capsulorrhaphy for the Treatment of Shoulder Instability. *Am. J. Sports Med.* **34**, 1356–1363 (2006).
350. Hayashi, K. & Markel, M. D. Thermal Capsulorrhaphy Treatment of Shoulder Instability: Basic Science. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **390**, 59–72 (2001).
351. Levy, O. *et al.* Thermal capsular shrinkage for shoulder instability: MID-TERM LONGITUDINAL OUTCOME STUDY. *J. Bone Joint Surg. Br.* **83-B**, 640–645 (2001).
352. Steinberg, J. *et al.* A molecular quantitative trait locus map for osteoarthritis. *Nat. Commun.* **12**, 1309 (2021).
353. Zhang, Y. & Jordan, J. M. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin. Geriatr. Med.* **26**, 355–369 (2010).
354. Long, H. *et al.* Prevalence trends of site-specific osteoarthritis from 1990 to 2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis Rheumatol.* **n/a**.
355. Sellam, J. & Berenbaum, F. [Arthrosis]. *Rev. Prat.* **61**, 675–685; quiz 686 (2011).
356. Ryder, J. J. *et al.* Genetic associations in peripheral joint osteoarthritis and spinal degenerative disease: a systematic review. *Ann. Rheum. Dis.* **67**, 584–591 (2008).
357. Aury-Landas, J., Marcelli, C., Leclercq, S., Boumédiène, K. & Baugé, C. Genetic Determinism of Primary Early-Onset Osteoarthritis. *Trends Mol. Med.* **22**, 38–52 (2016).
358. Sharma, L. *et al.* The Role of Knee Alignment in Disease Progression and Functional Decline in Knee Osteoarthritis. *JAMA* **286**, 188–195 (2001).
359. Teichtahl, A. J., Cicuttini, F. M., Janakiraman, N., Davis, S. R. & Wluka, A. E. Static knee alignment and its association with radiographic knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 958–962 (2006).
360. Brouwer, G. M. *et al.* Association between valgus and varus alignment and the development and progression of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* **56**, 1204–1211 (2007).
361. Jones, G. *et al.* Knee Articular Cartilage Development in Children: A Longitudinal Study of the Effect of Sex, Growth, Body Composition, and Physical Activity. *Pediatr. Res.* **54**, 230–236 (2003).
362. Showery, J. E. *et al.* The Rising Incidence of Degenerative and Posttraumatic Osteoarthritis of the Knee in the United States Military. *J. Arthroplasty* **31**, 2108–2114 (2016).

363. Richmond, S. A. *et al.* Are Joint Injury, Sport Activity, Physical Activity, Obesity, or Occupational Activities Predictors for Osteoarthritis? A Systematic Review. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* **43**, 515-B19 (2013).
364. Saase, J. L. van, Romunde, L. K. van, Cats, A., Vandenbroucke, J. P. & Valkenburg, H. A. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann. Rheum. Dis.* **48**, 271–280 (1989).
365. Spector, T. D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J. & Hart, D. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* **312**, 940–943 (1996).
366. Srikanth, V. K. *et al.* A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 769–781 (2005).
367. Arthrose · Inserm, La science pour la santé. *Inserm* <https://www.inserm.fr/dossier/arthrose/>.
368. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as an Organ. *Arthritis Rheum.* **64**, 1697–1707 (2012).
369. Mahjoub, M., Berenbaum, F. & Houard, X. Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos. Int.* **23**, 841–846 (2012).
370. Pearle, A. D., Warren, R. F. & Rodeo, S. A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin. Sports Med.* **24**, 1–12 (2005).
371. Caterson, B. *et al.* Modulation of native chondroitin sulphate structure in tissue development and in disease. *J. Cell Sci.* **97** ( Pt 3), 411–417 (1990).
372. Sandell, L. J. & Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* **3**, 107–113 (2001).
373. Ji, Q. *et al.* Single-cell RNA-seq analysis reveals the progression of human osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 100–110 (2019).
374. Williams, R. *et al.* Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage. *PloS One* **5**, e13246 (2010).
375. Armiento, A. R., Alini, M. & Stoddart, M. J. Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **146**, 289–305 (2019).
376. Toole, B. P. Morphogenetic Role of Glycosaminoglycans (Acid Mucopolysaccharides) in Brain and Other Tissues. in *Neuronal Recognition* (ed. Barondes, S. H.) 275–329 (Springer US, 1976). doi:10.1007/978-1-4684-2205-4\_10.
377. Gottardi, R. *et al.* Supramolecular Organization of Collagen Fibrils in Healthy and Osteoarthritic Human Knee and Hip Joint Cartilage. *PLoS ONE* **11**, e0163552 (2016).
378. Sellam, J. & Berenbaum, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 625–635 (2010).
379. Millerand, M., Berenbaum, F. & Jacques, C. Danger signals and inflammaging in osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **37 Suppl 120**, 48–56 (2019).
380. Benya, P. D., Padilla, S. R. & Nimni, M. E. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* **15**, 1313–1321 (1978).
381. Benya, P. D., Padilla, S. R. & Nimni, M. E. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III and type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogen bromide peptide analysis. *Biochemistry* **16**, 865–872 (1977).
382. von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H. & Müller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature* **267**, 531–532 (1977).
383. Kirsch, T., Swoboda, B. & Nah, H.-D. Activation of annexin II and V expression, terminal differentiation, mineralization and apoptosis in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **8**, 294–302 (2000).
384. Von Der Mark, K. *et al.* Type x collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum.* **35**, 806–811 (1992).
385. Pullig, O., Weseloh, G., Ronneberger, D.-L., Käkönen, S.-M. & Swoboda, B. Chondrocyte Differentiation in Human Osteoarthritis: Expression of Osteocalcin in Normal and Osteoarthritic Cartilage and Bone. *Calcif. Tissue Int.* **67**, 230–240 (2000).
386. Billinghamurst, R. C. *et al.* Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J. Clin. Invest.* **99**, 1534–1545 (1997).

387. Orfanidou, T., Iliopoulos, D., Malizos, K. N. & Tsezou, A. Involvement of SOX-9 and FGF-23 in RUNX-2 regulation in osteoarthritic chondrocytes. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3186–3194 (2010).
388. Fuerst, M. *et al.* Articular cartilage mineralization in osteoarthritis of the hip. *BMC Musculoskelet. Disord.* **10**, 166 (2009).
389. Fuerst, M. *et al.* Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 2694–2703 (2009).
390. Burr, D. B. & Schaffler, M. B. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: quantitative microscopic evidence. *Microsc. Res. Tech.* **37**, 343–357 (1997).
391. Lane, L. B. & Bullough, P. G. Age-related changes in the thickness of the calcified zone and the number of tidemarks in adult human articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Br.* **62**, 372–375 (1980).
392. Lane, L. B., Villacin, A. & Bullough, P. G. The vascularity and remodelling of subchondrial bone and calcified cartilage in adult human femoral and humeral heads. An age- and stress-related phenomenon. *J. Bone Joint Surg. Br.* **59**, 272–278 (1977).
393. Walsh, D. A. *et al.* Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 743–751 (2007).
394. Shibakawa, A. *et al.* The role of subchondral bone resorption pits in osteoarthritis: MMP production by cells derived from bone marrow. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 679–687 (2005).
395. Li, B. & Aspden, R. M. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **12**, 641–651 (1997).
396. Radin, E. L. & Rose, R. M. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin. Orthop.* 34–40 (1986).
397. Tschaikowsky, M. *et al.* Proof-of-concept for the detection of early osteoarthritis pathology by clinically applicable endomicroscopy and quantitative AI-supported optical biopsy. *Osteoarthritis Cartilage* **29**, 269–279 (2021).
398. Tschaikowsky, M. *et al.* Hybrid fluorescence-AFM explores articular surface degeneration in early osteoarthritis across length scales. *Acta Biomater.* **126**, 315–325 (2021).
399. Wen, C.-Y. *et al.* Collagen fibril stiffening in osteoarthritic cartilage of human beings revealed by atomic force microscopy. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 916–922 (2012).
400. Tang, B. *et al.* Nanostiffness of Collagen Fibrils Extracted from Osteoarthritic Cartilage Characterized with AFM Nanoindentation. *Soft Mater.* **12**, 253–261 (2014).
401. Wilusz, R. E., Zauscher, S. & Guilak, F. Micromechanical mapping of early osteoarthritic changes in the pericellular matrix of human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 1895–1903 (2013).
402. Poole, C. A., Matsuoka, A. & Schofield, J. R. Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **34**, 22–35 (1991).
403. Lee, G. M., Paul, T. A., Slabaugh, M. & Kelley, S. S. The incidence of enlarged chondrons in normal and osteoarthritic human cartilage and their relative matrix density. *Osteoarthritis Cartilage* **8**, 44–52 (2000).
404. Hambach, L., Neureiter, D., Zeiler, G., Kirchner, T. & Aigner, T. Severe disturbance of the distribution and expression of type VI collagen chains in osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **41**, 986–996 (1998).
405. Söder, S., Hambach, L., Lissner, R., Kirchner, T. & Aigner, T. Ultrastructural localization of type VI collagen in normal adult and osteoarthritic human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 464–470 (2002).
406. Vonk, L. A. *et al.* Preservation of the chondrocyte's pericellular matrix improves cell-induced cartilage formation. *J. Cell. Biochem.* **110**, 260–271 (2010).
407. Xu, L. *et al.* Intact pericellular matrix of articular cartilage is required for unactivated discoidin domain receptor 2 in the mouse model. *Am. J. Pathol.* **179**, 1338–1346 (2011).
408. Aigner, T. & Kim, H. A. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. *Arthritis Rheum.* **46**, 1986–1996 (2002).
409. Aigner, T., Kim, H. A. & Roach, H. I. Apoptosis in osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **30**, 639–653, xi (2004).

410. Bauer, D. C. *et al.* Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage* **14**, 723–727 (2006).
411. Lane, N. E. *et al.* OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **19**, 478–482 (2011).
412. Stoilov, I., Starcher, B. C., Mecham, R. P. & Broekelmann, T. J. Measurement of elastin, collagen, and total protein levels in tissues. *Methods Cell Biol.* **143**, 133–146 (2018).
413. Choi, H. U. *et al.* Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J. Biol. Chem.* **264**, 2876–2884 (1989).
414. Åhrman, E. *et al.* Novel Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) Neoepitopes Identified in Synovial Fluids from Patients with Joint Diseases Using Affinity Chromatography and Mass Spectrometry \*. *J. Biol. Chem.* **289**, 20908–20916 (2014).
415. Lund, P. K., Abadi, D. M. & Mathies, J. C. Lipid composition of normal human bone marrow as determined by column chromatography \*. *J. Lipid Res.* **3**, 95–98 (1962).
416. Vogel, K. G., Sandy, J. D., Pogány, G. & Robbins, J. R. Aggrecan in bovine tendon. *Matrix Biol.* **14**, 171–179 (1994).
417. Chen, X., Cushman, S. W., Pannell, L. K. & Hess, S. Quantitative Proteomic Analysis of the Secretory Proteins from Rat Adipose Cells Using a 2D Liquid Chromatography–MS/MS Approach. *J. Proteome Res.* **4**, 570–577 (2005).
418. Laforest, S. *et al.* Simultaneous quantification of estrogens and glucocorticoids in human adipose tissue by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **195**, 105476 (2019).
419. Saari, H. & Konttinen, Y. T. Determination of synovial fluid hyaluronate concentration and polymerisation by high performance liquid chromatography. *Ann. Rheum. Dis.* **48**, 565–570 (1989).
420. Dahl, L. B., Dahl, I. M., Engström-Laurent, A. & Granath, K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann. Rheum. Dis.* **44**, 817–822 (1985).
421. Lavigne, D. *et al.* Culture of human cells and synthesis of extracellular matrix on materials compatible with direct analysis by mass spectrometry. *Analyst* **135**, 503–511 (2010).
422. Zhang, G., Sun, A., Li, W., Liu, T. & Su, Z. Mass spectrometric analysis of enzymatic digestion of denatured collagen for identification of collagen type. *J. Chromatogr. A* **1114**, 274–277 (2006).
423. van Huizen, N. A., Ijzermans, J. N. M., Burgers, P. C. & Luider, T. M. Collagen analysis with mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **39**, 309–335 (2020).
424. Joshi, A., Zahoor, A. & Buson, A. Measurement of Collagen Cross-Links from Tissue Samples by Mass Spectrometry. in *Collagen: Methods and Protocols* (eds. Sagi, I. & Afratis, N. A.) 79–93 (Springer, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-9095-5\_6.
425. Eyre, D. R., Koob, T. J. & Van Ness, K. P. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **137**, 380–388 (1984).
426. Saito, M., Marumo, K., Fujii, K. & Ishioka, N. Single-column high-performance liquid chromatographic-fluorescence detection of immature, mature, and senescent cross-links of collagen. *Anal. Biochem.* **253**, 26–32 (1997).
427. Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L. & Zarins, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg. Am.* **53**, 523–537 (1971).
428. Constantine, V. S. & Mowry, R. W. Selective staining of human dermal collagen. II. The use of picosirius red F3BA with polarization microscopy. *J. Invest. Dermatol.* **50**, 419–423 (1968).
429. Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentani, R. R. Picosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447–455 (1979).
430. Dayan, D., Hiss, Y., Hirshberg, A., Bubis, J. J. & Wolman, M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* **93**, 27–29 (1989).
431. McLeod, M. A., Wilusz, R. E. & Guilak, F. Depth-dependent anisotropy of the micromechanical properties of the extracellular and pericellular matrices of articular cartilage evaluated via atomic force microscopy. *J. Biomech.* **46**, 586–592 (2013).



432. Grimm, P. C. *et al.* Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **14**, 1662–1668 (2003).
433. Brigger, D. & Muckle, R. J. Comparison of Sirius red and Congo red as stains for amyloid in animal tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **23**, 84–88 (1975).
434. Gregory, K. E., Keene, D. R., Tufa, S. F., Lunstrum, G. P. & Morris, N. P. Developmental Distribution of Collagen Type XII in Cartilage: Association with Articular Cartilage and the Growth Plate. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 2005–2016 (2001).
435. Claassen, H., Kirsch, T. & Simons, G. Cartilage canals in human thyroid cartilage characterized by immunolocalization of collagen types I, II, pro-III, IV and X. *Anat. Embryol. (Berl.)* **194**, 147–153 (1996).
436. Ekman, S., Reinholdt, F. P., Hultenby, K. & Heinegård, D. Ultrastructural Immunolocalization of Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in Porcine Growth Cartilage. *Calcif. Tissue Int.* **60**, 547–553 (1997).
437. Evans, H. B. *et al.* Localisation of collagen types and fibronectin in cartilage by immunofluorescence. *Ann. Rheum. Dis.* **42**, 575–581 (1983).
438. Shibata, S., Fukada, K., Suzuki, S. & Yamashita, Y. Immunohistochemistry of collagen types II and X, and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J. Anat.* **191**, 561–570 (1997).
439. Agarwal, P. *et al.* Collagen XII and XIV, New Partners of Cartilage Oligomeric Matrix Protein in the Skin Extracellular Matrix Suprastructure. *J. Biol. Chem.* **287**, 22549–22559 (2012).
440. Franchi, M., Trirè, A., Quaranta, M., Orsini, E. & Ottani, V. Collagen Structure of Tendon Relates to Function. *ScientificWorldJournal* **7**, 404–420 (2007).
441. Raspanti, M., Congiu, T. & Guizzardi, S. Structural aspects of the extracellular matrix of the tendon: an atomic force and scanning electron microscopy study. *Arch. Histol. Cytol.* **65**, 37–43 (2002).
442. Faltin, R. M., Faltin, K., Sander, F. G. & Arana-Chavez, V. E. Ultrastructure of cementum and periodontal ligament after continuous intrusion in humans: a transmission electron microscopy study. *Eur. J. Orthod.* **23**, 35–49 (2001).
443. Keene, D., Sakai, L., Bächinger, H. P. & Burgeson, R. Type III collagen can be present on banded collagen fibrils regardless of fibril diameter. *J. Cell Biol.* **105**, 2393–402 (1987).
444. Jiang, Y. *et al.* Exploring nanoscale structure change of dermal tissues suffering injury by small angle X-ray scattering and transmission electron microscopy. *Mol. Biol. Rep.* **46**, (2019).
445. Yi, E. *et al.* Mechanical Forces Accelerate Collagen Digestion by Bacterial Collagenase in Lung Tissue Strips. *Front. Physiol.* **7**, (2016).
446. Starborg, T. *et al.* Using transmission electron microscopy and 3View to determine collagen fibril size and three-dimensional organization. *Nat. Protoc.* **8**, 1433–1448 (2013).
447. Sato, K. Mechanism of Hydroxyapatite Mineralization in Biological Systems (Review). *J. Ceram. Soc. Jpn. - J Ceram. SOC JPN* **115**, 124–130 (2007).
448. Xin, R., Leng, Y. & Wang, N. In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation. *J. Cryst. Growth* **289**, 339–344 (2006).
449. Du, Q. *et al.* TEM analysis and in vitro and in vivo biological performance of the hydroxyapatite crystals rapidly formed on the modified microarc oxidation coating using microwave hydrothermal technique. *Chem. Eng. J.* **373**, 1091–1110 (2019).
450. Szarek, P., Lilledahl, M. B., Emery, N. C., Lewis, C. G. & Pierce, D. M. The zonal evolution of collagen-network morphology quantified in early osteoarthritic grades of human cartilage. *Osteoarthr. Cartil. Open* **2**, 100086 (2020).
451. Xia, Y. & Elder, K. Quantification of the graphical details of collagen fibrils in transmission electron micrographs. *J. Microsc.* **204**, 3–16 (2001).
452. Morais, R., Viegas, C. S. B., Simes, D. C., Matos, A. P. A. & Macedo, A. L. Application of TEM techniques for the study of vascular calcification: Monitoring extracellular vesicles and nanogold immunodetection of fetuin-A, GRP, and CD9. *Ultrastruct. Pathol.* **41**, 130–132 (2017).
453. Snellman, A. *et al.* A short sequence in the N-terminal region is required for the trimerization of type XIII collagen and is conserved in other collagenous transmembrane proteins. *EMBO J.* **19**, 5051–5059 (2000).
454. Manferdini, C. *et al.* Immunoelectron microscopic localization of Collagen type XV during human mesenchymal stem cells mineralization. *Connect. Tissue Res.* **59**, 42–45 (2018).

455. Plumb, D. A. *et al.* Collagen XXVII Is Developmentally Regulated and Forms Thin Fibrillar Structures Distinct from Those of Classical Vertebrate Fibrillar Collagens \*. *J. Biol. Chem.* **282**, 12791–12795 (2007).
456. Henmi, A. *et al.* Bone matrix calcification during embryonic and postembryonic rat calvarial development assessed by SEM–EDX spectroscopy, XRD, and FTIR spectroscopy. *J. Bone Miner. Metab.* **34**, 41–50 (2016).
457. Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R. & Bonanno, E. Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis: A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *Eur. J. Histochem. EJH* **62**, 2841 (2018).
458. Sasano, Y. *et al.* Degradation of extracellular matrices propagates calcification during development and healing in bones and teeth. *J. Oral Biosci.* **61**, 149–156 (2019).
459. Maruyama, K., Henmi, A., Okata, H. & Sasano, Y. Analysis of calcium, phosphorus, and carbon concentrations during developmental calcification of dentin and enamel in rat incisors using scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX). *J. Oral Biosci.* **58**, 173–179 (2016).
460. Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S. & Campagnola, P. J. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nat. Protoc.* **7**, 654–669 (2012).
461. Kumar, R. & Kumar, A. Assessment of Articular Cartilage by Second Harmonic Microscopy: Challenges and Opportunities. *Front. Phys.* **7**, (2019).
462. Brockbank, K. G. M. *et al.* Quantitative second harmonic generation imaging of cartilage damage. *Cell Tissue Bank.* **9**, 299–307 (2008).
463. Houle, M.-A. *et al.* Analysis of forward and backward Second Harmonic Generation images to probe the nanoscale structure of collagen within bone and cartilage. *J. Biophotonics* **8**, 993–1001 (2015).
464. Oinas, J. *et al.* Composition, structure and tensile biomechanical properties of equine articular cartilage during growth and maturation. *Sci. Rep.* **8**, 11357 (2018).
465. Chaudhary, R. *et al.* Articular cartilage zonal differentiation via 3D Second-Harmonic Generation imaging microscopy. *Connect. Tissue Res.* **56**, 76–86 (2015).
466. Mansfield, J. C., Winlove, C. P., Knapp, K. & Matcher, S. J. Imaging articular cartilage using second harmonic generation microscopy. in *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences VI* vol. 6089 283–290 (SPIE, 2006).
467. Saitou, T., Kiyomatsu, H. & Imamura, T. Quantitative Morphometry for Osteochondral Tissues Using Second Harmonic Generation Microscopy and Image Texture Information. *Sci. Rep.* **8**, 2826 (2018).
468. Keikhosravi, A. *et al.* Quantification of collagen organization in histopathology samples using liquid crystal based polarization microscopy. *Biomed. Opt. Express* **8**, 4243–4256 (2017).
469. Yakovlev, D. D. *et al.* Quantitative mapping of collagen fiber alignment in thick tissue samples using transmission polarized-light microscopy. *J. Biomed. Opt.* **21**, 71111 (2016).
470. Schriebl, A. J., Reinisch, A. J., Sankaran, S., Pierce, D. M. & Holzapfel, G. A. Quantitative assessment of collagen fibre orientations from two-dimensional images of soft biological tissues. *J. R. Soc. Interface* **9**, 3081–3093 (2012).
471. Morrill, E. E. *et al.* A validated software application to measure fiber organization in soft tissue. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **15**, 1467–1478 (2016).
472. Pijanka, J. K. *et al.* Quantification of collagen fiber structure using second harmonic generation imaging and two-dimensional discrete Fourier transform analysis: Application to the human optic nerve head. *J. Biophotonics* **12**, e201800376 (2019).
473. Bergholt, M. S. *et al.* Raman Spectroscopy Reveals New Insights into the Zonal Organization of Native and Tissue-Engineered Articular Cartilage. *ACS Cent. Sci.* **2**, 885–895 (2016).
474. de Campos Vidal, B. & Mello, M. L. S. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* **42**, 283–289 (2011).
475. Belbachir, K., Noreen, R., Gouspillou, G. & Petibois, C. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 829–837 (2009).
476. Albro, M. B. *et al.* Raman spectroscopic imaging for quantification of depth-dependent and local heterogeneities in native and engineered cartilage. *Npj Regen. Med.* **3**, 1–11 (2018).

477. Ye, H. *et al.* Burn-related Collagen Conformational Changes in ex vivo Porcine Skin using Raman Spectroscopy. *Sci. Rep.* **9**, 19138 (2019).
478. Nguyen, T. T. *et al.* Characterization of Type I and IV Collagens by Raman Microspectroscopy: Identification of Spectral Markers of the Dermo-Epidermal Junction. *Spectrosc. Int. J.* **27**, 421–427 (2012).
479. Esmonde-White, K. Raman Spectroscopy of Soft Musculoskeletal Tissues. *Appl. Spectrosc.* **68**, 1203–1218 (2014).
480. Timchenko, P. E., Timchenko, E. V., Dolgushkin, D. A., Volova, L. T. & Markova, M. D. Application of Raman spectroscopy to assess the condition of bone and cartilaginous biopsy specimens. *J. Opt. Technol.* **84**, 423–425 (2017).
481. Lim, N. S. J., Hamed, Z., Yeow, C. H., Chan, C. & Huang, Z. Early detection of biomolecular changes in disrupted porcine cartilage using polarized Raman spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **16**, 017003 (2011).
482. Morris, M. Raman Spectroscopy of Bone and Cartilage. in *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields* (eds. Matousek, P. & Morris, M. D.) 347–364 (Springer, 2010). doi:10.1007/978-3-642-02649-2\_14.
483. Kumar, R. *et al.* Optical investigation of osteoarthritic human cartilage (ICRS grade) by confocal Raman spectroscopy: a pilot study. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 8067–8077 (2015).
484. Camacho, N. P., West, P., Torzilli, P. A. & Mendelsohn, R. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers* **62**, 1–8 (2001).
485. Kim, M., Bi, X., Jr, W. E. H., Spencer, R. G. & Camacho, N. P. Fourier transform infrared imaging spectroscopic analysis of tissue engineered cartilage: histologic and biochemical correlations. *J. Biomed. Opt.* **10**, 031105 (2005).
486. Palukuru, U. P. *et al.* Near infrared spectroscopic imaging assessment of cartilage composition: Validation with mid infrared imaging spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **926**, 79–87 (2016).
487. Khanarian, N. T. *et al.* FTIR-I Compositional Mapping of the Cartilage-to-Bone Interface as a Function of Tissue Region and Age. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **29**, 2643–2652 (2014).
488. Spalazzi, J. P., Boskey, A. L., Pleshko, N. & Lu, H. H. Quantitative Mapping of Matrix Content and Distribution across the Ligament-to-Bone Insertion. *PLOS ONE* **8**, e74349 (2013).
489. Rouxhet, P. G. & Genet, M. J. XPS analysis of bio-organic systems. *Surf. Interface Anal.* **43**, 1453–1470 (2011).
490. Ratner, B. D. & Castner, D. G. Advances in X-ray photoelectron spectroscopy instrumentation and methodology: instrument evaluation and new techniques with special reference to biomedical studies. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2**, 333–346 (1994).
491. Wagner, M. S., McArthur, S. L., Shen, M., Horbett, T. A. & Castner, D. G. Limits of detection for time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS): detection of low amounts of adsorbed protein. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **13**, 407–428 (2002).
492. Landoulsi, J. *et al.* Silanization with APTES for Controlling the Interactions Between Stainless Steel and Biocomponents: Reality vs Expectation. in *Biomaterials - Physics and Chemistry* (ed. Pignatello, R.) (InTech, 2011). doi:10.5772/25004.
493. Siow, K. S., Britcher, L., Kumar, S. & Griesser, H. J. QCM-D and XPS study of protein adsorption on plasma polymers with sulfonate and phosphonate surface groups. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **173**, 447–453 (2019).
494. Ahimou, F. *et al.* XPS analysis of chemical functions at the surface of *Bacillus subtilis*. *J. Colloid Interface Sci.* **309**, 49–55 (2007).
495. Rouxhet, P. G. *et al.* Application of X-ray photoelectron spectroscopy to microorganisms. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2**, 347–369 (1994).
496. Caillou, S. *et al.* Enzymes at solid surfaces: Nature of the interfaces and physico-chemical processes. *Electrochimica Acta* **54**, 116–122 (2008).
497. Landoulsi, J. *et al.* Evolution of the passive film and organic constituents at the surface of stainless steel immersed in fresh water. *J. Colloid Interface Sci.* **318**, 278–289 (2008).
498. Landoulsi, J. *et al.* Organic adlayer on inorganic materials: XPS analysis selectivity to cope with adventitious contamination. *Appl. Surf. Sci.* **383**, 71–83 (2016).
499. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, Ch. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930–933 (1986).

500. Kowalewski, T. & Legleiter, J. Imaging stability and average tip-sample force in tapping mode atomic force microscopy. *J. Appl. Phys.* **99**, 064903 (2006).
501. Payton, O., Champneys, A. R., Homer, M. E., Picco, L. & Miles, M. J. Feedback-induced instability in tapping mode atomic force microscopy: theory and experiment. *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **467**, 1801–1822 (2011).
502. Janshoff, null, Neitzert, null, Oberdörfer, null & Fuchs, null. Force Spectroscopy of Molecular Systems-Single Molecule Spectroscopy of Polymers and Biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **39**, 3212–3237 (2000).
503. Tilley, J. M. R., Carr, A. J. & Czernuszka, J. T. Atomic Force Microscopy of bulk tendon samples: affect of location and fixation on tissue ultrastructure. *Micron Oxf. Engl. 1993* **42**, 531–535 (2011).
504. Marturano, J. E., Arena, J. D., Schiller, Z. A., Georgakoudi, I. & Kuo, C. K. Characterization of mechanical and biochemical properties of developing embryonic tendon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6370–6375 (2013).
505. Kammoun, M. *et al.* Development of a novel multiphysical approach for the characterization of mechanical properties of musculotendinous tissues. *Sci. Rep.* **9**, 7733 (2019).
506. Hassenkam, T. *et al.* High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. *Bone* **35**, 4–10 (2004).
507. Lin, Y. & Xu, S. AFM analysis of the lacunar-canalicular network in demineralized compact bone. *J. Microsc.* **241**, 291–302 (2011).
508. Qian, T., Chen, X. & Hang, F. Investigation of nanoscale failure behaviour of cortical bone under stress by AFM. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **112**, 103989 (2020).
509. Stolz, M. *et al.* Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 186–192 (2009).
510. Stolz, M. *et al.* Dynamic elastic modulus of porcine articular cartilage determined at two different levels of tissue organization by indentation-type atomic force microscopy. *Biophys. J.* **86**, 3269–3283 (2004).
511. Imer, R. *et al.* The measurement of biomechanical properties of porcine articular cartilage using atomic force microscopy. *Arch. Histol. Cytol.* **72**, 251–259 (2009).
512. Armstrong, C. G. & Mow, V. C. Variations in the intrinsic mechanical properties of human articular cartilage with age, degeneration, and water content. *J. Bone Joint Surg. Am.* **64**, 88–94 (1982).
513. Jurvelin, J. S., Buschmann, M. D. & Hunziker, E. B. Mechanical anisotropy of the human knee articular cartilage in compression. *Proc. Inst. Mech. Eng. [H]* **217**, 215–219 (2003).
514. Thomazeau, H. *et al.* Long-term, Prospective, Multicenter Study of Isolated Bankart Repair for a Patient Selection Method Based on the Instability Severity Index Score. *Am. J. Sports Med.* **47**, 1057–1061 (2019).
515. Jobe, F. W. & Pink, M. The Athlete’s Shoulder. *J. Hand Ther.* **7**, 107–110 (1994).
516. Debski, R. E., Moore, S. M., Mercer, J. L., Sacks, M. S. & McMahon, P. J. The collagen fibers of the anteroinferior capsulolabrum have multiaxial orientation to resist shoulder dislocation. *J. Shoulder Elbow Surg.* **12**, 247–252 (2003).
517. Browe, D. P., Voycheck, C. A., McMahon, P. J. & Debski, R. E. Changes to the mechanical properties of the glenohumeral capsule during anterior dislocation. *J. Biomech.* **47**, 464–469 (2014).
518. Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V. & Ciardelli, G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* **8**, 3191–3200 (2012).
519. Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A. & Chapman, J. A. Collagen fibril formation. *Biochem. J.* **316**, 1–11 (1996).
520. Zhang, X. *et al.* A Review of Collagen Cross-Linking in Cornea and Sclera. *J. Ophthalmol.* **2015**, 1–12 (2015).
521. Stolz, M. *et al.* Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 186–192 (2009).
522. Andriotis, O. G. *et al.* Nanomechanical assessment of human and murine collagen fibrils via atomic force microscopy cantilever-based nanoindentation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **39**, 9–26 (2014).
523. Han, L., Grodzinsky, A. J. & Ortiz, C. Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 133–168 (2011).

524. Fullwood, N. J., Hammiche, A., Pollock, H. M., Hourston, D. J. & Song, M. Atomic force microscopy of the cornea and sclera. *Curr. Eye Res.* **14**, 529–535 (1995).
525. Revenko, I., Sommer, F., Minh, D. T., Garrone, R. & Franc, J.-M. Atomic force microscopy study of the collagen fibre structure. *Biol. Cell* **80**, 67–69 (1994).
526. Bozec, L., van der Heijden, G. & Horton, M. Collagen Fibrils: Nanoscale Ropes. *Biophys. J.* **92**, 70–75 (2007).
527. Gutschmann, T. *et al.* Evidence that Collagen Fibrils in Tendons Are Inhomogeneously Structured in a Tubelike Manner. *Biophys. J.* **84**, 2593–2598 (2003).
528. Miyagawa, A. *et al.* Surface Ultrastructure of Collagen Fibrils and Their Association With Proteoglycans in Human Cornea and Sclera by Atomic Force Microscopy and Energy-filtering Transmission Electron Microscopy: *Cornea* **20**, 651–656 (2001).
529. Wenger, M. P. E., Bozec, L., Horton, M. A. & Mesquida, P. Mechanical Properties of Collagen Fibrils. *Biophys. J.* **93**, 1255–1263 (2007).
530. Giménez, A., Uriarte, J. J., Vieyra, J., Navajas, D. & Alcaraz, J. Elastic properties of hydrogels and decellularized tissue sections used in mechanobiology studies probed by atomic force microscopy. *Microsc. Res. Tech.* **80**, 85–96 (2017).
531. Beauvais, M. *et al.* Supramolecular Self-Assembly and Organization of Collagen at Solid/Liquid Interface: Effect of Spheroid- and Rod-Shaped TiO<sub>2</sub> Nanocrystals. *Adv. Mater. Interfaces* **6**, 1900195 (2019).
532. Gutschmann, T. *et al.* Force Spectroscopy of Collagen Fibers to Investigate Their Mechanical Properties and Structural Organization. *Biophys. J.* **86**, 3186–3193 (2004).
533. Erickson, B. *et al.* Nanoscale structure of type I collagen fibrils: Quantitative measurement of D-spacing. *Biotechnol. J.* **8**, 117–126 (2013).
534. McCall, A. S. *et al.* Mechanisms of Corneal Tissue Cross-linking in Response to Treatment with Topical Riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet Radiation (UVA). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 129–138 (2010).
535. Uemura, R. *et al.* UVA-activated riboflavin promotes collagen crosslinking to prevent root caries. *Sci. Rep.* **9**, 1252 (2019).
536. Weadock, K. S., Miller, E. J., Bellincampi, L. D., Zawadsky, J. P. & Dunn, M. G. Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 1373–1379 (1995).
537. Lew, D.-H., Liu, P. H.-T. & Orgill, D. P. Optimization of UV cross-linking density for durable and nontoxic collagen GAG dermal substitute. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **82B**, 51–56 (2007).
538. Lampi, M. C. & Reinhart-King, C. A. Targeting extracellular matrix stiffness to attenuate disease: From molecular mechanisms to clinical trials. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaao0475 (2018).
539. Fratzl, P. *Collagen: structure and mechanics.* (Springer, 2008).
540. Marturano, J. E., Arena, J. D., Schiller, Z. A., Georgakoudi, I. & Kuo, C. K. Characterization of mechanical and biochemical properties of developing embryonic tendon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 6370–6375 (2013).
541. Chen, X. *et al.* Mechanical Heterogeneity in the Bone Microenvironment as Characterized by Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **119**, 502–513 (2020).
542. Fessel, G., Gerber, C. & Snedeker, J. G. Potential of collagen cross-linking therapies to mediate tendon mechanical properties. *J. Shoulder Elbow Surg.* **21**, 209–217 (2012).
543. Nourissat, G., Vigan, M., Hamonet, C., Doursounian, L. & Deranlot, J. Diagnosis of Ehlers-Danlos syndrome after a first shoulder dislocation. *J. Shoulder Elbow Surg.* **27**, 65–69 (2018).
544. Matzat, S. J., van Tiel, J., Gold, G. E. & Oei, E. H. G. Quantitative MRI techniques of cartilage composition. *Quant. Imaging Med. Surg.* **3**, 13 (2013).
545. Shoulders, M. D. & Raines, R. T. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 929–958 (2009).
546. A. Maroudas. Physicochemical properties of articular cartilage. in *Adult Articular Cartilage* 215–290 (Pitman Medical Publishing, 1980).
547. Verzijl, N. *et al.* Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: A possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 114–123 (2002).

548. Tiku, M. L. & Madhan, B. Preserving the longevity of long-lived type II collagen and its implication for cartilage therapeutics. *Ageing Res. Rev.* **28**, 62–71 (2016).
549. Martin, J. A. & Buckwalter, J. A. Roles of Articular Cartilage Aging and Chondrocyte Senescence in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Iowa Orthop. J.* **21**, 1–7 (2001).
550. Buckwalter, J. A. & Martin, J. A. Osteoarthritis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**, 150–167 (2006).
551. Buckwalter, J. A., Mankin, H. J. & Grodzinsky, A. J. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr. Course Lect.* **54**, 465–480 (2005).
552. Heinegård, D. & Saxne, T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 50–56 (2011).
553. Sarin, J. K. *et al.* Dataset on equine cartilage near infrared spectra, composition, and functional properties. *Sci. Data* **6**, 164 (2019).
554. Lang, P. & Linke, W. Determinants of Transversal Stiffness of Single Muscle Sarcomeres by AFM. *Biophys. J.* **104**, 36 (2013).
555. Giménez, A., Uriarte, J. J., Vieyra, J., Navajas, D. & Alcaraz, J. Elastic properties of hydrogels and decellularized tissue sections used in mechanobiology studies probed by atomic force microscopy. *Microsc. Res. Tech.* **80**, 85–96 (2017).
556. Touré, Y., Genet, M. J., Dupont-Gillain, C. C., Sindic, M. & Rouxhet, P. G. Conditioning materials with biomacromolecules: Composition of the adlayer and influence on cleanability. *J. Colloid Interface Sci.* **432**, 158–169 (2014).
557. Bhosale, A. M. & Richardson, J. B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* **87**, 77–95 (2008).
558. Mittelstaedt, D., Xia, Y., Shmelyov, A., Casciani, N. & Bidthanapally, A. Quantitative Determination of Morphological and Territorial Structures of Articular Cartilage from Both Perpendicular and Parallel Sections by Polarized Light Microscopy. *Connect. Tissue Res.* **52**, 512–22 (2011).
559. Hunziker, E. B., Quinn, T. M. & Häuselmann, H.-J. Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 564–572 (2002).
560. Nelson, F. *et al.* Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* **102**, 2115–2125 (1998).
561. Cs-Szabó, G., Roughley, P. J., Plaas, A. H. & Glant, T. T. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **38**, 660–668 (1995).
562. Tang, B. *et al.* Nanostiffness of Collagen Fibrils Extracted from Osteoarthritic Cartilage Characterized with AFM Nanoindentation. *Soft Mater.* **12**, 253–261 (2014).
563. Development of an Arthroscopic Atomic Force Microscope. *Bioworld* (2003).
564. Jerosch, J. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. *Int. J. Rheumatol.* **2011**, 969012 (2011).
565. Lark, M. W. *et al.* Aggrecan degradation in human cartilage: Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J. Clin. Invest.* **100**, 93–106 (1997).
566. Goldring, S. R. & Goldring, M. B. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage–bone crosstalk. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 632–644 (2016).
567. Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.-P. & Roughley, P. J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **22**, 351–384 (2008).
568. Xu, L. *et al.* Osteoarthritis-like changes and decreased mechanical function of articular cartilage in the joints of mice with the chondrodysplasia gene (cho). *Arthritis Rheum.* **48**, 2509–2518 (2003).
569. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* **4**, 30–35 (2002).
570. Broom, N., Chen, M.-H. & Hardy, A. A degeneration-based hypothesis for interpreting fibrillar changes in the osteoarthritic cartilage matrix. *J. Anat.* **199**, 683–698 (2001).
571. Laasanen, M. S. *et al.* Biomechanical properties of knee articular cartilage. *Biorheology* **40**, 133–140 (2003).
572. Anderson, H. C., Garimella, R. & Tague, S. E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **10**, 822–837 (2005).
573. Mackie, E. J., Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Chen, K.-S. & Mirams, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 46–62 (2008).

574. Kronenberg, H. M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332–336 (2003).
575. Dreier, R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res. Ther.* **12**, 216 (2010).
576. Kraan, P. M. van der & Berg, W. B. van den. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 223–232 (2012).
577. Rim, Y. A., Nam, Y. & Ju, J. H. The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2358 (2020).
578. Singh, P., Marcu, K. B., Goldring, M. B. & Otero, M. Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1442**, 17–34 (2019).
579. Wuthier, R. E. *et al.* Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. *J. Biol. Chem.* **260**, 15972–15979 (1985).
580. Shen, G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod. Craniofac. Res.* **8**, 11–17 (2005).
581. Iyama, K. *et al.* Spatiotemporal pattern of type X collagen gene expression and collagen deposition in embryonic chick vertebrae undergoing endochondral ossification. *Anat. Rec.* **229**, 462–472 (1991).
582. Gerstenfeld, L. C. & Landis, W. J. Gene expression and extracellular matrix ultrastructure of a mineralizing chondrocyte cell culture system. *J. Cell Biol.* **112**, 501–513 (1991).
583. Kergosien, N., Sautier, J.-M. & Forest, N. Gene and Protein Expression During Differentiation and Matrix Mineralization in a Chondrocyte Cell Culture System. *Calcif. Tissue Int.* **62**, 114–121 (1998).
584. van Eegher, S. *et al.* The differentiation of prehypertrophic into hypertrophic chondrocytes drives an OA-remodeling program and IL-34 expression. *Osteoarthritis Cartilage* **29**, 257–268 (2021).
585. Salvat, C., Pigenet, A., Humbert, L., Berenbaum, F. & Thirion, S. Immature murine articular chondrocytes in primary culture: a new tool for investigating cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **13**, 243–249 (2005).
586. Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S. & Jacques, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat. Protoc.* **3**, 1253–1260 (2008).
587. Kirsch, T., Nah, H.-D., Shapiro, I. M. & Pacifici, M. Regulated Production of Mineralization-competent Matrix Vesicles in Hypertrophic Chondrocytes. *J. Cell Biol.* **137**, 1149–1160 (1997).
588. Farnsdale, R. W., Sayers, C. A. & Barrett, A. J. A Direct Spectrophotometric Microassay for Sulfated Glycosaminoglycans in Cartilage Cultures. *Connect. Tissue Res.* **9**, 247–248 (1982).
589. Gregory, C. A., Grady Gunn, W., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **329**, 77–84 (2004).
590. Boraldi, F., Lofaro, F. D. & Quaglino, D. Apoptosis in the Extraosseous Calcification Process. *Cells* **10**, 131 (2021).
591. Guibert, C. & Landoulsi, J. Enzymatic Approach in Calcium Phosphate Biomineralization: A Contribution to Reconcile the Physicochemical with the Physiological View. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12957 (2021).
592. Mohd Pu'ad, N. a. S., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I. & Lee, T. C. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon* **5**, e01588 (2019).
593. Gebauer, D. *Nucleation of Minerals: Precursors, Intermediates and Their Use in Materials Chemistry.* (MDPI, 2018).
594. Hessle, L. *et al.* 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 (2002).
595. Majeska, R. J. & Wuthier, R. E. Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **391**, 51–60 (1975).
596. Blumenthal, N. C. Mechanisms of inhibition of calcification. *Clin. Orthop.* 279–289 (1989).
597. Tanimura, A., McGregor, D. H. & Anderson, H. C. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* **172**, 173–177 (1983).
598. Fleisch, H. & Bisaz, S. Mechanism of Calcification: Inhibitory Role of Pyrophosphate. *Nature* **195**, 911–911 (1962).

599. Gibson, G. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. *Microsc. Res. Tech.* **43**, 191–204 (1998).
600. Gibson, G., Lin, D. L. & Roque, M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture. *Exp. Cell Res.* **233**, 372–382 (1997).
601. Magne, D. *et al.* Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **18**, 1430–1442 (2003).
602. Lotz, M., Hashimoto, S. & Kühn, K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 389–391 (1999).
603. Miyaki, S. & Lotz, M. K. Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **30**, 129–135 (2018).
604. Wang, M. *et al.* MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R5 (2013).
605. Hu, Q. & Ecker, M. Overview of MMP-13 as a Promising Target for the Treatment of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1742 (2021).
606. Inada, M. *et al.* Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 17192–17197 (2004).
607. Miosge, N., Hartmann, M., Maelicke, C. & Herken, R. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem. Cell Biol.* **122**, 229–236 (2004).
608. Mankin, H. J. Biochemical and Metabolic Aspects of Osteoarthritis\*. *Orthop. Clin. North Am.* **2**, 19–31 (1971).
609. Nerlich, A. G., Wiest, I. & von der Mark, K. Immunohistochemical analysis of interstitial collagens in cartilage of different stages of osteoarthrosis. *Virchows Arch. B* **63**, 249–255 (1993).
610. Gebhard, P. M. *et al.* Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **21**, 96–101 (2003).
611. Miosge, N. *et al.* Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **6**, 278–285 (1998).
612. Martin, I. *et al.* Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. *Osteoarthritis Cartilage* **9**, 112–118 (2001).
613. Casagrande, D., Stains, J. P. & Murthi, A. M. Identification of shoulder osteoarthritis biomarkers: comparison between shoulders with and without osteoarthritis. *J. Shoulder Elbow Surg.* **24**, 382–390 (2015).
614. Genge, B. R., Wu, L. N. Y. & Wuthier, R. E. Mineralization of annexin-5-containing lipid-calcium-phosphate complexes: modulation by varying lipid composition and incubation with cartilage collagens. *J. Biol. Chem.* **283**, 9737–9748 (2008).
615. Chen, C. C. & Boskey, A. L. The effects of proteoglycans from different cartilage types on in vitro hydroxyapatite proliferation. *Calcif. Tissue Int.* **39**, 324–327 (1986).
616. Wojtas, M., Lausch, A. J. & Sone, E. D. Glycosaminoglycans accelerate biomimetic collagen mineralization in a tissue-based in vitro model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 12636–12642 (2020).
617. Goldberg, M. *et al.* Targeted disruption of two small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin, excerpts divergent effects on enamel and dentin formation. *Calcif. Tissue Int.* **77**, 297–310 (2005).
618. Goldberg, M., Septier, D., Oldberg, A., Young, M. F. & Amedy, L. G. Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **54**, 525–537 (2006).
619. Nishida, Y., Shinomura, T., Iwata, H., Miura, T. & Kimata, K. Abnormal occurrence of a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **2**, 43–49 (1994).
620. Li, S. *et al.* Exosomes from hyperglycemia-stimulated vascular endothelial cells contain versican that regulate calcification/senescence in vascular smooth muscle cells. *Cell Biosci.* **9**, 1 (2019).
621. Kirsch, T., Swoboda, B. & von der Mark, K. Ascorbate independent differentiation of human chondrocytes in vitro: simultaneous expression of types I and  $\times$  collagen and matrix mineralization. *Differentiation* **52**, 89–100 (1992).



622. Kwan, K. M. *et al.* Abnormal compartmentalization of cartilage matrix components in mice lacking collagen X: implications for function. *J. Cell Biol.* **136**, 459–471 (1997).
623. Kong, R. Y. C. *et al.* Intron-exon structure, alternative use of promoter and expression of the mouse collagen X gene, Col10a-1. *Eur. J. Biochem.* **213**, 99–111 (1993).
624. Mwale, F. *et al.* Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. *Dev. Dyn.* **218**, 648–662 (2000).
625. Qiao, Z. *et al.* Infrared nanoimaging of nanoscale sliding dislocation of collagen fibrils. *Nano Res.* **15**, 2355–2361 (2022).
626. Depalle, B., Qin, Z., Shefelbine, S. J. & Buehler, M. J. Influence of cross-link structure, density and mechanical properties in the mesoscale deformation mechanisms of collagen fibrils. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **52**, 1–13 (2015).
627. Depalle, B. *et al.* The different distribution of enzymatic collagen cross-links found in adult and children bone result in different mechanical behavior of collagen. *Bone* **110**, 107–114 (2018).
628. Yoshida, K. *et al.* Quantitative Evaluation of Collagen Crosslinks and Corresponding Tensile Mechanical Properties in Mouse Cervical Tissue during Normal Pregnancy. *PLoS ONE* **9**, e112391 (2014).
629. Rieppo, L. *et al.* Infrared microspectroscopic determination of collagen cross-links in articular cartilage. *J. Biomed. Opt.* **22**, 035007 (2017).
630. Guilbert, M. *et al.* Probing non-enzymatic glycation of type I collagen: A novel approach using Raman and infrared biophotonic methods. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1830**, 3525–3531 (2013).
631. Roy, R., Boskey, A. & Bonassar, L. J. Processing of type I collagen gels using nonenzymatic glycation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **93A**, 843–851 (2010).
632. Paschalis, E. P. *et al.* Spectroscopic Characterization of Collagen Cross-Links in Bone. *J. Bone Miner. Res.* **16**, 1821–1828 (2001).
633. Jung, E. *et al.* Quantitative analysis of water distribution in human articular cartilage using terahertz time-domain spectroscopy. *Biomed. Opt. Express* **3**, 1110–1115 (2012).
634. Wang, Q. *et al.* An ultrasound study of altered hydration behaviour of proteoglycan-degraded articular cartilage. *BMC Musculoskelet. Disord.* **14**, 289 (2013).
635. Unal, M., Wilson, R. L., Neu, C. P. & Akkus, O. Raman spectroscopic hydration status assessment predicts histological score of osteoarthritic human cartilage specimens. *Osteoarthritis Cartilage* **29**, S146 (2021).
636. Amadò, R., Werner, G. & Neukom, H. Water content of human articular cartilage and its determination by gas chromatography. *Biochem. Med.* **16**, 169–172 (1976).
637. Xu, J., Zhu, P., Morris, M. D. & Ramamoorthy, A. Solid-State NMR Spectroscopy Provides Atomic-Level Insights Into the Dehydration of Cartilage. *J. Phys. Chem. B* **115**, 9948–9954 (2011).
638. Zhao, Y. *et al.* Submillimetric FTIR detection of articular cartilage by home-made ATR-MIR-Hollow optical fiber probe. *Infrared Phys. Technol.* **98**, 236–239 (2019).
639. Oinas, J. *et al.* Imaging of Osteoarthritic Human Articular Cartilage using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy Combined with Multivariate and Univariate Analysis. *Sci. Rep.* **6**, 30008 (2016).
640. Tortorella, M. D. *et al.* Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J. Biol. Chem.* **275**, 18566–18573 (2000).
641. Kashiwagi, M. *et al.* Altered Proteolytic Activities of ADAMTS-4 Expressed by C-terminal Processing \*. *J. Biol. Chem.* **279**, 10109–10119 (2004).
642. Little, C. B. *et al.* Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan in vitro. *Biochem. J.* **344**, 61–68 (1999).
643. Troeberg, L. & Nagase, H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 133–145 (2012).
644. Struglics, A. & Hansson, M. MMP proteolysis of the human extracellular matrix protein aggrecan is mainly a process of normal turnover. *Biochem. J.* **446**, 213–223 (2012).
645. Holmes, M. W., Bayliss, M. T. & Muir, H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem. J.* **250**, 435–441 (1988).
646. Birk, D. E. & Brückner, P. *Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly. The Extracellular Matrix: an Overview* doi:10.1007/978-3-642-16555-9\_3.

647. Revell, C. K. *et al.* Collagen fibril assembly: New approaches to unanswered questions. *Matrix Biol. Plus* **12**, 100079 (2021).
648. Blaschke, U. K., Eikenberry, E. F., Hulmes, D. J., Galla, H. J. & Bruckner, P. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.* **275**, 10370–10378 (2000).
649. Han, B. *et al.* Decorin Regulates the Aggrecan Network Integrity and Biomechanical Functions of Cartilage Extracellular Matrix. *ACS Nano* **13**, 11320–11333 (2019).
650. Lorenzo, P. *et al.* Identification and Characterization of Asporin: A NOVEL MEMBER OF THE LEUCINE-RICH REPEAT PROTEIN FAMILY CLOSELY RELATED TO DECORIN AND BIGLYCAN\*. *J. Biol. Chem.* **276**, 12201–12211 (2001).
651. Monfort, J. *et al.* Identification of opticin, a member of the small leucine-rich repeat proteoglycan family, in human articular tissues: a novel target for MMP-13 in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **16**, 749–755 (2008).
652. Aigner, T. *et al.* Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 3533–3544 (2006).
653. Melrose, J. *et al.* Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratocan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. *Arthritis Res. Ther.* **10**, R79 (2008).
654. Cs-Szabó, G., Melching, L. I., Roughley, P. J. & Glant, T. T. Changes in messenger rna and protein levels of proteoglycans and link protein in human osteoarthritic cartilage samples. *Arthritis Rheum.* **40**, 1037–1045 (1997).
655. Ameye, L. *et al.* Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment, ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB J.* **16**, 673–680 (2002).
656. Gill, M. R., Oldberg, Å. & Reinholt, F. P. Fibromodulin-null murine knee joints display increased incidences of osteoarthritis and alterations in tissue biochemistry. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 751–757 (2002).
657. Kiltz, T. *et al.* Potential roles for the small leucine-rich proteoglycans biglycan and fibromodulin in ectopic ossification of tendon induced by exercise and in modulating rotarod performance. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **19**, 536–546 (2009).
658. Nuka, S. *et al.* Phenotypic characterization of epiphykan-deficient and epiphykan/biglycan double-deficient mice. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 88–96 (2010).
659. Bos, S. D., Slagboom, P. E. & Meulenbelt, I. New insights into osteoarthritis: early developmental features of an ageing-related disease. *Curr. Opin. Rheumatol.* **20**, 553–559 (2008).
660. Balcerzak, M. *et al.* The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim. Pol.* **50**, 1019–1038 (2003).
661. Johnson, K. *et al.* Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **14**, 883–892 (1999).
662. Johnson, K. *et al.* Differential mechanisms of inorganic pyrophosphate production by plasma cell membrane glycoprotein-1 and B10 in chondrocytes. *Arthritis Rheum.* **42**, 1986–1997 (1999).
663. Hakim, F. T. *et al.* Hereditary joint disorder in progressive ankylosis (ank/ank) mice. I. Association of calcium hydroxyapatite deposition with inflammatory arthropathy. *Arthritis Rheum.* **27**, 1411–1420 (1984).
664. Ho, A. M., Johnson, M. D. & Kingsley, D. M. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* **289**, 265–270 (2000).
665. Nürnberg, P. *et al.* Heterozygous mutations in ANKH, the human ortholog of the mouse progressive ankylosis gene, result in craniometaphyseal dysplasia. *Nat. Genet.* **28**, 37–41 (2001).
666. Zhu, W., Robey, P. G. & Boskey, A. L. CHAPTER 9 - The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone. in *Osteoporosis (Third Edition)* (eds. Marcus, R., Feldman, D., Nelson, D. A. & Rosen, C. J.) 191–240 (Academic Press, 2008). doi:10.1016/B978-012370544-0.50011-2.
667. Matsumoto, K. *et al.* Identification and Characterization of Versican/PG-M Aggregates in Cartilage \*. *J. Biol. Chem.* **281**, 18257–18263 (2006).
668. Staines, K. A., MacRae, V. E. & Farquharson, C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J. Endocrinol.* **214**, 241–255 (2012).

669. Tanuma, S., Powell, C. J. & Penn, D. R. Calculations of electron inelastic mean free paths. *Surf. Interface Anal.* **37**, 1–14 (2005).
670. - QUASES. <http://www.quases.com/home/>.

