



**HAL**  
open science

# Utilisation du modèle cellulaire ATDC5 pour la caractérisation des mécanismes de maturation des procollagènes et de leurs relations avec le processus de minéralisation matricielle

Dafné Wilhelm

► **To cite this version:**

Dafné Wilhelm. Utilisation du modèle cellulaire ATDC5 pour la caractérisation des mécanismes de maturation des procollagènes et de leurs relations avec le processus de minéralisation matricielle. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0286 . tel-02746390

**HAL Id: tel-02746390**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02746390>**

Submitted on 3 Jun 2020

**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.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE

BioSE



ECOLE DOCTORALE BioSE

BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT  
ED 266

**Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)**

## Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Dafné WILHELM**

# **Utilisation du modèle cellulaire ATDC5 pour la caractérisation des mécanismes de maturation des procollagènes et de leurs relations avec le processus de minéralisation matricielle**

**Mercredi 4 décembre 2019**

**Membres du jury :**

**Rapporteurs :**

**Dr. David HULMES, DR CNRS Emérite, UMR 5305 CNRS LBTI, Université de Lyon 1**

**Pr. David MAGNE, UMR 5246 CNRS – Université de Lyon 1 MEM2**

**Examineurs :**

**Dr. Halima KERDJOUJ, MCU HDR, EA 4691 BIOS – Université de Reims**

**Pr. Laurence SABATIER, UMR 7178 CNRS – Université de Strasbourg LSMBO**

**Pr. Brigitte LEININGER, UMR 1256 INSERM – Université de Lorraine NGERE**

**Dr. Arnaud BIANCHI, IR HDR, UMR7365 CNRS – Université de Lorraine IMoPA, directeur de thèse**

**Dr. Jean-Baptiste VINCOURT, IR, UMR7365 CNRS – Université de Lorraine IMoPA, co-directeur de thèse**

---

**UMR 7365 CNRS-UL Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA)**

**Biopôle de l'Université de Lorraine, Campus Brabois-Santé,**

**9, avenue de la forêt de Haye - BP 20199, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France**



COLLAGENE \kɔ.la.ʒɛn\ n.m

Du grec ancien Κόλλα, *kolla*, colle, et γένος, *génos*, génération, origine.

1. *Etymol. et Hist.* Qui produit de la colle, de la gélatine. Près de 10 000 ans avant notre ère, faire chauffer et bouillir des tissus conjonctifs animaux permettait déjà à l'Homme du Néolithique d'extraire une gélatine qu'il utilisait en complément d'une résine végétale à des fins de décoration rituelle [1].
2. *Biochim.* Protéines la plus abondante du corps humain, responsable de la cohésion des tissus.



## REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu remercier mes Directeurs de thèse, Jean – Baptiste Vincourt et Arnaud Bianchi, ainsi que le directeur du laboratoire IMoPA, Jean – Yves Jouzeau pour m’ avoir accueillie au sein de l’ unité.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d’y prendre part, le Docteur Halima Kerdjoudj, les professeurs Laurence Sabatier et Brigitte Leininger, avec plus particulièrement un grand merci au Docteur David Hulmes et au Professeur David Magne en tant que rapporteurs.

Merci à Patrick Menu et au Conseil Scientifique de l’ Ecole Doctorale BioSE, à Clotilde Boulanger et au Collège Lorrain des Ecoles Doctorales, ainsi qu’ à tous mes collègues en thèse de qui j’ ai eu le soutien, de m’ avoir offert l’ opportunité d’ assurer la fonction de représentante des doctorants.

Cela fait bientôt 6 ans que le Biopôle me voit courir dans ses couloirs. Au fil des années il est devenu comme une seconde maison. J’ y aurai côtoyé enseignants, collègues et amis, parfois des personnes qui sont les trois à la fois. Il m’ aura vu rire et pleurer, j’ y aurai connu parmi mes pires angoisses et mes plus belles victoires. Et qui dit maison, dit famille.

Merci à toutes mes grandes sœurs et mes grands frères de labo aux côtés de qui j’ ai grandi : Anne dont la cime dépassant au-dessus de l’ ordi me manque déjà, Adeline pour tous moments passés ensemble et le soutien que tu m’ offrais chaque jour, Mahdia pour la confiance que tu as toujours eu en moi, papa Paulux aux blagues aussi affûtées et précises que ses tirs, Sajida for all the precious times that we spent speaking together, Elise et Nico, Dima, Mathilde, Anne-So, Naceur. Merci aux expatriés BB, Jonny et Anaïs pour les moments inoubliables et les courbatures (vous me manquez les coupains <3), et ma Mélu, loin des yeux mais jamais loin du cœur. Merci pour tous ces fous rires et ces moments de complicité, merci de m’ avoir soutenue dans les bons moments et supporté dans les pires ! Merci Géraud, Flo, Théo (ne perd pas espoir de me faire comprendre la physique un jour) et Ben, mes comparses de promos, je vous souhaite un avenir à la hauteur des galères que l’ on a traversées.

Merci à toutes mes petites sœurs et petits frères de labo dont les sourires et la bonne humeur contribuent largement chaque jour à la bonne ambiance de notre second « chez nous » : Océanne, Adrien, Laeya et Hélène, JM, Liza, Quentin, Stéfania, Charlène, Sana, Charlotte, Marion, Laura, Fatouma, Cécile et Anne-Bé. J’ associe à ces remerciements les scientifiques en herbe qui seront passés par la plateforme de protéo durant ces trois dernières années, en particulier Benjamin et Soufiane pour l’ aide précieuse apportée pour les manipes.

Je voudrais aussi exprimer ma sincère gratitude à toutes mes tatas : Cécile et Nathalie pour votre bienveillance, Nadia et Gigi pour avoir su m’ alléger la pénible tâche des dédales administratifs par votre efficacité redoutable, Sandrine pour ta douceur réconfortante, Karine et Marie pour les agréables moments passés à ne pas discuter de sciences. Merci Murielle pour les séances de vita – zen – attitude qui m’ ont permises plus d’ une fois de décompresser. Merci pour ta bienveillance et ton sourire. Je tiens à remercier Sandrine et Stéphanie qui ont accepté de faire partie de mon comité de suivi individuel. Merci de m’ avoir écoutée et conseillée et merci pour ces rapports privilégiés.

Une pensée va aussi à mes tontons : Hervé, évidemment, celui qui a des yeux partout et sans qui ce travail de thèse n'aurait pas été le même, ainsi que David et Fred. Merci pour vos conseils pertinents et votre implication dans la réussite de mon projet. Merci Laurent, maître caféine et paternaliste.

Merci tonton Nono pour l'accueil toujours joyeux dans ton bureau dont la porte était toujours grande ouverte (même quand tu n'y étais pas !). Merci pour ton air taquin et ces rires éclatants à en faire trembler les murs, merci pour toutes ces discussions enrichissantes et musicales qui dépassaient (très) souvent le pur cadre professionnel.

Merci JB. Ce travail de thèse, il est autant le mien que le tien. Merci d'avoir été le premier à avoir cru en moi et à m'avoir donné ma chance il y a de cela (plus ou moins) 6 ans. Plus que tout autre, tu m'auras vu rire et pleurer (surement plus pleurer que rire d'ailleurs), galérer et persévérer. Merci de m'avoir fait profiter de ton expertise dans un tas de domaines, merci pour ces rapports professionnels emplets de respect qui m'ont permis de passer toutes ces années dans un cadre sains, même quand notre tendance au quiproquo de vieux couple compliquait les interactions. Quelques lignes dans une section de remerciements ne seront jamais suffisantes pour te dire merci, mais je suis sûre que tu auras eu la perspicacité de noter ce qui sera mon ultime marque de gratitude.

Merci à toute la petite famille d'IMoPA Go Green de m'avoir suivi dans mon initiative de hippie – écolo. Nous ne sauverons peut-être pas le monde, mais j'ai plaisir à penser que nous aurons au moins réussi à faire de notre labo un lieu où il est plus sain de vivre. Merci pour votre enthousiasme et les discussions enrichissantes, merci à Christophe pour toute ta bonne volonté.

Une pensée toute particulière va à ma belle-famille laborantine, la Team GeoRessources. L'intégration au sein de cette bande d'amoureux de la Terre et de ce qu'elle a de plus beau à offrir s'est faite à mon plus grand bonheur (et à celui de mon estomac et de mon foie). Merci à mes Licornes Héloïse et Joséphine, enthousiastes et passionnées, Audrey et ses amours cocasses, Nora à l'accent chantant, la Migros (je reste ta plus grande fan <3), Dimitri, Julien et Julien (Tatin ou Tatatin ?). Merci de m'avoir accueillie au cours de ces innombrables pauses-café, restos et autres soirées gastronomiques fromagères. Et je n'oublie pas Camille et nos regards complices l'air de dire « toi non plus, t'as pas compris ? ».

Merci à ma famille d'accueil DynAMic, avec qui j'apprends chaque jour un peu plus qu'on peut faire autre chose avec des bactéries que des mini prep. Merci Bertrand pour la confiance que vous m'avez accordée alors que je n'avais pas encore fini ma thèse. Cette même confiance m'a également été accordée par Virginie et Florence lors de ces trois ans de thèse et qui m'ont offert l'incroyable opportunité de faire de l'enseignement. J'y ai pris goût, et les cours ont largement participé à mon épanouissement tant professionnel que personnel. Merci à mes étudiants que j'aime autant que je déteste, et que j'adore détester. Merci Virginie pour ton soutien et ta bienveillance. Merci à mes nouvelles co-bureau Claire et Emilie pour l'accueil qui, faute de réchauffer la pièce, me réchauffe le cœur.

Merci Pouyou, Soso et Roro, ma sainte Trinité d'amour et d'amitié, ma fraternité de toujours. Je lève mon verre à tous nos moments passés, et à tous ceux à venir. On s'en est fait la promesse il y a de nombreuses années, le rendez-vous est pris.

Merci à toutes ces personnes qui auront croisé ma route et contribué un tant soit peu à faire de ces dernières années des moments inoubliables, peut-être même sans le savoir. J'ai la chance

d'avoir rencontré bien trop de personnes exceptionnelles pour pouvoir toutes les nommer ici, et j'espère que vous ne m'en tiendrez pas rigueur.

Ma plus sincère reconnaissance est tournée vers ma famille de la vraie vie. Merci Papa et Maman de m'avoir poussée et soutenue chacun à votre façon. Ma thèse aujourd'hui, je vous la dois. Merci Zoé et Nicolas, Nicolas et Vanessa. La maison n'aura jamais été aussi emplie de vie que depuis que la famille s'est agrandie. Je vous aime.

Merci à Catherine, Franck, Sarah, toute la famille Vasseur – Goedert et ses nombreuses extensions pour l'accueil inconditionnel que vous m'avez offert.



A Raphaël, mon amour, qui me fait grandir chaque  
jour et qui ne cessera jamais de me surprendre.

A Jean-Marc B. qui, le premier, m'a  
donné l'envie de faire des sciences.

Je vous dédie ce travail de thèse.



# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

ACN		CUB	
Acétonitrile .....	73	<i>Complement-Uegf-Bmp1</i> .....	29
ADAMTS		DMEM/F-12	
<i>A Disintegrin and Metalloprotease with</i>		<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	
<i>Thrombospondin motifs</i> .....	28	<i>Nutrient Mixture F-12</i> .....	65
AF		DOC	
Acide formique .....	71	Na-deoxycholate .....	73
AGE		ePPI	
<i>Advanced glycation end products</i> .....	15	PPI extracellulaire.....	<i>Voir PPI</i>
ALP		ERES	
Phosphatase alcaline non spécifique de tissu .	44	<i>Endoplasmic Reticulum Exist Sites</i> .....	27
BGP		ERGIC	
<i>Bone Gla Protein</i> .....	48	<i>ER to Golgi intermediate compartment</i> .....	27
BMP-1		FACITs	
<i>Bone morphogenetic protein-1</i> .....	28	Collagènes associés aux fibrilles avec une triple	
cKO		hélice interrompue.....	17
<i>Knock - out conditionnel</i> .....	24	FDR	
CNBr		<i>False Discovery Rate</i> .....	75
Bromure de cyanogène.....	71	FN	
Col I		Fibronectine .....	9
Collagène de type I.....	7	GAG	
Col II		Glycosaminoglycanes .....	8
Collagène de type II.....	7	GCCX	
Col III		Glutamate $\gamma$ -carboxylase .....	48
Collagène de type III .....	11	GGT	
Col IV		Glucosylgalactosyl - transférase .....	26
Collagène de type IV .....	1	Gla	
Col IX		Acide $\gamma$ -glutamic .....	48
Collagène de type IX .....	19	Glu	
Col V		Acide glutamique.....	48
Collagène de type V.....	23	GRP	
Col VI		<i>Gla – Rich Protein</i> .....	48
collagène de type VI.....	41	GT	
Col XI		Galactosyltransférase.....	26
Collagène de type XI .....	19	HA	
Col XII		Hydroxyapatite .....	43
Collagène de type XII.....	38	Hsp47	
Col XIV		<i>Heat Shock Protein 47</i> .....	24
Collagènes de type XIV.....	38	Hyl	
Col XVIII		Hydroxylysines.....	26
Collagène de type XVIII.....	10	Hyp	
CPI		Hydroxyproline.....	18
C-propeptide du collagène de type I.....	10	IAA	
CPII		Iodoacétamide.....	73
C-propeptide du collagène de type II.....	10	KO	
CPIII		<i>Knock - out</i> .....	24
C-propeptide du collagène de type III .....	23	LH	
CPB		Lysine Hydroxylase .....	25
Cristaux de Phosphate Basique.....	46	LOX	
CPPD		Lysyl Oxydase .....	9
Cristaux de calcium de Pyrophosphate		LOXL	
Dihydratés .....	46	LOX - like.....	31



# LISTES DES FIGURES

---

Figure 1 : Innovations évolutives apparues dans le règne animal et aboutissant à l'émergence du tissu osseux.....	2
Figure 2 : Etapes hypothétiques menant à la formation d'un gène ancestral des collagènes fibrillaires .....	4
Figure 3 : Le contenu en collagène de type I détermine la rigidité tissulaire.....	6
Figure 4 : Observation par microscopie électronique à balayage de l'organisation spatiale tissu – spécifique des fibres de collagène de type I dans (A) le ligament mature de rat ou (B) la cornée du singe et des fibres de collagènes de types II dans (C) le cartilage articulaire humain mature.....	7
Figure 5 : Implication des facteurs de croissances lors de la cicatrisation.....	12
Figure 6 : Elastographie mammaire montrant la rigidité accrue d'une tumeur par rapport au tissu sain environnant.....	13
Figure 7 : Modifications de l'architecture de la MEC dans la progression tumorale. ....	14
Figure 8 : Altération de l'organisation du réseau collagénique dans la peau vieillissante et endommagée par les UV .....	15
Figure 9 : Modifications des cross-links enzymatiques et non-enzymatiques au sein des collagènes en fonction de l'âge .....	16
Figure 10 : Conformation tridimensionnelle adoptée par les chaînes polypeptidiques $\alpha$ seules et au sein du trimère de collagène .....	19
Figure 11 : Des mutations dans le domaine en triple hélice des collagènes peuvent mener à des pathologies génétiques .....	20
Figure 12 : Les Prolyl 4-hydroxylases hydroxylent les résidus prolines de manière co- et post-traductionnelles .....	21
Figure 13 : Marquage négatif de fibrilles reconstituée in vitro dans un tampon PBS à partir de collagène de type I recombinant produit en cellules de plante (A) ou avec du collagène de type I bovin heterotrimérique (B) ou homotrimérique (C) .....	22
Figure 14 : Représentation schématique d'une molécule de collagène fibrillaire .....	23
Figure 15 : Alignements multiples de différents C-propeptides humains (Hsa) ou de choanoflagellé (Mbr, Monosiga breviCol Is – eucaryote unicellulaire) .....	24
Figure 16 : Stabilisation des fibrilles de collagènes par la formation de cross-links : exemple d'une hétérofibrille de collagène de types II, IX et XI, spécifique du cartilage .....	27
Figure 17 : Modifications post-traductionnelles des résidus lysine dans le domaine en triple hélice du collagène de type I.....	28
Figure 18 : Le transport du COL1A1 depuis les ERES à proximité du Golgi.....	29
Figure 19 : Les fibrilles de collagène apparaissent anormales chez les mutants homozygotes pour BMP-1. Microscopie électronique à transmission de fibrilles de collagènes de l'amniote d'un embryon sauvage (A) ou mutant (B) pour BMP-1 .....	30
Figure 20 : Structure du complexe CPIII – PCPE-1 et mécanisme d'action de PCPE-1.....	31
Figure 21 : Les gènes PCOLCE1 et PCOLCE2, codant respectivement PCPE-1 et PCPE-2, ont une expression spatiale différente au cours de l'embryogenèse .....	32
Figure 22 : Les fibrilles de collagène apparaissent anormales chez les mutants homozygotes pour PCPE-1.....	33
Figure 23 : Sites de formation des pontages covalents (cross-links) du collagène de type I...	34

Figure 24 : Voies chimiques prédominante dans le tissu squelettique de formation des cross-links des collagènes initiées par la lysyl oxydase .....	35
Figure 25 : Les fibripositors sont des structures membranaires qui permettent la nucléation des fibrilles de collagènes et leur dépôt dans la MEC .....	37
Figure 26 : Structure axiale périodique des fibrilles de collagène .....	38
Figure 27 : La croissance en longueur des fibrilles de collagènes implique l'accrétion de molécules de collagène à la surface puis la fusion de fibrilles plus courtes .....	39
Figure 28 : Modèle structural pour la limitation du diamètre des fibrilles hétérotypiques de collagène II / XI.....	41
Figure 29 : Les fibrilles de collagène sont anormales chez les mutants adultes hétérozygotes Col5a1 <sup>+/-</sup> .....	42
Figure 30 : Les fibrilles de collagène apparaissent anormales chez les mutants homozygotes pour la Dermatan sulfate epimerase 1 (Dse <sup>-/-</sup> ).....	43
Figure 31 : (a) Radiographie d'un genou d'enfant (b) Section longitudinale de la plaque de croissance proximale d'un tibia de souris âgée de 3 semaines. Barre : 50 µm ; coloration Hématoxylin – Eosine. (c) Schématisation d'une coupe longitudinale de la plaque de croissance .....	46
Figure 32 : Représentation schématique de la régulation de la balance Pi / PPi impliquée dans la minéralisation médiée par les VMs .....	48
Figure 33 : La teneur en minéraux est sévèrement réduite à l'âge de 2 mois chez les animaux doubles mutants.....	50
Figure 34 : L'organisation des minéraux est perturbée dans les souris double mutant OC <sup>-/-</sup> OPN <sup>-/-</sup> .....	52
Figure 35 : Les dépôts de minéraux intra fibrillaires se font dans les zones « gap », entre les molécules de collagènes .....	53
Figure 36 : Les cristaux d'hydroxyapatite se forment le long des fibrilles de collagènes.....	53
Figure 37 : la Chondrocalcine est associée à la calcification dans la zone hypertrophique de la plaque de croissance.....	55
Figure 38 : Analyse de la séquence N-terminale de la Chondrocalcine issue du cartilage trachéal ((1) et (2)) et de croissance ((5) et (6)) bovin, avec les propeptides carboxyterminaux des collagènes de type II aviaire (3) et humain (4) .....	56
Figure 39 : Dédifférenciation de chondrocytes primaires humains en culture.....	59
Figure 40 : Les cellules ATDC5 forment de nodules types cartilagineux et minéralisent leur matrice extracellulaire .....	64
Figure 41 : BMP-1 est une enzyme protéolytique qui possède de nombreux substrats.....	68
Figure 42 : Carte du plasmide pHLSec utilisé pour le clonage et l'expression des protéines recombinantes.....	72
Figure 43 : Schéma récapitulant le processus expérimental employé pour la préparation des échantillons issus des cellules cATDC5 et iATDC5.....	79
Figure 44 : Contenu total en ADN mesurée par le dosage de Hoechst des cellules iATDC5 (+) et cATDC5 (-) .....	80
Figure 45 : Les sécrétomes des cellules cATDC5 sont progressivement contaminés par les protéines du sérum, notamment l'albumine .....	82
Figure 46 : Schématisation d'une construction de shARN et représentation de la structure en tige – boucle caractéristique adopté par les shARNs .....	86
Figure 47 : la Chondrocalcine est présente dans le cartilage articulaire, et présente une extractabilité différente de la Chondrocalcine issue du cartilage de croissance. ....	90

Figure 48 : la Chondrocalcine issue du cartilage articulaire subi une maturation protéolytique identique à Chondrocalcine issue du cartilage de croissance.....	91
Figure 49 : la Chondrocalcine existe sous quatre formes distinctes dans le cartilage articulaire. ....	92
Figure 50 : la Chondrocalcine extraite du cartilage articulaire bovin possède une forte affinité pour l'hydroxyapatite .....	93
Figure 51 : L'inhibition pharmacologique de BMP-1 réprime le clivage du C-propeptide du collagène de type I, mais pas du collagène de type II .....	95
Figure 52 : L'inhibition pharmacologique de BMP-1 conduit à l'intégration matricielle de la Chondrocalcine.....	96
Figure 53 : Les cellules ATDC5 produisent une matrice extracellulaire minéralisée, riche en glycosaminoglycanes, tout au long de l'expérimentation .....	99
Figure 54 : Les cellules iATDC5 expriment les ARNm des principaux marqueurs chondrogéniques (COL2A1 et ACAN) et hypertrophiques (COL10A1 et MMP13) tout au long de l'expérience .....	100
Figure 55 : Ontologie des gènes trouvés régulés dans les sécrétomes des cellules iATDC5 v. cATDC5, concentré sur les processus biologiques significativement surreprésentés dans les iATDC5 en cours de différenciation chondrogénique .....	101
Figure 56 : Régulation en fonction du temps des protéines sécrétées par les iATDC5 par rapport aux cATDC5 .....	102
Figure 57 : Etude qualitative du contenu protéique des extraits guanidine obtenus aux temps expérimentaux marquant sur SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie .....	104
Figure 58 : Régulation en fonction du temps des protéines contenues dans les extraits Guanidine issus des cellules iATDC5 par rapport aux cATDC5.....	105
Figure 59 : Schématisation des différents domaines protéiques et porteurs de GAGs de l'aggrécane. G1, G2 et G3 sont les 3 domaines globulaires .....	108
Figure 60 : Examen par SDS-PAGE couplé à une coloration au dMMB du contenu en PGs des extraits guanidine obtenus à partir de cellules iATDC5 aux jours 14 et 35 .....	109
Figure 61 : Nombre de peptides identifiés pour les sept protéines les plus abondantes identifiées dans les extraits CNBr issus des cellules iATDC5 au jour 14.....	110
Figure 62 : Régulation en fonction du temps des protéines contenues dans les extraits CNBr issus des cellules iATDC5 par rapport aux cATDC5 .....	111
Figure 63 : Détails de la régulation en fonction du temps du collagène de type II intégré à la MEC cross-linkée des cellules iATDC5 par rapport aux cATDC5 .....	112
Figure 64 : La maturation C-terminale du procollagène de type II est totale dans les cellules iATDC5.....	113
Figure 65 : Détails de la régulation en fonction du temps du collagène de type II sécrété par les iATDC5 par rapport aux cATDC5 .....	114
Figure 66 : Le $\beta$ APN inhibe complètement les cross-links du collagène .....	116
Figure 67 : L'inhibition de l'activité LOX par le $\beta$ APN n'impacte pas la minéralisation. Des cellules ATDC5 ont été cultivée durant 21 jours en présence (iATDC5) ou en absence (cATDC5) d'insuline, et de $\beta$ APN pour inhiber la formation des cross-links. ....	117
Figure 68 : Les cellules ATDC5 ne sont pas en mesure de produire une matrice extracellulaire minéralisée en l'absence $\beta$ GP, et à 5% CO <sub>2</sub> .....	118
Figure 69 : Modifications post-traductionnelles du collagène de type II synthétisé par les cellules iATDC5.....	120

Figure 70 : Examen de la teneur en protéines de l'extrait CNBr par SDS-PAGE couplé à une coloration de Coomassie .....	121
Figure 71 : Expression de l'ARNm du collagène de type I (COL1A1) au cours de la différenciation chondrogénique des cellules iATDC5 et cATDC5 .....	122
Figure 72 : Séquence primaire de régions sélectionnées des chaînes CO1A1 et CO1A2, montrant les peptides identifiés par spectrométrie de masse aux niveaux des sites de clivage N-terminal et C-terminal .....	123
Figure 73 : Analyse de la maturation du procollagène de type I par western blot des sécrétomes avec un anticorps dirigé contre son C-propeptide .....	123
Figure 74 : Régulation de l'hydroxylation de la triple du collagène de type I dans les cellules iATDC5 comparées à leurs contrôles.....	125
Figure 75 : Régulation de l'hydroxylation de l'ensemble de la triple du collagène de type I dans les cellules iATDC5 comparées à leurs contrôles.....	126
Figure 76 : <i>In cellulo</i> , CPII est maturée à partir de la construction miniprocollagène II.....	129
Figure 77 : <i>In cellulo</i> , le clivage d CPII à partir du mPC2 est dépendant de la BMP-1 .....	130
Figure 78 : la Chondrocalcine, contrairement aux autres C-propeptides des collagènes fibrillaires, ne fixe pas PCPE-1 .....	131
Figure 79 : Séquences de la région ciblée par le sgRNA dans l'exon 2 du gène PCOLCE, codant PCPE-1 .....	132
Figure 80 : Les différents clones obtenus à l'issu de la sélection clonale présentent une grande hétérogénéité .....	133
Figure 81 : L'hydroxylation de la triple hélice est le principal déterminant de l'assemblage du collagène de type I dans la matrice extracellulaire des cellules ATDC5 .....	140

# LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Collagènes et collagènes-like chez les Vertébrés.....	18
Tableau 2 : Distribution des SLRPs dans les tissus et phénotype lié aux collagènes des souris KO. ....	43
Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées et gènes cibles clonés dans le plasmide pHLSec. ....	73
Tableau 4 : Programme de PCR pour l'obtention des amplicons d'intérêt.....	74
Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées et gènes cibles étudiés par PCR quantitative en temps réel. ....	78
Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour la génération de shRNA dirigés contre PCPE-1. ....	85
Tableau 7 : Séquence des ARNs guides utilisés pour la génération de la lignée ATDC5 invalidée pour PCPE-1 par CRISPR – Cas9. ....	87
Tableau 8 : Séquence des amorces utilisées pour l'amplification de la région ciblée par le sgARN.....	88
Tableau 9 : Programme de PCR pour l'amplification de la région ciblée par le sgARN .....	89
Tableau 10 : Trois protéines identifiées et régulées dans le sécrétome des cellules iATDC5 n'ont pas de rôle décrit à ce jour dans la chondrogenèse. ....	103
Tableau 11 : Huit protéines identifiées et régulées dans les extraits guanidines issus des cellules iATDC5 n'ont pas de rôle décrit à ce jour dans la chondrogenèse. ....	107
Tableau 12 : Peptides du collagène de type II murin régulés à la hausse dans l'extrait guanidine des cellules iATDC5 v. cATDC5. ....	115



# SOMMAIRE

---

LISTE DES ABBREVIATIONS .....	
LISTES DES FIGURES.....	
LISTE DES TABLEAUX.....	
SOMMAIRE .....	
AVANT-PROPOS .....	1
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	6
1.1. LES MATRICES EXTRACELLULAIRES .....	6
1.1.1. Homéostasie et composition physiologique .....	8
1.1.1.1. Les Protéoglycanes .....	8
1.1.1.2. Les protéines fibreuses.....	9
1.1.1.2.1. Fibronectine .....	9
1.1.1.2.2. Elastine .....	9
1.1.1.3. Les protéines matricellulaires, matrikines et matricryptin.....	10
1.1.1.4. Homéostasie et cycle circadien .....	11
1.1.2. Quand les MEC vont mal .....	11
1.1.2.1. Fibrose.....	11
1.1.2.2. Cancers.....	13
1.1.2.3. Vieillessement .....	15
1.2. LES COLLAGENES.....	18
1.2.1. Des briques élémentaires à la construction des métazoaires.....	18
1.2.2. Les évènements clefs de la maturation des collagènes fibrillaires dans le contrôle du phénotype tissulaire sain et pathologique .....	21
1.2.2.1. Modifications post-traductionnelles des prolines .....	21
1.2.2.2. Sélection des chaînes polypeptidiques dans le RE.....	23
1.2.2.3. Des chaperonnes pour assurer le repliement.....	25
1.2.2.4. Modifications post-traductionnelles intracellulaires des lysines .....	26

1.2.2.5.	Trafic intracellulaire jusqu'au Golgi.....	28
1.2.2.6.	Clivage proéololytique des propeptides.....	29
1.2.2.7.	Modifications post-traductionnelles extracellulaires des lysines.....	33
1.2.2.8.	Les fibripositeurs, des structures dédiées à l'export des molécules de collagène vers le milieu extracellulaire.....	36
1.2.3.	Structure et assemblage des fibrilles de collagène .....	37
1.2.3.1.	Croissance des fibrilles de collagène .....	38
1.2.3.2.	Contrôle extrinsèque de l'assemblage des fibrilles de collagène.....	40
1.2.3.2.1.	Contrôle par d'autres types de collagènes : le rationnel des hétérofibrilles.....	40
1.2.3.2.2.	Contrôle par les proteoglycanes .....	42
<b>1.3.</b>	<b>MATRICES EXTRACELLULAIRES DES TISSUS MINERALISES .....</b>	<b>45</b>
1.3.1.	Ossification endochondrale .....	45
1.3.2.	Régulation de la phase minérale.....	47
1.3.2.1.	Phosphate et pyrophosphate inorganiques .....	47
1.3.2.2.	Perte de l'équilibre Pi/PPi .....	49
1.3.3.	Régulation de la minéralisation par les protéoglycanes .....	49
1.3.4.	Régulation de la minéralisation par les protéines non-collagéniques .....	51
1.3.5.	Régulation de la minéralisation par les collagènes .....	52
1.3.5.1.	Cross-links des collagènes et minéralisation .....	54
1.3.5.2.	Maturation protéolytique des collagènes et minéralisation : implication de la Chondrocalcine .....	54
<b>1.4.</b>	<b>A LA RECHERCHE D'UN MODÈLE D'ASSEMBLAGE DES MATRICES EXTRACELLULAIRES.....</b>	<b>57</b>
1.4.1.	Modèles <i>in vitro</i> .....	57
1.4.2.	Modèles cellulaires.....	58
1.4.3.	Modèles <i>ex vivo</i> et culture d'explant.....	60
1.4.4.	Modèles animaux et <i>in vivo</i> .....	61
1.4.5.	Le choix du bon modèle .....	61
1.4.6.	Le modèle cellulaire ATDC5 .....	63
<b>2.</b>	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE ET DESIGN DE L'ETUDE.....</b>	<b>66</b>

3.	PROCEDURE EXPERIMENTALE .....	69
3.1.	ETUDE DES MECANISMES DE CLIVAGE DES C-PROPEPTIDES DES COLLAGENES FIBRILLAIRES DE TYPE I ET II .....	69
3.1.1.	Etude <i>in vivo</i> du site de clivage de la Chondrocalcine .....	69
3.1.1.1.	Extraction et purification de la Chondrocalcine .....	69
3.1.1.2.	Préparation des échantillons .....	69
3.1.1.3.	Electrophorèse bidimensionnelle .....	70
3.1.2.	Etude <i>in cellulo</i> du mécanisme de clivage de la Chondrocalcine .....	70
3.1.2.1.	Obtention des tissus et culture primaire .....	70
3.1.2.2.	Traitement pharmacologique .....	71
3.2.	ETUDE DES PARTENAIRES PROTEIQUES ET DU CLIVAGE DES C- PROPEPTIDES DES PRINCIPAUX COLLAGENES FIBRILLAIRES .....	72
3.2.1.	Construction des plasmides d'expression par recombinaison homologue codants les « appâts » recombinants étiquetés .....	72
3.2.1.1.	Extraction d'ARN et transcription inverse .....	73
3.2.1.2.	Amplification des séquences codantes de CPI, CPI et MATN3.....	73
3.2.1.3.	Recombinaison homologue.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3.2.2.	Transfections transitoires de cellules ATDC5 pour l'expression des « appâts »	74
3.2.3.	Pull down de l'interactome .....	75
3.2.4.	Western Blot.....	75
3.3.	CARACTERISATION PROTEOMIQUE EXHAUSTIVE DU MODELE CELLULAIRE DE CHONDROGENESE ATDC5 .....	76
3.3.1.	Culture cellulaire .....	76
3.3.2.	Design de l'étude.....	76
3.3.3.	Etudes histologique de la différenciation et de la minéralisation.....	77
3.3.4.	Dosage du contenu en ADN par le dosage de Hoechst.....	77
3.3.5.	Extraction d'ARN et transcription reverse.....	77
3.3.6.	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel.....	78
3.3.7.	Fractionnement protéique.....	78
3.3.8.	Normalisation des échantillons pour l'analyse protéomique .....	79
3.3.9.	Préparation des échantillons pour l'analyse protéomique.....	80
3.3.10.	Nano-HPLC setup pour investigations protéomique.....	81
3.3.11.	Quantification relative des peptides par LC-MALDI label-free .....	81

3.3.12.	Identifications des peptides, PTM et protéines.....	82
3.3.13.	Calcul du ratio de régulation protéique et interprétation statistique.....	82
3.3.14.	Analyse par Western blot .....	83
3.3.15.	Analyse par SM des bandes de gel polyacrylamide .....	83
3.3.16.	Analyse bioinformatique d'ontologies des gènes.....	84
3.3.17.	SDS-PAGE et coloration des gels .....	84
3.4.	<b>CARACTERISATION DU ROLE DE CPII DANS LA MINERALISATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE CARTILAGINEUSE.....</b>	<b>85</b>
3.4.1.	Invalidation des cellules ATDC5 pour PCPE-1 par des shARNs .....	85
3.4.1.1.	Design et clonage des shARNs .....	85
3.4.1.2.	Génération de lentivirus .....	86
3.4.1.3.	Détermination du MOI.....	86
3.4.1.4.	Infection des cellules ATDC5 cibles et sélection clonale.....	87
3.4.2.	Invalidation des cellules ATDC5 pour PCPE-1 par la technologie CRISPR – Cas9.....	87
3.4.2.1.	Design et clonage des ARNs guides .....	87
3.4.2.2.	Transfection des cellules ATDC5 et sélection clonale .....	88
3.4.2.3.	Génotypage des clones KO PCPE-1 obtenus par la technologie CRIPR – Cas9.....	88
4.	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>90</b>
4.1.	<b>CARACTERISATION DES SITES DE CLIVAGE DE la Chondrocalcine.....</b>	<b>90</b>
4.1.1.1.	<i>In vivo</i> , la Chondrocalcine est une protéine du cartilage de croissance et du cartilage articulaire .....	90
4.2.	<b>CARACTERISATION PROTEOMIQUE DU MODELE CELLULAIRE.....</b>	<b>99</b>
<b>ATDC5 .....</b>	<b>99</b>	
4.2.1.	Caractérisation phénotypique des cellules ATDC5 .....	99
4.2.1.1.	Confrontation des résultats préliminaires avec la littérature.....	99
4.2.1.2.	L'analyse du secretome des cellules iATDC5 confirme leur phénotype chondrogénique.....	100
4.2.1.3.	Les extraits guanidine mettent en évidence la composition de la MEC des ATDC5 .....	104

4.2.1.4.	Les extraits guanidine montrent que les iATDC5 accumulent de l'agrécané mûré dans leur MEC. ....	108
4.2.1.5.	L'analyse des extraits CNBr révèle la composition de la MEC des iATDC5.....	110
4.2.2.	Caractérisation des modifications post-traductionnelles du collagène de type II produit par les cellules ATDC5.....	112
4.2.2.1.	Le clivage protéolytique du procollagène de type II est total dans les cellules iATDC5. ....	112
4.2.2.2.	Chondrocalcine est intégrée à la MEC non cross-linkée dans les cellules iATDC5.....	114
4.2.2.3.	Le $\beta$ APN inhibe complètement la formation des cross-links au sein de la MEC, mais n'a aucun effet sur la minéralisation.....	116
4.2.2.4.	Les cellules iATDC5 ne minéralisent pas en absence de $\beta$ GP, dans nos conditions d'expérimentation.....	117
4.2.2.5.	Le profil des MPTs du collagène de type II dans le modèle ATDC5 est similaire à celui décrit <i>in vivo</i> . ....	119
4.2.3.	Régulation de l'assemblage des collagènes dans la MEC des cellules iATDC5.....	121
4.2.3.1.	La synthèse du collagène de type I est régulée à de multiples niveaux dans les cellules ATDC5. ....	121
4.2.3.2.	L'accumulation de collagènes dans les cellules ATDC5 dépend en premier lieu de l'hydroxylation de la triple hélice. ....	124
4.3.	<b>CARACTERISATION DU ROLE DE PCPE-1 DANS LA MATURATION DES C-PROPEPTIDES DES PRINCIPAUX COLLAGENES FIBRILLAIRES DANS LE MODELE CELLULAIRE ATDC5</b> .....	128
4.3.1.	<i>In cellulo</i> , la Chondrocalcine ne recrute pas PCPE-1 .....	128
4.3.2.	Mise en place d'une lignée invalidée pour PCPE-1 .....	131
5.	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	134
6.	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	
7.	<b>ANNEXE</b> .....	



# AVANT-PROPOS

---

L'ensemble de toutes les protéines possibles exprimées par toutes les espèces vivantes ou ayant vécu sur Terre est appelé "L'Univers protéine". La taille de cet univers, autrement dit, le nombre total de séquences polypeptidiques possibles, semble alors infini. Pourtant, la Nature a préféré sélectionner au cours de l'évolution un nombre restreint de motifs. Parmi eux, la triple-hélice de collagène. Impliquée dans l'oligomérisation des protéines, elle permet non seulement d'obtenir une résistance accrue à l'activité des protéases, mais offre également une plateforme d'interaction pour une pléthore de partenaires permettant la formation de réseaux supramoléculaires multivalents [2].

La triple hélice de collagène est l'un des nombreux domaines protéiques apparus au cours de l'évolution des métazoaires ayant permis une complexité croissante des organismes [3]. Les matrices extracellulaires (MEC; qui comprennent les **membranes basales**<sup>1</sup> et les matrices interstitielles) et leurs collagènes, auraient en effet joué un rôle majeur dans la transition des organismes unicellulaires vers les organismes pluricellulaires, en fournissant une charpente favorable à l'adhésion cellulaire, à la transduction du signal et au contrôle de l'homéostasie des néo-tissus [4,5]. Le collagène de type IV (Col IV) qui est un composant majeur des membranes basales des animaux actuels, présente une grande conservation à travers le règne animal et serait le premier collagène apparu dès le stade unicellulaire [6], peut-être même avant la divergence avec les champignons [7]. Dès lors, les collagènes auraient participé à de nombreuses **innovations fonctionnelles**<sup>2</sup> au cours de l'Histoire de l'évolution. Stephen J. Gould décrit en 1982 le concept de cooption (ou exaptation), qui consiste en un changement de fonction d'un caractère au cours de l'évolution. Un trait sélectionné pour fournir un avantage sélectif pourrait par la suite servir une autre fonction. Dans le cas des organismes vertébrés, les collagènes auraient été cooptés au cours d'au moins trois évènements majeurs : l'apparition de la **notochorde**<sup>3</sup>, du cartilage [8], puis des os minéralisés. Le tissu osseux serait ainsi initialement apparu en tant que tissu permettant le stockage du phosphate nécessaire à l'activité métabolique, et n'aurait que bien plus tard évolué dans sa fonction de support et de charpente de l'organisme

---

<sup>1</sup> Matrice extracellulaire doublant un épithélium, le séparant ainsi des tissus conjonctifs sous-jacents

<sup>2</sup> Caractère phénotypique fixé dans une population ou une espèce et qui va se révéler avantageux vis-à-vis de la sélection naturelle

<sup>3</sup> Issue du mésoderme axial, structure embryologique spécifique de l'embranchement des Chordés (Chordata), baguette rigide mais flexible entre le tube neural et le tube digestif fournissant un axe squelettique central à l'embryon au cours de son développement.

que nous lui connaissons aujourd'hui. 90% des stocks en phosphore du corps humain sont en effet présent dans la phase inorganique osseuse [9]. Il est à noter que les collagènes ayant à plusieurs reprises été cooptés, la fonction initiale pour laquelle ils avaient été sélectionnés a pu disparaître. A l'inverse, de nouvelles fonctions non décrites jusqu'alors pourraient être identifiées dans les prochaines années.

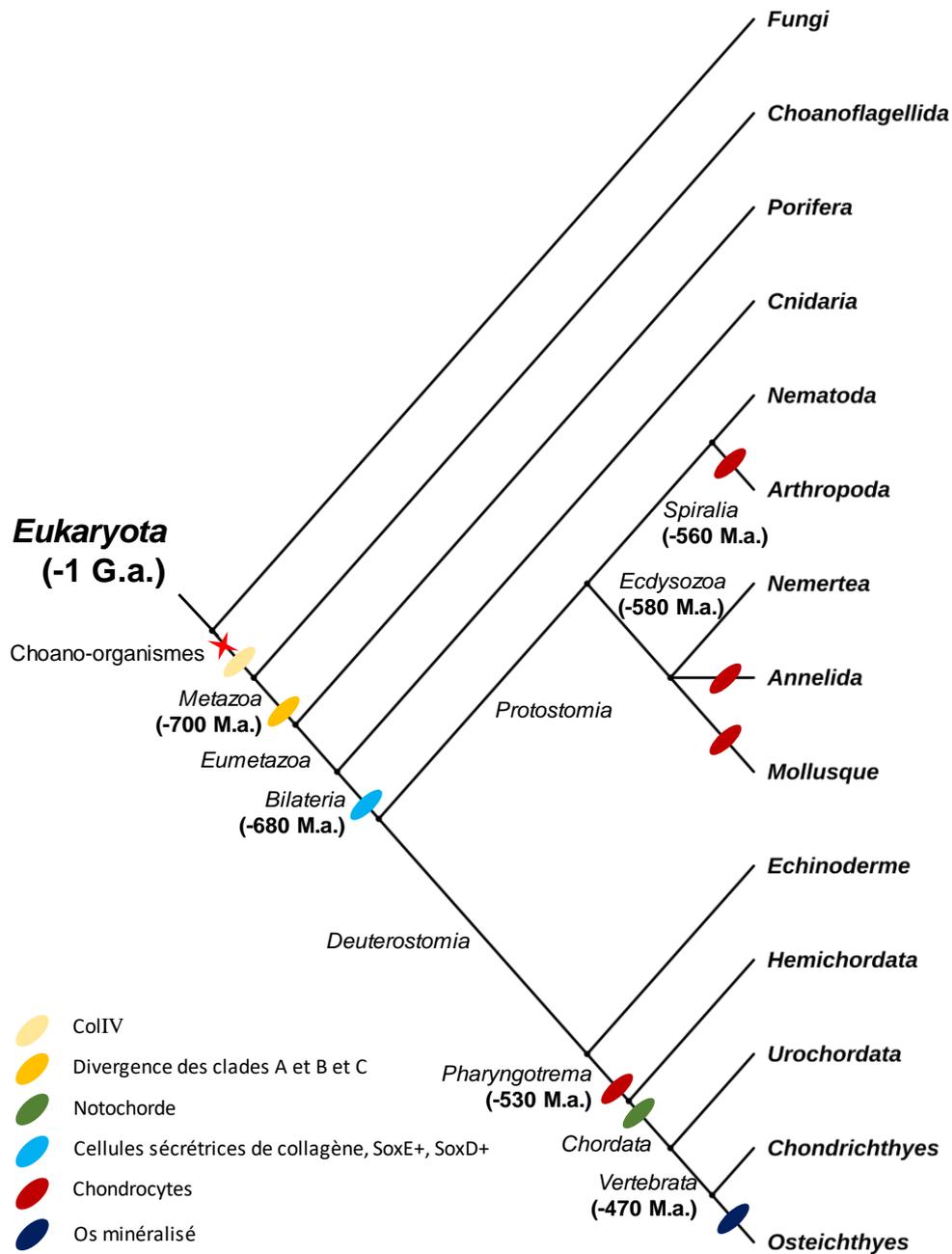


Figure 1 : Innovations évolutives apparues dans le règne animal et aboutissant à l'émergence du tissu osseux. Certains embranchements de cet arbre phylogénétique du règne animal ont volontairement été omis afin de simplifier le raisonnement. Basé sur la taxonomie selon G. Lecointre et H. Le Guyader, 2001. L'étoile rouge à quatre branches indique la position de l'Urmetazoa, le dernier ancêtre commun hypothétique à l'ensemble du règne animal. Les ellipses de couleur représentent les innovations évolutives marquantes ayant permis l'émergence du tissu osseux. M.a. : million d'années. G.a. : milliard d'années. Arbre réalisé à l'aide de l'outil en ligne iTOL Interactive Tree of Life [10]

Par ailleurs, l'émergence précoce de cellules exprimant un programme génétique favorable à la chondrogenèse (cellules notamment sécrétrices de collagènes ; [8]) a permis l'apparition du cartilage plusieurs fois et de manière indépendante au cours de l'évolution, dans des branches distinctes de l'arbre du Vivant (Figure 1 ; [11]). Cet événement d'évolution parallèle est observable quand une structure ancestrale subit une suite de modifications semblables dans plusieurs lignes de descendance [12].

La récente mise en évidence de la transdifférenciation d'une sous-population de chondrocytes hypertrophiques en ostéoblastes, qui échappent ainsi à l'apoptose, durant l'ossification enchondrale [13–15] a rouvert un débat de plus de cent ans sur l'origine évolutive de l'histogenèse du tissu squelettique. Cervantes-Diaz et al. proposent deux hypothèses. Dans la première, la capacité des chondrocytes hypertrophiques à se transdifférencier serait une **synapomorphie**<sup>4</sup> propre aux **ostéichthyens**<sup>5</sup>, contribuant ainsi à la mise en place des os spongieux remplaçant le cartilage calcifié. La seconde hypothèse suppose que l'ossification endochondrale tire son origine d'un phénomène d'invasion des ostéoblastes du périoste, répondant à un besoin de renforcement des tissus osseux par des forces mécaniques accrues au cours de la terrestrialisation [16,17]. Bien que de récentes analyses de génétique moléculaire laissent à penser que l'émergence des ostéoblastes impliquerait la cooption d'un réseau de gènes régulateurs (*GRN – gene regulatory network*) originellement retrouvé chez les chondrocytes [18], à ce jour, les nombreuses données de paléontologie, d'anatomie comparative et d'embryologie, ne sont pas à même de déterminer qui, du cartilage mature hypertrophique ou de l'os, a fait immédiatement suite à l'apparition du cartilage immature.

En outre, la structure exon-intron de la région codant la triple hélice des collagènes fibrillaires présente une grande conservation à travers le règne animal, suggérant une forte pression de sélection préservant à la fois la taille, et la répétition du triplet d'acides aminés Gly-Xaa-Yaa nécessaire à la fibrillogenèse. Le domaine hélicoïdal des collagènes fibrillaires des Vertébrés, est codé par des exons dont la taille est un multiple de 54 ou 45 pb (paire de bases) exactement. Cette observation a permis la mise en évidence d'un gène ancestral qui aurait été exprimé chez l'hypothétique dernier ancêtre commun à tous les animaux, l'Urmetazoaire [19]. A l'origine, existait une unité génomique primordiale, un exon de 54 pb, codant une répétition de six triplets Gly-Xaa-Yaa. Dupliqué et associé à un événement de crossing-over inégal, il aurait

---

<sup>4</sup> Caractère dérivé

<sup>5</sup> Un clade dont le caractère dérivé propre est l'os enchondrale, ou "vrais os", en opposition au cartilage calcifié des chondrichthyens

permis l'obtention d'un module de (54 + 45) pb. Exposito et al. suggèrent donc que le gène ancestral aux collagènes fibrillaires tient son origine d'une amplification de cet exon initial et du module de (54 + 45) pb (Figure 2 ; [20]).

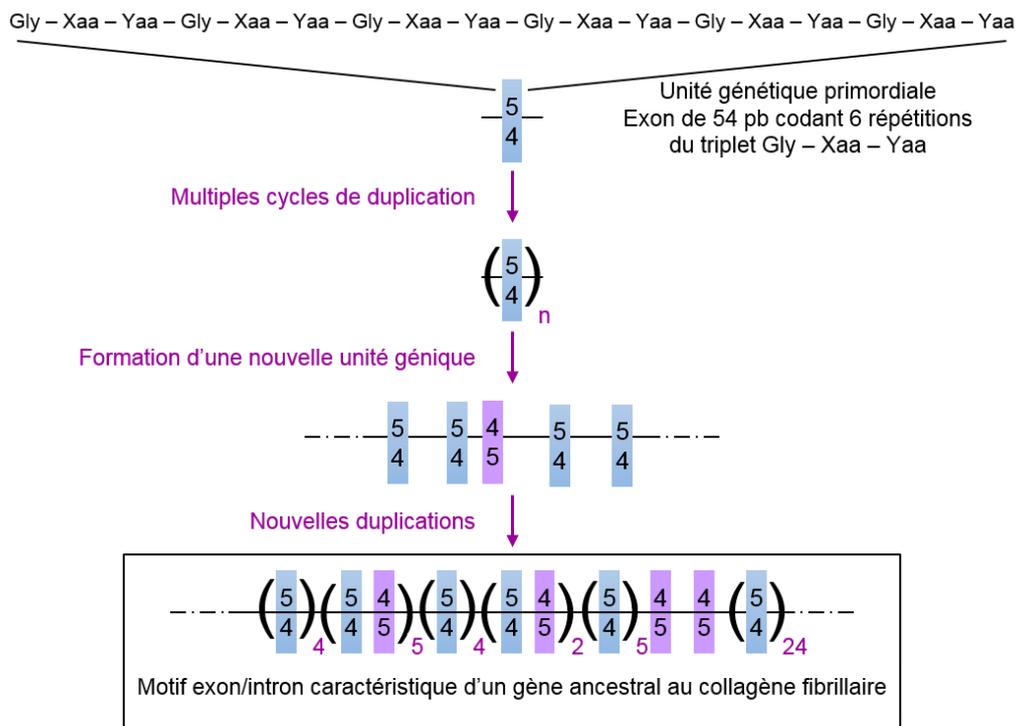


Figure 2 : Etapes hypothétiques menant à la formation d'un gène ancestral des collagènes fibrillaires. Adapté de [21]

Un point de divergence subsiste cependant : la séquence primaire en acides aminés des collagènes fibrillaires des Vertébrés diverge de celles des autres animaux. Elle possède une séquence d'environ 7 résidus supplémentaire au niveau du propeptide carboxy-terminal, dans la région codant le domaine de sélection et de trimérisation des chaînes polypeptidiques. Il a été suggéré que cette séquence additionnelle conférerait un avantage lors de la sélection des chaînes pour la formation du trimère, puisque de nombreux collagènes peuvent être exprimés à un même moment au sein d'une même cellule [22]. Il ne semble cependant pas exister de relation entre la complexité de l'organisme et le nombre de collagènes qu'il exprime : *Caenorhabditis elegans*, un petit nématode de la famille des *Rhabditidae*, transparent, d'environ un millimètre pour un total de 959 cellules exactement pour la forme hermaphrodite, et 1031 pour le mâle [23], possède au moins 150 gènes codant des collagènes exprimés au

niveau de la **cuticule** <sup>6</sup> [24]. En comparaison, le génome humain permet l'expression de 28 types de collagènes différents, codés par 42 gènes [25]. L'évolution est ainsi faite, qu'au sein de toute la diversité d'organismes vivants, des exceptions existent toujours. Bien qu'ils apparaissent comme essentiels, les collagènes fibrillaires ne sont ainsi pas retrouvés partout dans le règne animal. En effet, bien que la drosophile et le ver *C.elegans* expriment des collagènes, ils ne forment pas de fibrilles [26]. La résistance mécanique dont ont besoin l'exosquelette de la drosophile et la cuticule du ver leurs serait alors apportée par la chitine et les (très) nombreux collagènes non-fibrillaires, qui les composent, respectivement.

---

<sup>6</sup> Exosquelette synthétisé par l'hypoderme sous-jacent

# 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1. LES MATRICES EXTRACELLULAIRES

Les MECs sont la composante acellulaire de tous les tissus et organes. Elles fournissent non seulement un support physique essentiel aux constituants cellulaires, mais initient et transduisent également des signaux biochimiques et biomécaniques nécessaires à la morphogenèse, à la différenciation et à l'homéostasie [27]. Les MECs sont à l'origine des caractéristiques biomécaniques et biochimiques de chaque organe, tels que la résistance à la traction et à la compression ou l'élasticité, et interviennent également dans le maintien de l'homéostasie extracellulaire par une action tampon et de rétention d'eau. Ce sont près de 300 protéines qui constituent le noyau principal du matrisome, avec notamment les 43 sous-unités de collagène, 36 protéoglycanes (PG) différents et plus de 200 glycoprotéines [28].

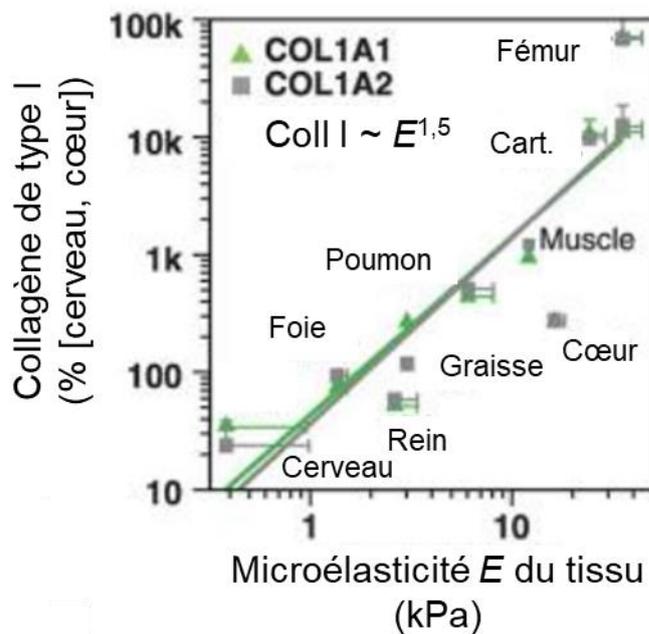
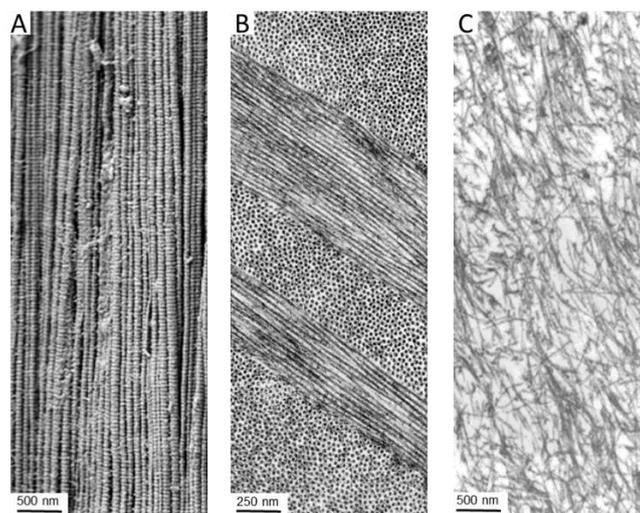


Figure 3 : Le contenu en collagène de type I détermine la rigidité tissulaire. Des analyses de protéomique quantitative de différents échantillons humain et murins (tissus et cellules) ont révélé la relation entre leur micro élasticité E et le contenu en collagène (déterminé sous forme du ratio stœchiométrique collagène de type I : peptide de lamine) [29].

Les spécificités de chaque MEC seront essentiellement dues à la composition et à la topologie unique adoptée par ces différentes protéines, PG et glycoprotéines, et ce, de manière totalement dédiée au tissu qu'elles composent. Les propriétés biochimiques et biomécaniques, protectrices et organisationnelles des MECs varient énormément d'un tissu donné à l'autre (poumons, peau ou os), au sein d'un tissu (par exemple, cortex rénal versus médullaire rénale), ainsi que d'un état physiologique à un autre (normal versus cancéreux). Ainsi, la teneur en collagènes au sein d'un tissu donné est directement liée à ses propriétés mécaniques, et variera donc entre chaque organe (Figure 3). Ainsi, au contraire des tissus mous, tels que le cerveau ou les reins, les tissus les plus rigides comme les os sont particulièrement riches en collagène de type I (Col I), le plus abondant des collagènes chez les Vertébrés [29].

Les collagènes sont également régulés de manière tissu-dépendant dans leur assemblage. Une véritable hiérarchie structurale est mise en place, s'étendant depuis l'échelle de la molécule de collagène, qui s'assemblent en fibrilles, elles-mêmes regroupées en un réseau de faisceaux (ou fibres) pouvant contenir de plusieurs centaines à des milliers de fibrilles. Le diamètre des fibrilles, la fraction du tissu qu'elles occupent et leur disposition dans l'espace, dépendent du tissu et du stade de développement [30].



*Figure 4 : Observation par microscopie électronique à balayage de l'organisation spatiale tissu – spécifique des fibres de collagène de type I dans (A) le ligament mature de rat ou (B) la cornée du singe (source : <http://www.drjastrow.de/WAI/EM/EMKollagenE.html> - consultée le 07/08/2019) et des fibres de collagènes de types II dans (C) le cartilage articulaire humain mature (source : <http://arthritis-research.com/content/4/1/30/figure/f1?highres=y> – consultée le 07/08/2019).*

Ainsi, dans les tendons et ligaments embryonnaires, les fibrilles (de diamètre compris entre 30 et 35 nm) sont disposées en faisceaux parallèles et alignées le long de l'axe du tissu (Figure

4.A). Bien que l'alignement parallèle soit maintenu dans le tendon adulte, les fibrilles grossissent en diamètre afin d'accroître la rigidité mécanique et la résistance. Au niveau de la cornée, les fibres de collagènes organisées en couches successives et perpendiculaires, maintiennent une distribution uniforme de leur diamètre et une disposition spatiale optimale jusqu'à maturité, préservant ainsi la transparence optique du tissu (Figure 4. B). Enfin, dans le cartilage articulaire, les fibres de collagène de type II (Col II), sont courtes et fortement ramifiées, formant un véritable maillage conférant au tissu sa résistance aux forces de compression ([31] - Figure 4.C). Par conséquent, au-delà de la composition biochimique, l'organisation tridimensionnelle joue un rôle primordial dans la détermination des propriétés tissulaires. Les MECs peuvent en effet diriger la morphogenèse tissulaire et la fonction physiologique en interagissant notamment avec les récepteurs de surface des cellules, telles que les intégrines [32], et les syndécans [33,34]. L'adhésion cellulaire induit le couplage du cytosquelette à la MEC, déclenchant alors la transduction d'un signal régulateur de l'expression génique, conduisant par exemple à la migration cellulaire à travers la MEC [35].

### **1.1.1. Homéostasie et composition physiologique**

Les MECs sont des structures très dynamiques, en constant remodelage, que ce soit par voie enzymatique ou non-enzymatique, et ses composants moléculaires sont soumis à une myriade de modifications post-traductionnelles. Les MECs sont essentiellement composées de deux grandes classes de macromolécules : les PG, et les protéines fibreuses, notamment des collagènes, l'élastine, la fibronectine et des laminines.

#### *1.1.1.1. Les Protéoglycanes*

Les PG occupent la majorité de l'espace interstitiel extracellulaire des tissus sous forme d'un hydrogel. Leurs propriétés uniques de tamponnage, d'hydratation, de liaison et de résistance aux forces mécaniques leur confèrent une large variété de fonctions. Par exemple, au niveau rénal, le perlécan aurait un rôle dans la filtration glomérulaire [36], alors que la décorine, le biglycan et le lumican s'associent aux fibres de collagène dans les tissus épithéliaux canaux et génèrent un réseau supramoléculaire essentielle aux propriétés mécaniques du tissu.

Les PG sont composés de chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) liées de manière covalente à une protéine cœur (à l'exception de l'acide hyaluronique) [37]. Les PG sont classés en trois familles principales en fonction de leur protéine cœur, de leur localisation et de leur composition en GAG : les petits PGs riches en leucine (SLRP), les PGs modulaires et les PGs de surface cellulaire. Les GAGs sont des chaînes de polysaccharides non ramifiées et

composées d'unités disaccharidiques répétées [*N*-acetylglucosamine sulfaté ou non, acide *D*-glucuronic ou *L*-iduronic et galactose ( $-4$  *N*-acetylglucosamine- $\beta$ 1,3-galactose- $\beta$ 1)] pouvant être subdivisée en GAGs sulfaté (chondroïtine sulfate, héparane sulfate et kératane sulfate) et non sulfatés (acide hyaluronique) [38]. Ces molécules sont extrêmement hydrophiles et, en conséquence, adoptent des conformations très étendues essentielles à la formation d'hydrogel et permettent notamment aux MEC de résister à des forces de compression élevées.

#### *1.1.1.2. Les protéines fibreuses*

Les protéines fibreuses, sont par définition, des protéines pouvant s'assembler en fibres et former de larges réseaux macromoléculaires jouant essentiellement un rôle structural dans les tissus. Les collagènes, qui, quantitativement sont les plus importantes des protéines fibreuses, font l'objet d'une revue plus exhaustive dans ce manuscrit (§II).

##### *1.1.1.2.1. Fibronectine*

La fibronectine (FN) est largement exprimée par de multiple types cellulaires et joue un rôle critique dans le développement des Vertébrés, comme le montre la létalité précoce embryonnaire dans des souris déficientes [39]. La FN est sécrétée sous forme d'un dimère lié par deux liaisons disulfures au niveau C-terminal et possède plusieurs sites de liaison à d'autres dimères de FN, aux collagènes, à l'héparine et également aux récepteurs de surface cellulaire telles que les intégrines [40]. La liaison à ces dernières est essentielle pour permettre la fibrillogenèse des molécules de FN. De surcroît, la contraction du cytosquelette d'actomyosine conduit à l'augmentation locale de la concentration en intégrine à la surface des cellules, et favorise ainsi l'assemblage de fibrilles de FN [41]. La FN participe étroitement à l'organisation de la MEC en tant que mécano-régulateur extracellulaire. Elle peut en effet être étirée sur plusieurs fois sa longueur au repos par des forces de traction cellulaires, exposant alors des sites de liaison aux intégrines camouflés jusqu'alors [42].

##### *1.1.1.2.2. Elastine*

Les fibres d'élastine, comme leur nom l'indique, fournissent l'élasticité et le recul nécessaire aux tissus subissant des étirements répétés (systèmes sanguin et pulmonaire, et ligaments notamment). L'assemblage en fibres fortement réticulées les unes aux autres se fait par la formation de cross-links entre les résidus lysines, sous l'action des enzymes de la famille des lysyl oxydase (LOX - [43]). Collagènes et élastine sont stabilisés par ces cross-links enzymatiques. Cependant, dans les fibres d'élastine, leur fonction est de limiter les étirements excessifs, tandis que dans le cas des collagènes, ils agissent en rendant les fibrilles pratiquement

inextensibles [44]. Les fibres d'élastine peuvent s'assembler avec d'autres microfibrilles de glycoprotéines, principalement des fibrillines qui sont essentielles à l'intégrité de la fibre d'élastine, ou de collagène, mais qui limite alors considérablement leurs propriétés d'étirement. Assemblées très précocement dès le développement embryonnaire, les fibres d'élastine ont une remarquable stabilité et présentent un renouvellement très faible, voire inexistant. Chez l'adulte, les fibres élastiques endommagées sont souvent mal réparées, et leur fonction est altérée [45].

#### 1.1.1.3. *Les protéines matricellulaires, matrikines et matricryptin*

Au sein des MEC résident de nombreuses protéines qui ne sont pas des éléments structurels, notamment les thrombospondines-1 et -2, SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*), la tenascin-C et -X et l'ostéopontine (OPN). Ces protéines dites matricellulaires sont exprimées à un fort niveau durant le développement ou en réponse à une blessure et modulent les interactions cellules - MEC et certaines fonctions cellulaires, telles que la réparation des tissus [46].

Dans certains cas, les fragments protéolytiques d'une protéine structurelle de la matrice, peuvent remplir des fonctions différentes de leur protéine parent, notamment *via* l'interaction avec des récepteurs spécifiques : ce sont les matrikines [47]. C'est notamment le cas des collagènes dont les produits de clivage carboxy-terminaux remplissent des fonctions diverses : l'endostatine, issue du collagène de type XVIII (Col XVIII), présente des propriétés anti-angiogéniques puissantes par inhibition spécifique de la prolifération endothéliale [48]. Le propeptide carboxy-terminal du collagène de type II (CPII) jouerait un rôle dans la dégradation du cartilage articulaire *via* un mécanisme dépendant de l'interleukine-1 $\beta$ , après internalisation par les chondrocytes [49] ou dans l'angiogenèse, de concert avec le propeptide carboxy-terminal du collagène de type I (CPI) [50]. En outre, le tripeptide PGP issus des collagènes serait impliqué dans la réponse inflammatoire lors d'une lésion des tissus, notamment au cours de la première étape de recrutement des neutrophiles [47].

Le terme matricryptine désigne des fragments de protéines des MEC portant une activité enzymatique au niveau d'un site cryptique [51,52]. Ces sites sont exposés suite à une dégradation enzymatique, une multimérisation, une dénaturation ou suite à des forces mécaniques exercées par les cellules environnantes, telle que la FN qui révèle des sites d'adhésion une fois étirée [42]. Ainsi, les collagènes disposent de différents sites RGD qui ne sont accessibles qu'après dégradation enzymatique par des métalloprotéinases matricielles (MMP), et qui vont médier l'adhésion cellulaire *via* l'intégrine  $\alpha\beta3$ .

#### *1.1.1.4. Homéostasie et cycle circadien*

Les collagènes disposent d'une remarquable stabilité. Synthétisés au cours de l'embryogenèse [53] et durant la croissance (Figure 9. A), ils persistent dans les tissus sains toute la vie sans se renouveler. Des données indiquent en effet que le *turnover* des collagènes, chez l'Homme, atteindrait 15 ans dans la peau [54], et jusqu'à 200 ans au niveau des disques intervertébraux [55] contre 12 ans pour l'agrécan [56] dans ce même tissu. Leur nature immuable contraste avec les mécanismes homéostatiques classiques qui remplacent les protéines endommagées par de nouvelles copies, ainsi qu'avec la synthèse persistante observée des collagènes à l'âge adulte. Par ailleurs, leur renouvellement quasi inexistant soulève des questions intrigantes sur la manière dont le réseau de collagène se maintient au cours de la vie malgré d'innombrables cycles de charges et de stress mécaniques.

L'étude de la régulation des MEC par le cycle circadien n'en est qu'à ses premiers pas, cependant elle a déjà permis de réconcilier ces deux dogmes. En effet, il a été mis en évidence chez la souris que le transport, l'assemblage et la dégradation des collagènes, suivent une expression rythmique séquentielle dépendante de l'horloge circadienne. Ainsi, il en résulte la néosynthèse nocturne d'un pool de collagène « sacrificiel », l'assemblage diurne de fibrilles de collagène et le maintien de l'homéostasie par la dégradation rythmique par la Cathepsin K (CTSK) qui présente une forte activité collagénase. Ce cycle circadien ne concernant qu'une fraction très limitée de l'ensemble des collagènes assemblés dans la MEC, permet le maintien du réseau de collagène persistant [57,58].

#### **1.1.2. Quand les MEC vont mal**

L'importance des MECs est illustrée de manière frappante par le large éventail de syndromes à faible prévalence résultant d'anomalies génétiques dans les protéines qui les composent [59], ou au contraire, dans les pathologies à forte prévalence telles que fibroses et cancers. En outre, le vieillissement normal du sujet sain conduit à l'accumulation de protéines altérées et est également caractérisé par des défauts des MECs.

##### *1.1.2.1. Fibrose*

Dans le cas d'une atteinte à l'intégrité d'un tissu, la machinerie fibrogénique induit la cicatrisation (Figure 5). Ce processus physiologique est caractérisé par l'infiltration des neutrophiles et des monocytes sur le site de la lésion, recrutés par chimiotactismes des matricryptines libérées lors de l'atteinte tissulaire [47]. La différenciation rapide des monocytes en macrophages [60] va conduire à la sécrétion de facteurs de croissance, de MMPs et de

cytokines, qui favorisent l'angiogenèse et stimulent la migration des fibroblastes et leur prolifération [61], afin qu'ils déposent en grande quantité des protéines de la MEC, notamment Col I et collagène de type III (Col III), FN et acide hyaluronique. Dans un tissu sain, une fois la plaie réparée, un retour strict à l'état basal est mis en place pour assurer la restauration de l'homéostasie des tissus et la résolution de la fibrose.

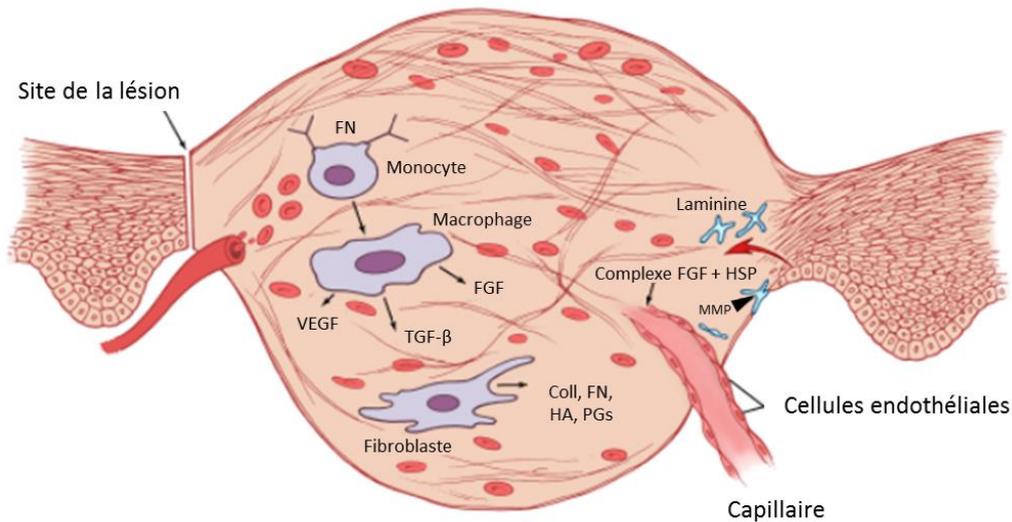


Figure 5 : Implication des facteurs de croissance lors de la cicatrisation. Les monocytes migrant sur le site de la lésion, et se fixe à FN (fibronectine), permettant leur différenciation en macrophage sécrétant de multiples facteurs de croissance. Le TGF- $\beta$  (transforming growth factor –  $\beta$ ) va stimuler la production d'une MEC (matrice extracellulaire) riche par les fibroblastes. En parallèle, le complexe FGF (fibroblast growth factor) – HSP (heparan sulfate porteoglycans) induit la migration des cellules endothéliales. Alors que les matrikines issues du clivage des lamines par des MMPs (matrix metalloproteinases) induit la migration des fibroblastes. Coll : collagènes ; HA : acide hyaluronique ; PGs : protéoglycans ; VEGF : vascular endothelial growth factor. Adapté de [61].

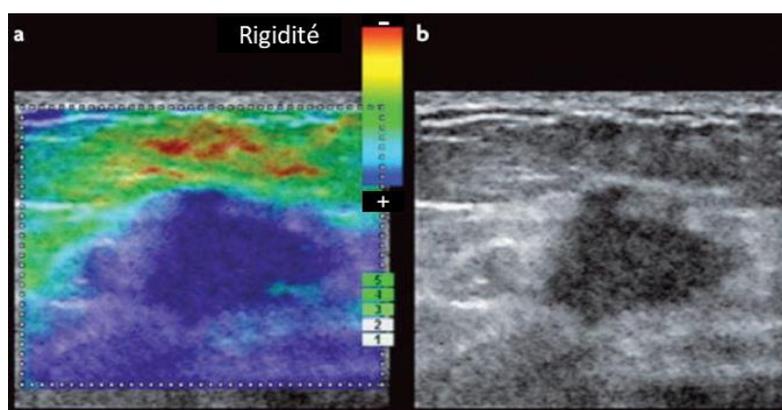
Dans des conditions extrêmes, telles que blessures répétées, inflammation chronique ou lorsque les mécanismes de rétroaction sont compromis, le stress mécanique associé à ce dépôt élevé de MEC peut induire la transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse des fibroblastes et d'autres cellules résidentes dans les tissus [61] qui vont alors déposer de manière excessive une MEC anormale. Ce scénario se caractérise par des propriétés mécaniques des MEC altérées et une élasticité réduite typiques des tissus cicatriciels. La fibrose est principalement médiée par les fibroblastes ou les myofibroblastes, ainsi que par d'autres cellules stromales. Le TGF –  $\beta$  (transforming growth factor –  $\beta$ ), qui est probablement l'inducteur de la fibrose le plus puissant [62], avec l'interleukine – 13 [63], induit la translocation du complexe de facteurs de transcription SMAD2 – SMAD3 dans le noyau, qui favorise directement l'expression de gènes

de la MEC tels que *COL1A1*, *COL3A1* (codant les chaînes  $\alpha 1$  des Col I et Col III respectivement), ainsi qu'environ 60 autres gènes liés à la MEC [64]. La MEC excessivement déposée va elle – même induire les fibroblastes à en produire davantage, engendrant un cercle vicieux de stimulation cellulaire et production matricielle. Ces conditions aberrantes promeuvent le remodelage chronique et le cross-linking de la MEC, conduisant à une incapacité du tissu à cicatriser correctement. Ce processus peut être si sévère qu'il conduira à une défaillance de l'organe touché : de la sclérodermie au niveau de la peau, à l'arythmie et la défaillance cardiaque lorsque le myocarde est affecté, la fibrose n'épargne aucun organe [65].

### 1.1.2.2. *Cancers*

Le cancer se caractérise par la perte de l'organisation tissulaire et un comportement aberrant de la composante cellulaire, et qui sont souvent accompagnés d'un processus fibrotique caractérisé par l'accumulation de Col I et Col III dans la MEC [66] et la dégradation accrue de la MB [67], favorisant l'invasion tumorale [68]. L'augmentation de l'expression du Col I fait par ailleurs partie de la signature d'expression génique associée à un fort risque métastatique [69].

Le stroma tumoral présente par ailleurs certaines caractéristiques des tissus cicatriciels [70], notamment une rigidité plus importante que le tissu normal environnant (Figure 6). La raideur des tumeurs est induite par le dépôt d'une MEC abondante, et par une contractilité accrue de l'épithélium pathologique [71].



*Figure 6 : Elastographie mammaire montrant la rigidité accrue d'une tumeur par rapport au tissu sain environnant. L'élastographie par imagerie tissulaire est une mesure qualitative spatiale de la rigidité d'un tissu générée par extrapolation à partir de la réflexion des ultrasons. Les photographies d'images sonoélastographiques comparent une image en élastogramme (a) à une échographie (b) d'une tumeur mammaire [71].*

En conséquence, les fibres de collagène et d'élastine nouvellement déposées sont réorientées, linéarisées (au contraire des fibres stromales plutôt bouclées – Figure 7), hautement cross-linkées, générant ainsi des fibrilles plus rigides qui renforcent la MEC tissulaire [72].

Le cross-linking de la MEC joue un rôle fondamental dans la progression tumorale. En effet, au cours des premiers stades de la cancérogenèse du sein, la LOX est essentiellement synthétisée par des cellules stromales, probablement en réponse au TGF- $\beta$  et au stress fibrotique. Dans les tumeurs à un stade avancé, la LOX est également induite dans les cellules de carcinome en réponse à l'hypoxie [73] et jouerait un rôle important dans la formation de niches pré-métastatiques permissives. Ainsi, la LOX sécrétée par la tumeur primaire peut s'accumuler au niveau d'organes ou de tissus secondaires distants, tels que les poumons, et y remodeler la MEC *via* son activité de cross-linking des collagènes en vue d'établir une niche-pré métastatique en amont de l'invasion par les cellules tumorales [74,75]. Des données non publiées du laboratoire ont par ailleurs montré par immunohistochimie sur des coupes de chondrosarcomes que LOX et LOXL2 sont fortement exprimées dans des échantillons chondrosarcomes de haut grade peu différencié.

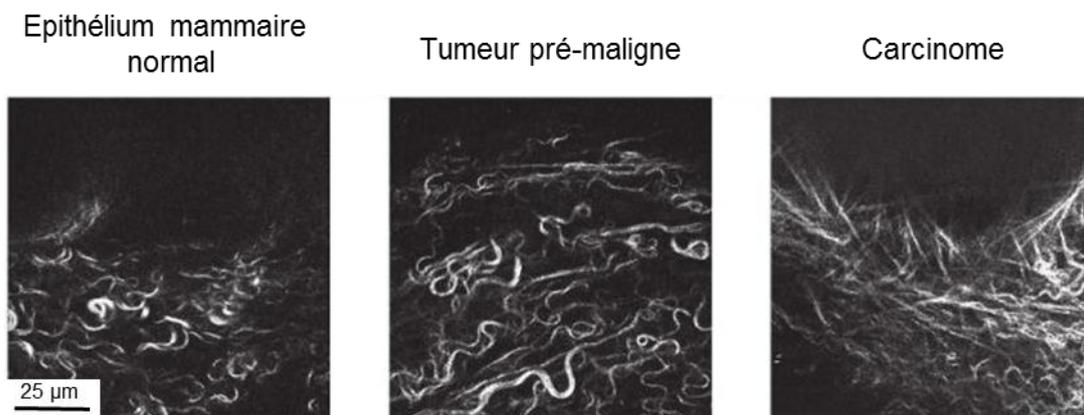


Figure 7 : Modifications de l'architecture de la MEC dans la progression tumorale. Images SHG (génération de seconde harmonique) de glandes mammaires de souris FVB MMTV-Neu à différents stades de la progression tumorale. Les modifications d'expression des collagènes et de leurs enzymes de modifications, ainsi que le remodelage accru de la MEC tumorale modifient l'architecture des fibres de collagène de telle sorte qu'initialement minces, relâchés et bouclés, les fibres s'épaississent et se linéarisent progressivement, en même temps que la progression et l'envahissement de la tumeur [76].

Enfin, d'autres enzymes de modification des collagènes, telles que les prolyl hydroxylases P4HA1 et P4HA2 dont l'expression est induite par le microenvironnement hypoxique tumoral, permettent l'établissement d'une MEC favorable au développement métastatique [77,78].

### 1.1.2.3. Vieillesse

Au cours du vieillissement, les MEC vont acquérir des caractéristiques qui vont progressivement altérer leurs fonctions, impactant profondément la morbidité humaine. Les propriétés physiques de la matrice osseuse par exemple, vont grandement être perturbées lors du vieillissement. Par exemple, la contrainte de traction ultime (mesure de la capacité d'un os à se déformer avant de se rompre) diminue de 80% entre 20 et 80 ans [79]. Le faible renouvellement des protéines fibrillaires les rendent particulièrement sensibles à l'accumulation de modifications post-traductionnelles (MPT) pathologiques et à la dégradation par des MMPs [80]. De nombreux tissus perdent notamment progressivement leur résistance à la traction et aux forces mécaniques, tels que le tissu cutané [81], pulmonaire [82] ou vasculaire [83,84]. La susceptibilité accrue aux blessures des personnes âgées résulterait notamment d'une incapacité à éliminer les protéines partiellement dégradées de la matrice, notamment les collagènes, entraînant une diminution des propriétés mécaniques [85].

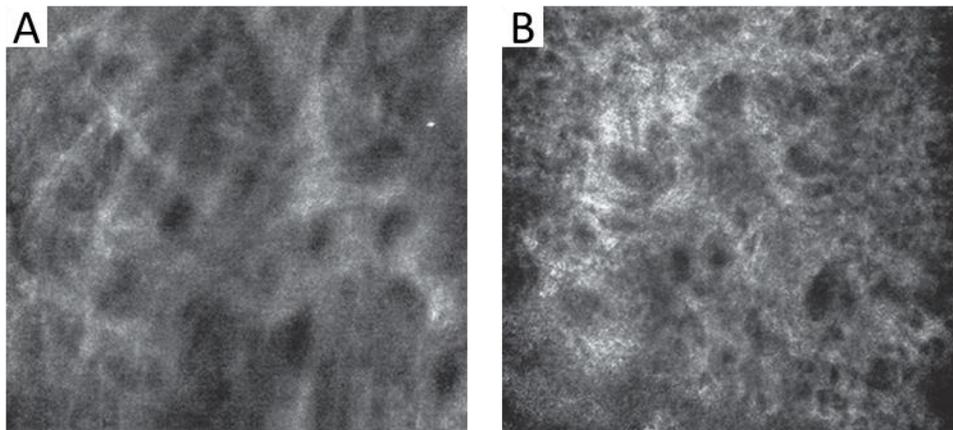


Figure 8 : Altération de l'organisation du réseau collagénique dans la peau vieillissante et endommagée par les UV. Imagerie confocale in vivo du derme réticulaire superficiel chez (A) une femme de 41 ans et (B) un homme de 75 ans [86].

Dans un tissu vieillissant, qui se caractérise notamment par une diminution du ratio élastine / collagène [43], les fibres de collagène sont fréquemment, et de manière inappropriée, cross-linkées par des mécanismes enzymatiques [87] ou non-enzymatiques. Avec l'âge,

l'accumulation de fibres amorphes et réticulées va compacter le réseau, aboutissant à une altération du réseau dans son ensemble. La dégradation de l'organisation du collagène et de l'élastine est d'autant plus évidente chez les peaux sujette au photo-vieillessement que chez les peaux chronologiquement âgées (Figure 8) [86].

La glycation non enzymatique est une modification chimique irréversible des protéines *in vivo*, qui peut être initiée par la réaction spontanée de sucres avec des résidus lysines et arginines conduisant à la formation de AGE - *advanced glycation end products* [54]. Ces derniers peuvent aboutir à la formation de cross-links inter-moléculaire pathologiques à des positions anarchiques au sein de la triple hélice de collagène.

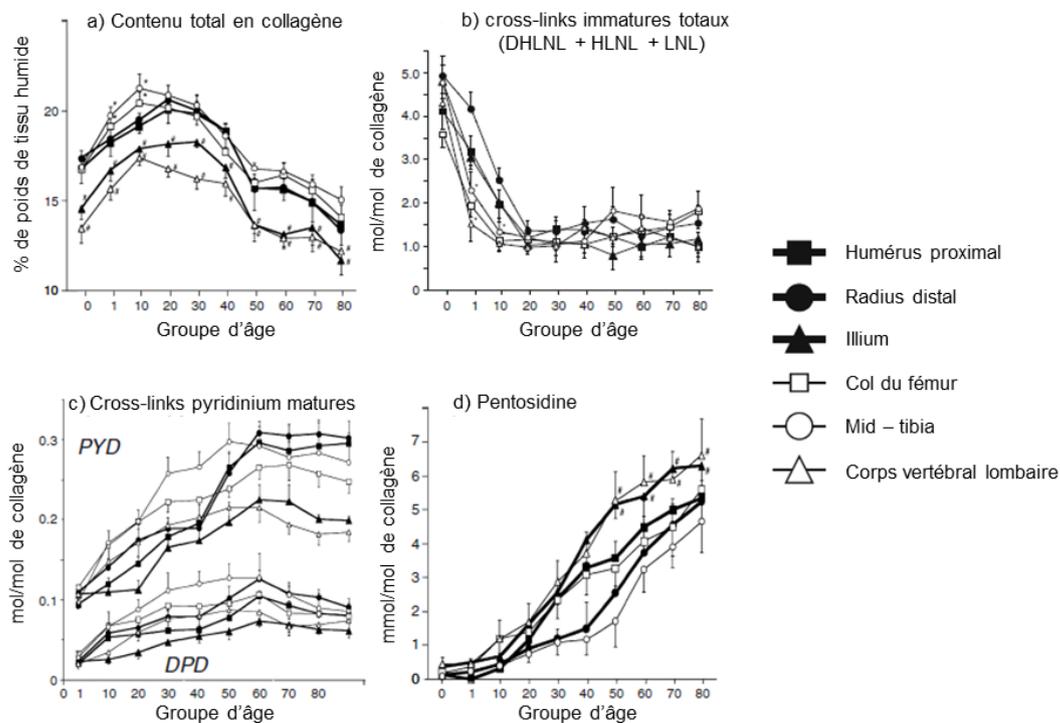


Figure 9 : Modifications des cross-links enzymatiques et non-enzymatiques au sein des collagènes en fonction de l'âge. Comparaison de l'os cortical entre six sites osseux non-porteurs (humérus : carré plein, radius : cercle plein, ilium : triangle plein) et porteurs (fémur : carré vide, tibia : cercle vide, vertèbre : triangle vide) obtenu de 40 sujets masculins en bonne santé, âgés de 0 mois à 84 ans. Les sujets sont divisés en groupe de 4 pour chaque décennie. (a) Teneur totale en collagène, (b) teneur en cross-links divalents immatures, (c) teneur en cross-links trivalent mature de type pyridinium (pyridinoline et désoxypyridinoline), (d) teneur en cross-links non-enzymatique (pentosidine). Les résultats sont exprimés en valeur moyenne du pourcentage de tissu humide total  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  par rapport aux valeur mesurées pour les os non-porteurs et valeur chiffrée :  $p < 0,05$  par rapport aux valeurs mesurées aux extrémités des os [87].

Au cours du vieillissement, une nette diminution des cross-links immatures (faible valence) est observée de manière évidente dès la naissance (Figure 9. B), au profit des cross-links matures (forte valence) et des cross-links non-enzymatiques (Figure 9. D) qui confèrent une rigidité accrue aux tissus (Figure 9. C). En revanche, il ne semble pas y avoir de différence significative en fonction du temps dans la teneur en cross-links non-enzymatiques entre les os porteurs et non-porteurs, qui présentent donc la même sensibilité à ce type de MPT uniquement dépendante du temps [87]. La combinaison d'une réticulation élevée et inappropriée des collagènes contribue à la rigidification des tissus, qui peut gravement compromettre l'organisation des MEC et modifier leur organisation et leur fonctionnement [88]. Il est notamment observé dans les os de patients atteints d'ostéoporose une diminution accrue des cross-links LOX-dépendants physiologiquement observés au profit des cross-links de type AGE [89].

## 1.2. LES COLLAGENES

Au-delà du caractère essentiel des collagènes dans la formation des tissus qui caractérisent les Vertébrés (os/dents), ce sont des composants indispensables aux MECs des tissus de tous les animaux, expliquant leur apparition très précoce au cours de l'évolution.

### 1.2.1. Des briques élémentaires à la construction des métazoaires

Les collagènes sont la famille de protéines la plus abondante du corps humain et plus largement du règne animal. Ubiquitaires aux MECs de tous les métazoaires, ils sont aussi extrêmement bien conservés depuis les organismes les moins complexes telles que les coraux et les éponges, aux plus complexes tels que les mammifères. L'identification d'un collagène entrant dans la composition des pilis de certains champignons, suggère leur apparition très précoce au cours de l'Histoire de l'évolution [7]. Des motifs protéiques collagen-like (*collagen-related structural motif* – CSM) identifiés chez des bactéries et des virus [90], ainsi que des protéines sensibles aux collagénases retrouvées dans les parois végétales [91] illustrent la fonction essentielle de cette famille de protéines pour le Vivant.

Leur implication se compte dans divers processus physiologiques tels que la migration et l'adhésion cellulaire, ainsi que dans le maintien de l'architecture et de l'organisation des tissus des organismes pluricellulaires [92].

Tableau 1 : Collagènes et collagen-like chez les Vertébrés (d'après Hulmes, 2008)

SOUS-FAMILLE	MEMBRES
Collagènes fibrillaires	I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
FACITs	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII
Collagènes formant des filaments perlés	VI
Collagènes associés aux membranes basales	IV, VII, XV, XVIII
Collagène à chaîne courte	VIII, X ; C1q ; <i>hibernation-related proteins</i> HP-20, HP-25 and HP-27 ; emilins 1 et 2 ; adiponectin; CTRPs 1-7 (collagènes de l'oreille interne)
Collagènes et collagen-like transmembranaires	XIII, XVII, XXIII, XXV/CLAC-P ; ectodysplasines ; macrophage <i>scavenger receptors I-III</i> ; MARCO ; SRCL ; gliomedine ; CL-P1
Autres collagènes et collagènes-like	Emu1 ; XXVI/Emu2 ; XXVIII ; <i>acetylcholinesterase tail subunit</i>

On distingue différents types de collagènes incluant notamment les collagènes fibrillaires (I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII), ou les collagènes associés aux fibrilles avec une triple hélice interrompue (FACITs – Fibrils associated collagens with interrupted triple helices) (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII) (Tableau 1) [25].

Les collagènes sont des glycoprotéines de tailles et formes différentes, mais partageant toutes la même caractéristique essentielle : la présence d'un domaine en triple hélice droite, qui résulte de l'association de trois chaînes polypeptidiques  $\alpha$ , chacune formant indépendamment une hélice gauche qui adopte une conformation de type polyproline – II [93] ; Figure 10). Les collagènes peuvent être hétérotrimériques, à l'instar du Col I qui contient deux chaînes  $\alpha 1(I)$  et une chaîne  $\alpha 2(I)$ , ou homotrimérique, comme le Col II qui est composé de trois chaînes  $\alpha 1(II)$ .



Figure 10 : Conformation tridimensionnelle adoptée par les chaînes polypeptidiques  $\alpha$  seules, et au sein du trimère de collagène. Les blocs élémentaires, les chaînes polypeptidiques  $\alpha$ , sont des hélices gauches de type polyproline – II. Les hélices polyprolines sont des structures non-extensibles ayant un rôle structural et mécanique dans le soutien des matrices extracellulaires. Dans le cas des collagènes, le remplacement d'un résidu Pro sur trois par une Gly offre un gain de flexibilité conséquent. Adaptée de [6].

La séquence primaire de chaque chaîne polypeptidique  $\alpha$  présente jusqu'à plusieurs centaines de répétition du typique triplet d'acide aminés Gly-Xaa-Yaa [25], où Gly est une Glycine, Xaa et Yaa sont très fréquemment des Prolines (Pro) et hydroxyproline (Hyp), respectivement [2]. Un résidu sur trois est une Gly, car l'encombrement stérique à l'intérieur du domaine en triple hélice est si étroit qu'aucune autre chaîne latérale que l'hydrogène de la Gly ne peut s'y insérer (Figure 11.A). La Gly est essentielle au maintien de l'intégrité du domaine hélicoïdal. Bien que des chaînes  $\alpha$  mutées au niveau d'une Gly de la triple hélice puissent s'assembler en fibrilles,

la perturbation de la conformation tridimensionnelle peut avoir des conséquences dramatiques sur la fibrillogénèse, et donc sur la fonction des tissus qu'elles composent (Figure 11.B).

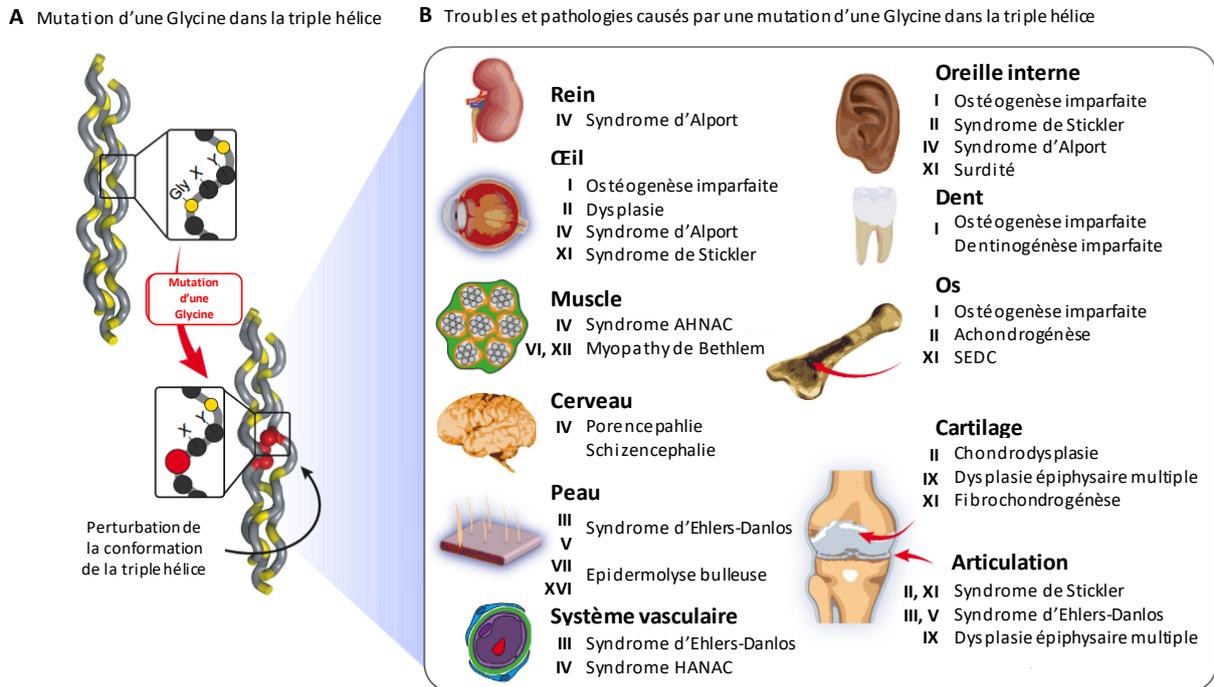


Figure 11 : Des mutations dans le domaine en triple hélice des collagènes peuvent mener à des pathologies génétiques. Une seule mutation missense d'une Glycine en un autre résidu perturbe la conformation tridimensionnelle et les fonctions de la triple hélice. B. Des mutations des résidus Glycine dans le domaine en triple hélice sont à l'origine de nombreuses pathologies génétiques dans une large variété d'organes. Le type de collagène est indiqué en chiffre romain et en gras. AHNAC : Angiopathie Héritaire avec Néphropathie, Anévrisme et Crampes ; SEDC : dysplasie spondyloépiphyssaire congénitale.

D'un point de vue biomécanique, les collagènes fibrillaires présentent un grand intérêt. Le Col I, qui est le collagène le plus représenté dans les organismes vertébrés et est le principal constituant organique des os, est en partie responsable de leur solidité et résistance [94]. Le Col II est en partie responsable des propriétés mécaniques (résistance et élasticité) et fonctionnelles (transmission et amortissement des forces mécaniques) du cartilage, auquel il est spécifique. Pour un tissu donné, les fibres de collagènes sont souvent un mélange hétérogène de différents types, généralement composées d'un collagène fibrillaire majeure (I – III) et d'un ou plusieurs collagène.s mineur.s (V – XI). Le cartilage articulaire en est un bon exemple : on y retrouve le Col II principalement et les collagènes de type IX et XI (Col IX et Col XI) [95].

## 1.2.2. Les évènements clés de la maturation des collagènes fibrillaires dans le contrôle du phénotype tissulaire sain et pathologique

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site cellulaire principal pour la synthèse des protéines sécrétées qui, pour assurer leurs fonctions, doivent adopter leur conformation tridimensionnelle native. Le RE est donc équipé de mécanismes de contrôle qualité des protéines les plus élaborées. Ainsi, un vaste réseau de chaperons moléculaires résidants dans le RE, de nombreuses enzymes impliquées dans le repliement et les MPTs et des mécanismes de transports, fonctionnent de concert pour faciliter les différentes étapes de la maturation et prévenir la formation d'agrégats. La synthèse des collagènes ne fait pas exception. Une perturbation de n'importe quelle étape peut alors gravement impacter les propriétés mécaniques et biochimique des MEC qu'ils composent, ce qui est d'autant plus évident au cours du vieillissement [96].

### 1.2.2.1. Modifications post-traductionnelles des prolines

La triple hélice de collagène dispose d'une remarquable stabilité, à la fois due à l'importante proportion en Pro, qui apporte de la rigidité aux chaînes polypeptidiques, et grâce au nombre important de modifications qu'elles subissent. L'hydroxylation des Pro est un évènement qui prend place dans le RE, essentiellement de manière co-traductionnelle est qui se poursuit de manière post-traductionnelle.

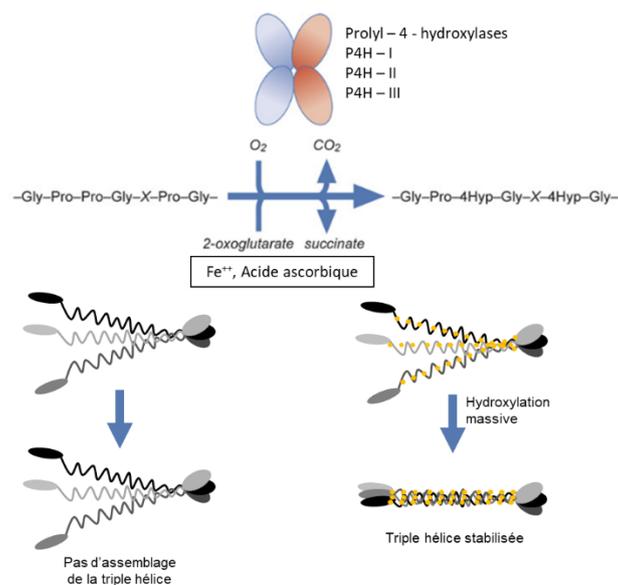
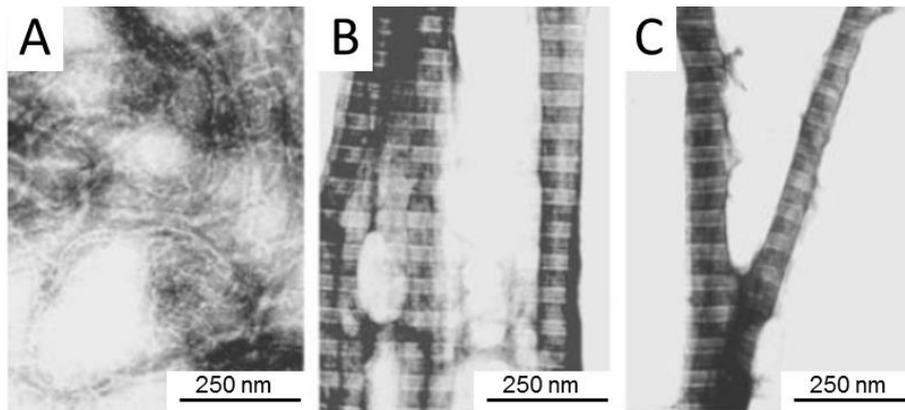


Figure 12 : Les Prolyl 4-hydroxylases (P4H-I, P4H-II et P4H-III) hydroxylent les résidus prolines de manière co- et post-traductionnelles. Ces réactions nécessitent la présence de différents cofacteurs :  $O_2$ , 2-oxoglutarate,  $Fe^{++}$  et de l'acide ascorbique. L'hydroxylation des prolines est requise pour la stabilité de la triple hélice de collagènes dans des conditions physiologiques.

L'hydroxylation des Pro en position Yaa du triplet d'acides aminés [Gly – Xaa – Yaa] est réalisée par une prolyl 4-hydroxylase (P4H), dont la famille comporte 3 isoenzymes chez les organismes vertébrés, et est l'un des événements de modification les plus importants en terme d'abondance, permettant notamment d'augmenter la thermo-stabilité de la triple hélice de collagène (Figure 12 - [97,98]).



*Figure 13 : Marquage négatif de fibrilles reconstituées in vitro dans un tampon PBS à partir de collagène de type I recombinant produit en cellules de plante (A) ou avec du collagène de type I bovin heterotrimérique (B) ou homotrimérique (C). L'alternance de bandes claires et foncée est représentative de la périodicité axiale D. La reconstitution in vitro de fibrilles se fait par augmentation de la température en parallèle de la neutralisation du pH du tampon. Le collagène natif forme des fibrilles à 37°C. En raison de la température de fusion de 30°C des molécules de collagène recombinantes, les expériences de reconstitution in vitro ont été ici réalisées à 20°C.*

La modification des Pro en position Xaa du triplet [Gly – Xaa – (4 – Hyp)] est catalysée par une prolyl 3 – hydroxylase (P3H), un événement quantitativement moindre, mais dont l'importance fonctionnelle est illustrée par des cas d'Ostéogenèse Imparfait (OI) lorsque l'enzyme est invalidée [99,100]. Les chaînes polypeptidiques des collagènes fibrillaires de type  $\alpha 1(I)$ ,  $\alpha 1(II)$  et  $\alpha 2(V)$  présentent notamment un site 3-Hyp à la position Pro986 toujours modifié et dont la position est conservée au sein des organismes vertébrés. En outre, des sites 3-Hyp partiellement occupés sont décrits pour les chaînes  $\alpha 2(I)$ ,  $\alpha 1(II)$ ,  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$ ,  $\alpha 1(XI)$  et  $\alpha 2(XI)$  [101]. Une caractéristique importante des 3-Hyp a été mise en évidence par spectrométrie de masse : la distance séparant deux résidus modifiés par les P3H est exactement de 237 acides aminés, alors que la périodicité axiale D des fibrilles de collagènes (développé ci-après §1.2.3 - Figure 26) est d'environ 67 nm, soit 234 résidus, suggérant que les 3 – Hyp auraient un rôle

fondamental dans l'assemblage ordonné des fibrilles de collagènes. De façon surprenante, les Col III humain et bovin ne présentent aucune 3 – Hyp [102].

Les 3 – et 4 – prolyl – hydroxylations requièrent la présence de nombreux cofacteurs, desquels l'acide ascorbique, dont la nécessité est illustrée dans la pathologie du scorbut, une carence en vitamine C. Décrite pour la première fois dans des parchemins médicaux attribués à Hippocrate, le scorbut a eu une grande incidence sur les populations de marins aux 15<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> siècle, et est caractérisée précocement par une faiblesse généralisée et des douleurs des membres. En cas d'aggravation, hémorragies et cicatrisation médiocre des plaies peuvent entraîner la mort [103].

Les MPTs des collagènes, et notamment les 3 – et 4 – Pro – hydroxylations permettent la création d'une véritable plateforme d'interaction pour de nombreux ligands, en particulier les intégrines qui voit leur avidité augmenter [104].

#### 1.2.2.2. *Sélection des chaînes polypeptidiques dans le RE*

La biosynthèse d'une molécule de collagène fibrillaire débute dans le RE par la synthèse de trois chaînes polypeptidiques pro- $\alpha$ , qui sont réunies et stabilisées par la formation de ponts disulfures entre leurs extrémités C-terminales. Les chaînes pro –  $\alpha$  s'enroulent ensuite en direction de l'extrémité N-terminale à la manière d'une fermeture éclair [105], pour former un homo ou un hétérotrimère (selon le type de collagène) en triple hélice (Figure 14 - passé en revue par [106]).

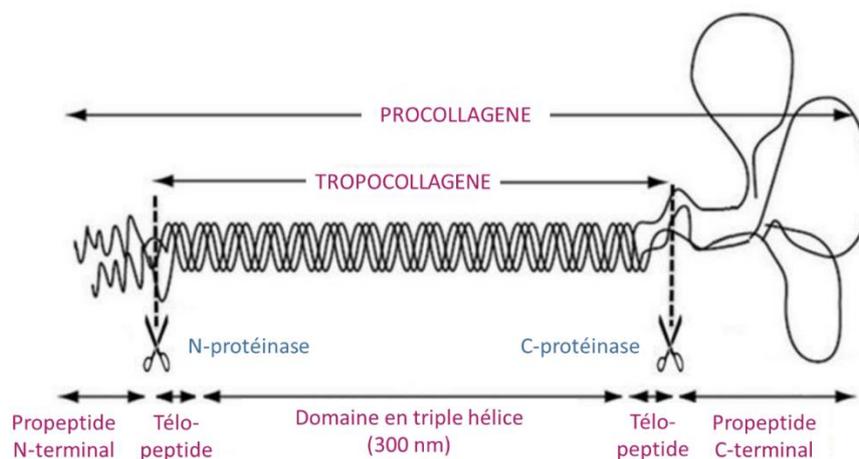


Figure 14 : Représentation schématique d'une molécule de collagène fibrillaire. Les différents domaines et les sites de clivage des propeptides sont représentés.

La nature ubiquitaire des collagènes est telle qu'un unique type cellulaire peut exprimer différents types de collagène. Ainsi, les fibroblastes de la peau, sont notamment en mesure de synthétiser les six chaînes polypeptidiques nécessaires à l'assemblage hétérotrimérique du Col I, homotrimérique du Col III et selon les cas, hétéro ou homotrimérique du collagène fibrillaire de type V (Col V). En dépit de l'homologie de séquence très élevée (46% entre les C-propeptides de différentes chaînes des procollagènes humains de types I à III [21] ; Figure 15), les cellules assemblent inévitablement chaque trimère de manière spécifique.

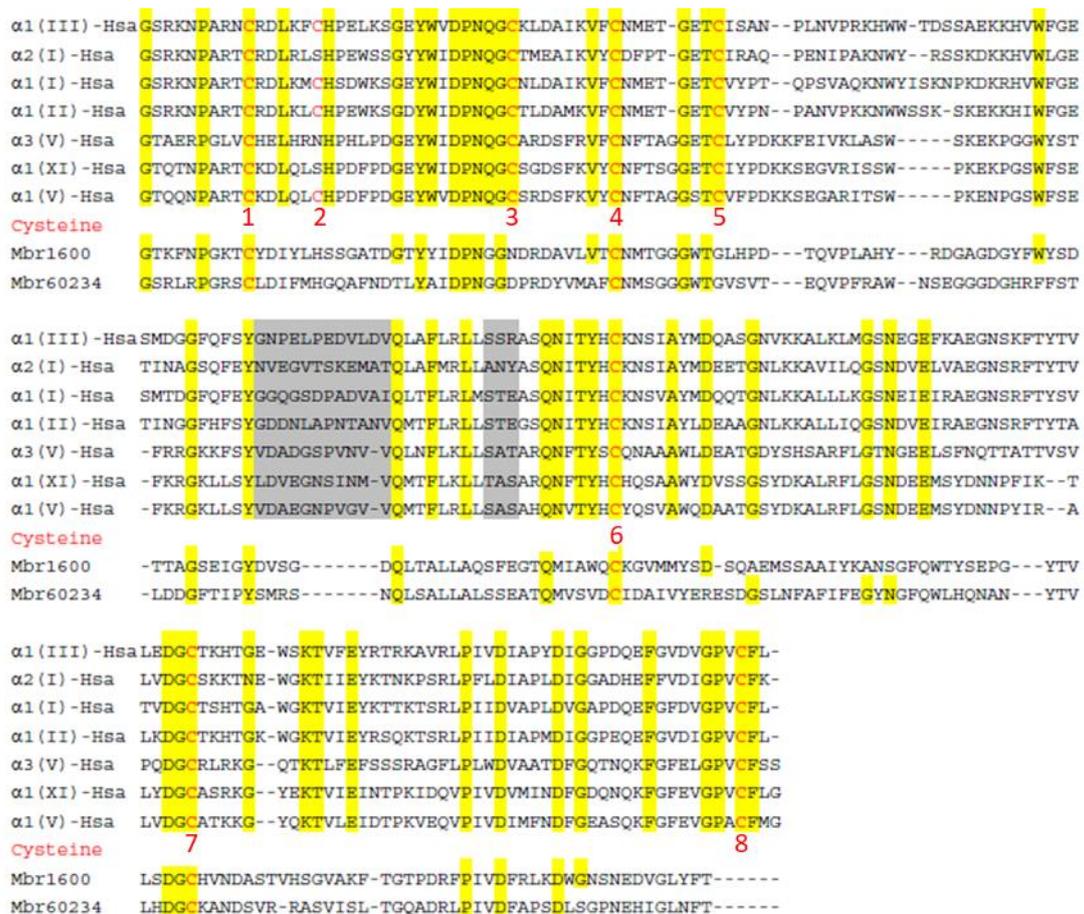


Figure 15 : Alignements multiples de différents C-propeptides humains (Hsa) ou de choanoflagellé (Mbr, *Monosiga brevi* Col Is – eucaryote unicellulaire). Les résidus conservés sont surlignés en jaune, les résidus appartenant à la séquence de reconnaissance de chaîne sont surlignés en gris, les cystéines sont indiquées en rouge et numérotées [21].

La capacité des chaînes de procollagène individuelles à discriminer les unes des autres est donc une caractéristique essentielle du processus d'assemblage, garantissant que chaque molécule de collagène possède la bonne composition de chaînes pro –  $\alpha$ . A l'aide de procollagènes

recombinants chimériques, Lees et al. ont caractérisé dans les C-propeptides des collagènes une séquence discontinue et hautement variable de 15 acides aminés (une première séquence de 12 résidus et un court segment de 3 résidus, séparés par une séquence relativement conservée de 8 résidus) appelée séquence de reconnaissance de chaîne (SRC) [107].

Cette séquence semble conférer la sélectivité de chaîne lors de l'assemblage de différents types de collagène au sein d'une même cellule et prévenir la formation de trimères hybrides non-physiologiques. La détermination de la structure tridimensionnelle du CPIII (propeptide C-terminal du procollagène de type III), qui est un homotrimère, a permis de mettre en évidence que les deux segments conservés de la SRC se font face à chaque interface d'interaction entre deux chaînes adjacentes, expliquant ainsi la spécificité de l'association des chaînes [108].

La formation d'homotrimères de collagène de type I résultant de l'assemblage de trois monomères de chaîne  $\alpha 1(I)$  a cependant été rapportée en condition physiologique en faible quantité dans la peau adulte [109], ou en forte quantité dans des tissus embryonnaires [110]. L'augmentation pathologique de la quantité d'homotrimère de Col I a également été associée avec des cas de cancer [111,112], de fibrose [113], d'arthrose [114] ou de maladies génétiques rares tels que les syndromes d'Ehlers – Danlos (SED) [115]. Ces formes homotrimériques diffèrent des hétérotrimères physiologiques dans leurs propriétés physico-chimiques, notamment par une fibrillogenèse altérée [116], et une résistance accrue aux protéinases [113].

#### 1.2.2.3. *Des chaperonnes pour assurer le repliement*

Le repliement des collagènes dans leur conformation native requiert le recrutement de protéines chaperonnes globales résidentes du RE, telles que la calnexine, la calreticuline, PDI (protein disulfide isomerase), GRP94 (heat shock protein 90kDa member1, codée par le gène *Hsp80b1*) [117] et BiP (binding immunoglobulin protein, codée par *Hspa5*) [118]. Dans le cas de la triple hélice de collagène, d'autres chaperons moléculaires tel que le complexe P3H1 (prolyl-3-hydroxylase 1)/CRTAP (cartilage-associated protein)/CYBP (calcyclin-binding protein), permettent également la stabilisation et préviennent la formation d'agrégats [118]. En outre, le complexe a une activité peptidylprolyl *cis* – *trans* isomérase (PPI) indispensable portée par la sous-unité CYPB. En effet, près de 30% des acides aminés de la triple hélice sont des Pro ou des Hyp dont la liaison peptidique doit être en conformation *trans* pour permettre un repliement correcte de la triple hélice [119].

D'autres protéines chaperonnes sont uniques, car elles fixent spécifiquement les collagènes dans leur conformation native, afin notamment de stabiliser la triple hélice en cours de

repliement. Cela inclut notamment Hsp47 (heat shock protein 47, codée par *SERPINH1*) [120] qui reconnaît la répétition du triplet Gly – Xaa – Arg et s'associe de manière transitoire à la triple hélice de collagène avec un rapport de 20 Hsp47 pour chaque molécule de collagène [121]. *In vitro*, les fibrilles de Col I produites par des fibroblastes Hsp47<sup>-/-</sup> sont anormalement minces, ramifiées, présentent une sensibilité accrue à la digestion à la trypsine, et les N-propeptides des collagènes sécrétés ne sont pas clivés [122]. Des études *in vivo* de *knock-out* total (KO) ou conditionnel (cKO) dans les chondrocytes de souris ont indiqué que Hsp47 est essentielle au développement embryonnaire et à la maturation de plusieurs types de collagène. La létalité précoce est notamment la conséquence d'une altération de la MB, dont le composant majoritaire est le Col IV. Les souris Hsp47 cKO présentent notamment une chondrodysplasie sévère généralisée, des déformations osseuses importantes et une minéralisation endochondrale altérée, associées à des niveaux faibles de Col II et de Col XI [123]. Lors du transport des collagènes depuis le RE vers le *cis*-Golgi, Hsp47 se dissocie pour être à nouveau ciblée vers le RE [124], grâce à son peptide signal KDEL [125].

#### 1.2.2.4. *Modifications post-traductionnelles intracellulaires des lysines*

Les modifications des lysines sont des processus séquentiels hautement régulés qui ont lieu dans et hors de la cellule. Ces modifications jouent un rôle critique dans la formation des cross-links des collagènes qui vont stabiliser les fibres de collagènes et réguler les propriétés mécaniques des tissus, et en particulier leur rigidité (Figure 16).

En intracellulaire, des résidus spécifiques de la triple hélice (Figure 17) et des télopeptides peuvent d'abord être hydroxylés par une lysine hydroxylase (LH1, LH2 ou LH3 codée par *PLOD1*, *PLOD2* ou *PLOD3* respectivement, pour procollagen-lysine 2-oxyglutarate 5-dioxygénase), formant des 5 – hydroxylysines (Hyl). Des hydroxylysines particulières de la triple hélice, notamment la lysine  $\alpha$ 1-87 impliquée dans la formation de cross-links inter-chainés [126], peuvent ensuite être O - glycosylées par la LH3, dont l'activité lysyl hydroxylase est négligeable et qui est la seule enzyme de la famille des LH à être décrite comme une enzyme multifonctionnelle [127] disposant aussi d'une activité galactosyltransferase (GT) et glucosylgalactosyl - transferase (GGT) [25].

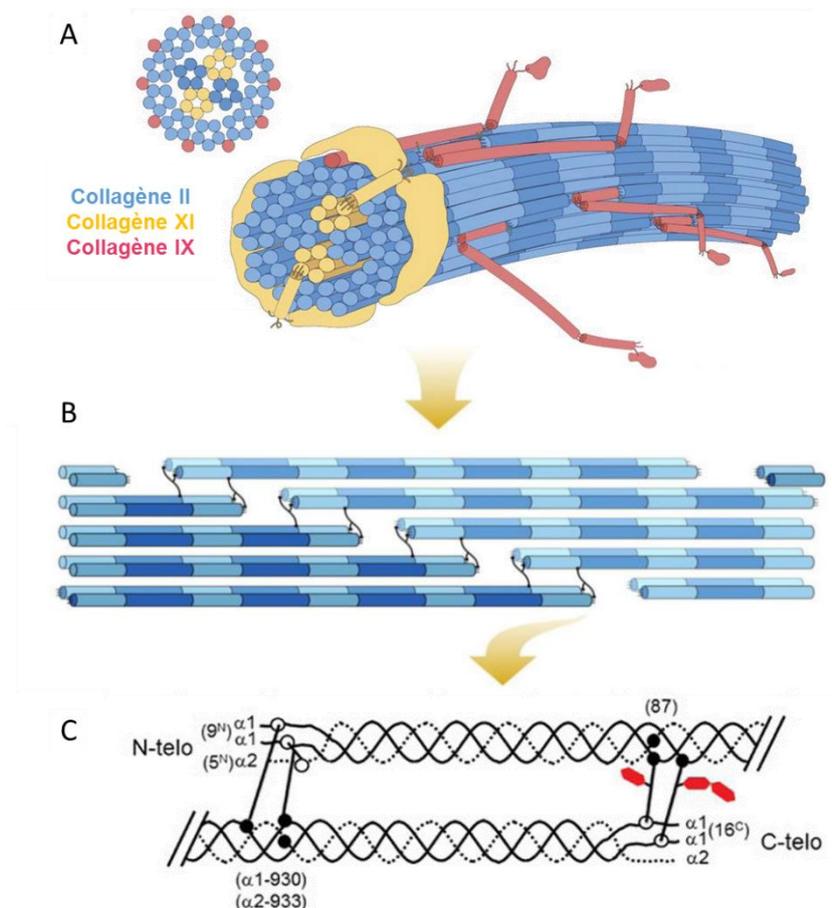


Figure 16 : Stabilisation des fibrilles de collagènes par la formation de cross-links : exemple d'une hétérofibrille de collagène de types II, IX et XI, spécifique du cartilage. A. Les molécules de collagène au sein d'une fibrille de collagène (A) sont hautement organisées (B), notamment grâce à la formation des cross-links entre les lysines spécifiques des télépeptides et les lysines du domaine en triple hélice (C). Adaptée de [128–130].

Le taux de glycosylation des collagènes peut varier d'un type à l'autre, le Col I étant le moins sujet à la glycosylation, ainsi que d'un tissu à un autre et d'un état physiologique à un autre (notamment au cours du vieillissement) [131]. *In vitro*, des collagènes extraits de cellules invalidées pour l'activité GGT présentent un taux de fibrillogenèse plus rapide qui semble donc moins contrôlée. En outre, la structure en triple hélice inhibe la glycosylation subséquente des lysines, suggérant que ces modifications prennent place de manière co-translationnelle [132]. L'importance critique de la LH3 pour l'intégrité du tissu conjonctif est clairement démontrée par la description clinique de patients atteints de mutations dans le gène *PLOD3* [133] et largement supporté par des études *in vivo* sur des souris KO [134]. Les souris invalidées pour

*PLOD3* présentent un phénotype sévère, notamment caractérisé par la létalité embryonnaire due à l'agrégation du Col IV et l'absence d'une MB fonctionnelle.

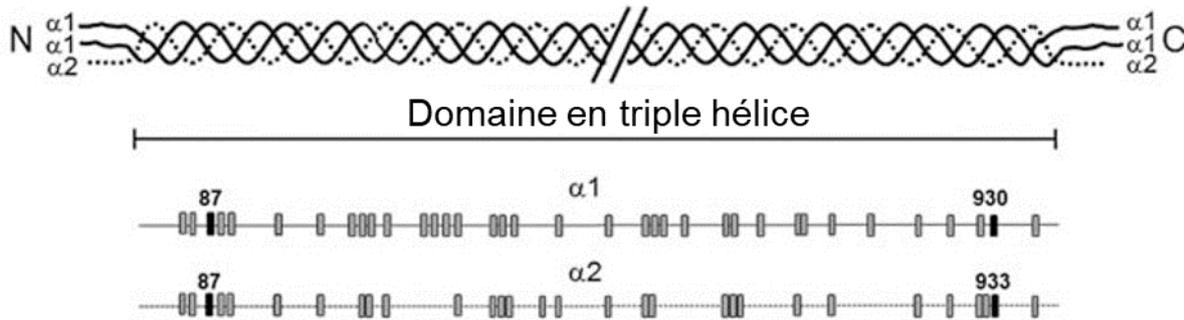


Figure 17 : Modifications post-traductionnelles des résidus lysine dans le domaine en triple hélice du collagène de type I. Distribution relative (rectangles gris) des 36 résidus lysine des chaînes  $\alpha 1$  (lignes pleines) et des 30 lysines de la chaîne  $\alpha 2$  (lignes pointillées) dans le domaine en triple hélice du collagène de type I humain. Les lysines impliquées dans des cross-links et leur position sont indiquées en noir [128].

De nombreuses mutations des *PLODs* ont été décrites dans plusieurs pathologies humaines, tels que des cancers [135], et des maladies génétiques rares comme les syndromes d'Ehlers-Danlos [136] ou l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive [137], et la banque de données *SimPLOD* récemment mise en place a pour but de toutes les recenser [138].

#### 1.2.2.5. Trafic intracellulaire jusqu'au Golgi

L'empaquetage des collagènes pour leur transport vers le Golgi, se fait *via* des vésicules de transport type COPII. Bien qu'essentielles à un transport et une sécrétion efficaces [139], leur diamètre n'excédant pas 60 à 90 nm, semblent néanmoins bien trop petites pour incorporer des protéines d'environ 300 nm de long [140]. La formation de larges vésicules de transports nécessite l'implication de TANGO1 (*Transport and Golgi organization protein 1*, codée par *Mia3*) afin de cibler le procollagène vers les sites de sortie du RE (ERES - [141]). TANGO1 jouerait alors un rôle d'ancrage au compartiment ERGIC (*ER to Golgi intermediate compartment*), pour permettre l'expansion de la vésicule de transport en formation. De récentes études d'imagerie sur cellules vivantes suggèrent que seul l'empaquetage se ferait sous le contrôle de COPII, et supporte la possibilité d'une fusion entre RE et ERGIC, au niveau des ERES, pour faciliter le transport vers le Golgi (Figure 18 - [142]). Par ailleurs, des souris KO pour TANGO1 ont une sécrétion des collagènes de type I, II, III, IV, VII et IX altérée [143].

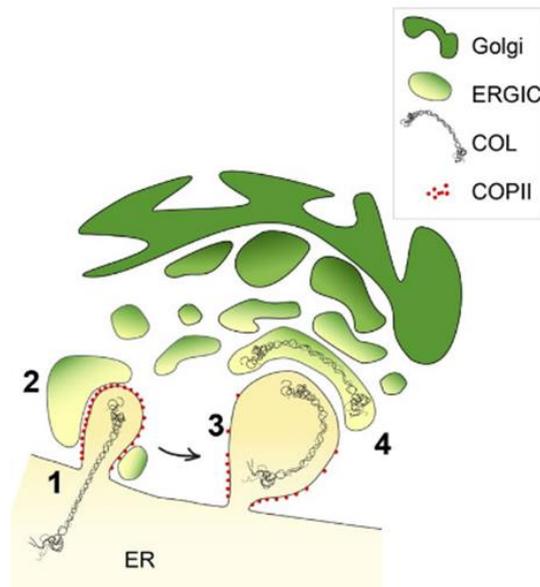


Figure 18 : Le transport du COL1A1 depuis les ERES à proximité du Golgi. (1) L'emballage du procollagène est dépendant de la formation d'une vésicule type COPII dans les bourgeons naissants. (2) Ces bourgeons sont développés par la fusion dépendante de TANGO1 avec le compartiment ERGIC. (3) Expansion de la vésicule de transport. Des questions demeurent quant à l'étendue de l'expansion requise et à la flexibilité du trimère à ce stade. (4) La séparation de la vésicule de transport génère un compartiment adopte presque immédiatement l'identité de l'ERGIC et progresse pour devenir la première citerne du Golgi. Dans ce modèle, l'ERGIC agit à la fois comme intermédiaire pour élargir le porteur naissant dérivé du RE et pour assurer la compartimentation du RE et du Golgi [142].

#### 1.2.2.6. Clivage proéololytique des propeptides

Les clivages des propeptides amino et carboxy-terminaux des collagènes fibrillaires sont des étapes indispensables à une fibrillogénèse correcte [144]. Des mutations affectant directement les sites de clivage ou la triple hélice et ayant une répercussion sur le clivage des propeptides ont ainsi été décrites pour résulter, notamment, en différents phénotypes d'OI [145,146]. Jusqu'à présent, quatre groupes de protéinases ont été impliqués dans la maturation des procollagènes fibrillaires (I, II, III, V et IX) : les protéinases tolloïdes, les protéinases convertases de type furine, les ADAMTS (une désintégration et métalloprotéase à motifs thrombospondine), et les méprines.

L'activité procollagène C-protéinase est, le plus souvent, assurée par une enzyme de la famille des métalloprotéases zinc-dépendante, dont le membre principal est BMP-1 (Bone morphogenic protein-1) / mTLD (mammalian tolloid) [147], alors que l'activité procollagène N-protéinase est assurée par les ADAMTS [148]. Dans le cas des collagènes fibrillaires mineurs (V et XI), les protéases tolloïdes et les protéinases convertases de type furine sont également

impliquées respectivement dans le traitement N- et C-terminal [149]. Enfin, les méprines  $\alpha$  et  $\beta$ , des endopeptidases multidomaines membres de la famille des métalloprotéinases zinc – dépendantes appelée astacine, présentent *in vitro* des activités N- et C-protéinases sur le Col III [150]. Par ailleurs, le clivage C-terminal se produit exactement au même endroit qu'avec la BMP-1 mais avec une meilleure efficacité. Le procollagène libéré de ses extrémités mesure environ 300 nm de long et est appelé tropocollagène.

Des données obtenues *in vivo* sur des tendons embryonnaires de poulets suggèrent que le clivage du N – propeptide prendrait place au niveau du *cis* – Golgi, bien plus tôt dans la voie de sécrétion que le clivage du C – propeptide, qui serait clivé au moins juste avant la fibrillogenèse, au niveau de l'interface cellule – matrice [151]. Bien que le principe du clivage du C – propeptide en extracellulaire fasse consensus [152], des cellules issues de tendon de souris montrent la capacité à maturer totalement le procollagène en le débarrassant de ses extrémités propeptidiques, tout en prévenant la formation de fibrilles, en intracellulaires [153].

Lorsque le phénotype est viable, un défaut dans l'une des enzyme de maturation protéolytique se manifeste inévitablement par des pathologies telles que SED [154] ou OI [155]. Les souris mutantes ADAMTS présentent des molécules de procollagènes incomplètement maturées qui s'assemblent en fibrilles anormales semblables à des rubans et qui ne parviennent pas à fournir une résistance à la traction normale aux tissus [156].

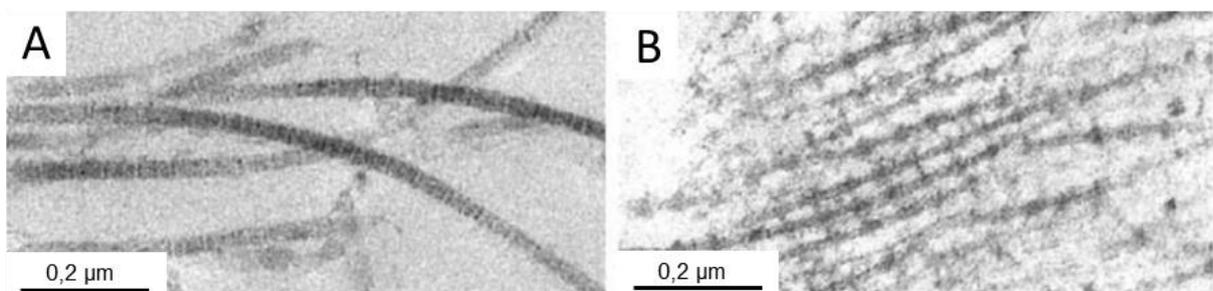


Figure 19 : Les fibrilles de collagène apparaissent anormales chez les mutants homozygotes pour BMP-1. Microscopie électronique à transmission de fibrilles de collagènes de l'amniote d'un embryon sauvage (A) ou mutant (B) pour BMP-1. Les fibrilles, plus courtes, ont une allure de « fil de fer barbelé » [157].

Dans le cas de BMP-1, les souris *Bmp1*<sup>-/-</sup> présentent une défaillance de la fermeture de la paroi ventrale dans la région ombilicale et ne survivent pas après la naissance. Les mutants homozygotes ne présentent pas d'anomalies évidentes du squelette hormis des défauts de développement des os du crâne. Les fibres de collagènes observées (Figure 19), plus minces

que la normale, ont l'apparence d'un « fil de fer barbelé », suggérant qu'au moins certaines molécules de procollagène conservent le C-propeptide [157], montrant l'existence d'autres enzymes responsables de l'activité procollagène C-protéinase. Les doubles mutants *Bmp1*<sup>-/-</sup> *Tll1*<sup>-/-</sup> ont ainsi permis de montrer que la redondance fonctionnelle était portée par la TLL-1 [158]. Bien que les cellules issues de ces mutants ne présentent aucune activité procollagène C-protéinase détectable, elles sont en mesure d'assembler des fibrilles de collagènes (qui restent largement anormales et en faible quantité), suggérant que la fibrillogenèse peut survenir en l'absence de clivage des C-propeptides, et en contradiction avec le dogme accepté, ou qu'un clivage résiduel des C-propeptides se produit, impliquant alors une autre protéase que BMP-1 et TLL-1, mais dont l'activité est difficilement détectable.

Par ailleurs, les C – propeptide semblent être acteurs de leur propre clivage. En effet, ils permettent le recrutement de PCPE-1 (*Procollagen C-Proteinase Enhancer*) via ses domaines CUBs (*Complement-Uegf-Bmp1*) [159], qui augmente spécifiquement l'activité protéase de BMP-1 vis-à-vis des collagènes [160–162].

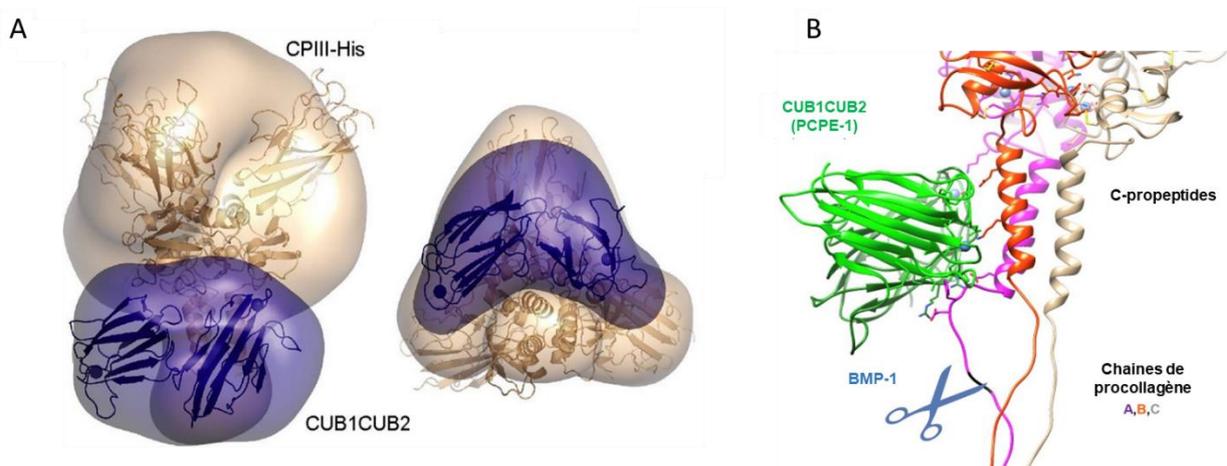


Figure 20 : Structure du complexe CPIII – PCPE-1 et mécanisme d'action de PCPE-1. A. Superposition de la structure cristalline du peptide carboxy-terminal du procollagène de type III (CPIII) et de la structure prédite des domaines CUB1-CUB2 de PCPE-1, avec les structures basse résolution du complexe CPIII-His : CUB1-CUB2 [148-149]. B. Mécanisme d'action de l'amélioration de l'activité de clivage de la protéinase impliquée par PCPE – 1. Ce mécanisme implique de démêler la chaîne à cliver du reste du trimère [164].

De premières données de diffraction des rayons X à faible angle (SAXS) sur l'étude du complexe CPIII – PCPE-1 ont montré que les domaines CUB1-CUB2 de PCPE-1 se lient à la « tige » du trimère de CPIII, à la jonction avec la région globulaire (Figure 20. A. - [163]).

L'obtention de données haute résolution ont permis de mettre en évidence le mécanisme par lequel PCPE-1 favoriserait l'activité de BMP-1 : lorsque les deux domaines CUBs se lient à deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  différentes du CPIII (chaînes A et B, Figure 20. B.), la région N – terminale de l'une d'elle (chaîne B, Figure 20. B.), proche du site de clivage protéolytique, se situe dans la fente entre CUB1 et CUB2, permettant de démêler cette chaîne du reste du trimère, facilitant ainsi l'action de la protéinase impliquée [164]. *In vitro*, et contrairement à la BMP-1, les méprines semble légèrement inhibées en présence de PCPE-1 [150].

PCPE-1 possède également un domaine NTR (*netrin-like*), qui permet de médier sa fixation à la MEC *via* la fibronectine, ou à la surface cellulaire *via* des PGs à héparane sulfate (PGHS) [165], notamment syndecans-1, -2 et -4 [166]. La localisation de PCPE-1 à la surface cellulaire est par ailleurs augmentée en présence d'acide ascorbique [167]. N'étant pas sujet à l'hydroxylation, la dépendance de PCPE-1 vis-à-vis de la vitamine C serait liée à son rôle dans la maturation des procollagènes. En outre, la fixation aux PGHS promeut l'activité de PCPE-1 vis-à-vis de BMP-1 [168]. Ces observations suggèrent un mécanisme selon lequel la liaison à des GAGs sulfatés à la surface cellulaire ou extracellulaires pourrait réguler le processing du procollagène.

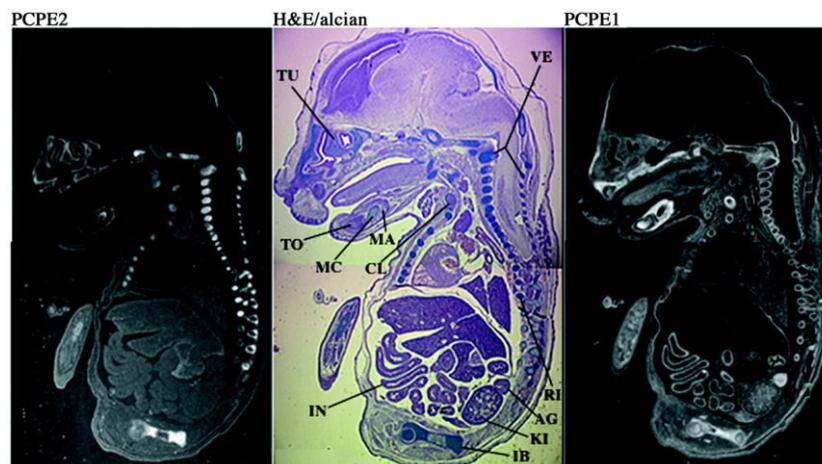


Figure 21 : Les gènes *PCOLCE1* et *PCOLCE2*, codant respectivement *PCPE-1* et *PCPE-2*, ont une expression spatiale différente au cours de l'embryogenèse. Coupes sagittales d'embryons de souris à 15,5 dpc. (Gauche et droite : hybridation *in situ* avec des ribosondes antisens *Pcolce2* ou *Pcolce1*. Milieu : coloration à l'hématoxyline-éosine et au bleu Alcian (H & E; Alcian). AG : glande surrénale ; CL : clavicule ; IB : os innominé ; IN : intestin ; KI : rein ; MA : mandibule (ossifiée) ; MC : cartilage de Meckel ; RI : côtes ; TO : primordia dentaire (incisive) ; TU, primordia cartilagineux des os cornés ; VE, vertèbres [169].

*PCPE-2*, qui présente plus de 40% d'identité avec *PCPE-1*, possède une capacité d'activation comparable [169]. Ces deux protéines diffèrent dans leurs MPTs (glycosylation notamment), et

dans leur expression spatiale (Figure 21). Alors que PCPE-1 est largement exprimé dans les tissus mous, dans le périoste et les centres d'ossification osseux pendant le développement [169], ou dans les tissus cicatriciels [170], l'expression de PCPE-2 reste limitée aux parties intérieures non ossifiées des structures cartilagineuses, tout en étant exclue des régions d'ossification, suggérant des rôles différents dans la formation du tissu osseux.

Les mutant homozygotes PCPE-1, parfaitement viables, ne présentent qu'un phénotype léger : les os longs des mâles, mais pas des femelles, sont plus massifs et ont une géométrie modifiée qui augmente la résistance à la charge par rapport aux souris sauvages. Au niveau des tendons, les fibrilles assemblées ont une circonférence irrégulière (Figure 22 - [171]).

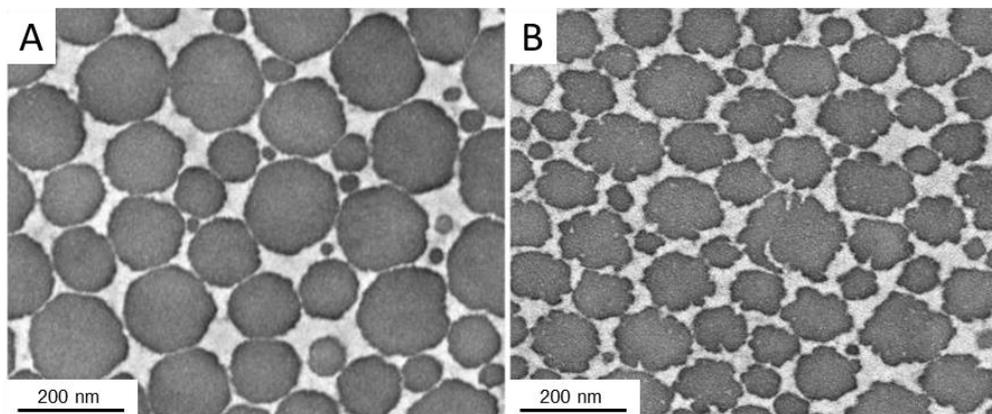


Figure 22 : Les fibrilles de collagène apparaissent anormales chez les mutants homozygotes pour PCPE-1. Microscopie électronique à transmission en coupe transversale de fibrilles de collagènes du tendon *Flexor Digitorum Longus* (fléchisseur de la patte) de souris âgées de 30 jours sauvage (A) ou mutante (B) pour PCPE-1. Les fibrilles de collagènes mutantes ont un aspect irrégulier contrairement aux sections transversales lisses et circulaires des fibrilles du tendon de type sauvage [171].

#### 1.2.2.7. Modifications post-traductionnelles extracellulaires des lysines

Enfin, une fois les molécules de collagène sécrétées, des lysines et hydroxylsines peuvent être modifiées par action de la LOX [172]. La famille des LOX comporte quatre membres ; LOX, LOXL2, LOXL3 et LOXL4 (pour LOX – like 2, 3 et 4 respectivement) partageant un haut degré d'homologie au sein de leur région C-terminale, qui contient notamment le domaine catalytique conservé [173]. Les enzymes de la famille des LOXs catalysent la déamination oxydative de résidus Lys et Hyl au niveau des télépeptides des collagènes, en allysine et hydroxyallysine respectivement, mais ne sont pas spécifiques des collagènes puisqu'elles sont aussi décrites pour modifier notamment l'élastine [174]. Ces formes aldéhydes réactives initient une série de

réactions non-enzymatiques de condensation avec des résidus Lys et/ou Hyl, aboutissant à la formation de cross-links di-, tri- ou tetra- valent (Figure 23 - [128]).

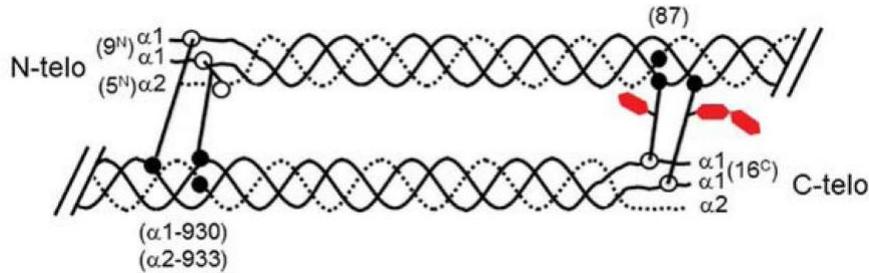


Figure 23 : Sites de formation des pontages covalents (cross-links) du collagène de type I. Les lignes noires au sein et entre les molécules de collagènes indiquent des exemples de pontages covalents intra et inter-moléculaires. Les nombres entre parenthèses indiquent la position du résidu impliqué dans le cross-link sur le tropocollagène (molécule de collagène débarrassée de ses propeptides). Les résidus aldéhydes des télopeptides sont indiqués par des cercles ouverts, et les lysines ou hydroxylsines hélicoïdales sont représentées par des cercles fermés. Hexagone rouge, galactose ou glucose lié à l'hydroxylsine hélicoïdale impliqué dans la formation d'un cross-link ; telo : télopeptide. Trait plein : chaîne  $\alpha 1$  ; Trait pointillé : chaîne  $\alpha 2$ . [128]

Les activités lysyl oxydase et hydroxylase sont cruciales pour la biosynthèse et la stabilité des fibrilles de collagènes. Elles sont par ailleurs en partie responsables des différences de propriétés conférées par les collagènes aux différents tissus. La nature des cross-links dépend principalement de l'étendue de l'hydroxylation des Lys C-télopeptidiques. Deux voies de formation des cross-links dépendantes de l'activité LOX opèrent alors, l'une basée sur les Lys aldéhydes et l'autre sur les Hyl aldéhydes [175]. Quand les premiers sont essentiellement retrouvés au niveau de la peau, de la cornée et de certains tendons, où ces Lys ne sont pas significativement hydroxylées, les derniers sont caractéristiques des tissus conjonctifs squelettiques. Par ailleurs, les tissus comme le cartilage ou le fibrocartilage, les os, les tendons et ligaments qui doivent répondre à de fortes forces de traction, produisent des collagènes largement cross-linkés par des pontages trivalents de type pyridinolines ou pyrroles (Figure 24) [128].

Une dérégulation de l'activité LOX est en partie responsable de la modification des propriétés mécaniques des tissus et peuvent mener au développement de pathologies telles que l'arthrose *in vivo* [176,177]. L'augmentation de la rigidité de la MEC, par la formation excessive de cross-links LOX ou LH-dépendants [135] est notamment un facteur propice à la formation d'un microenvironnement fibrotique favorable au développement tumoral [178] et métastatique [76].

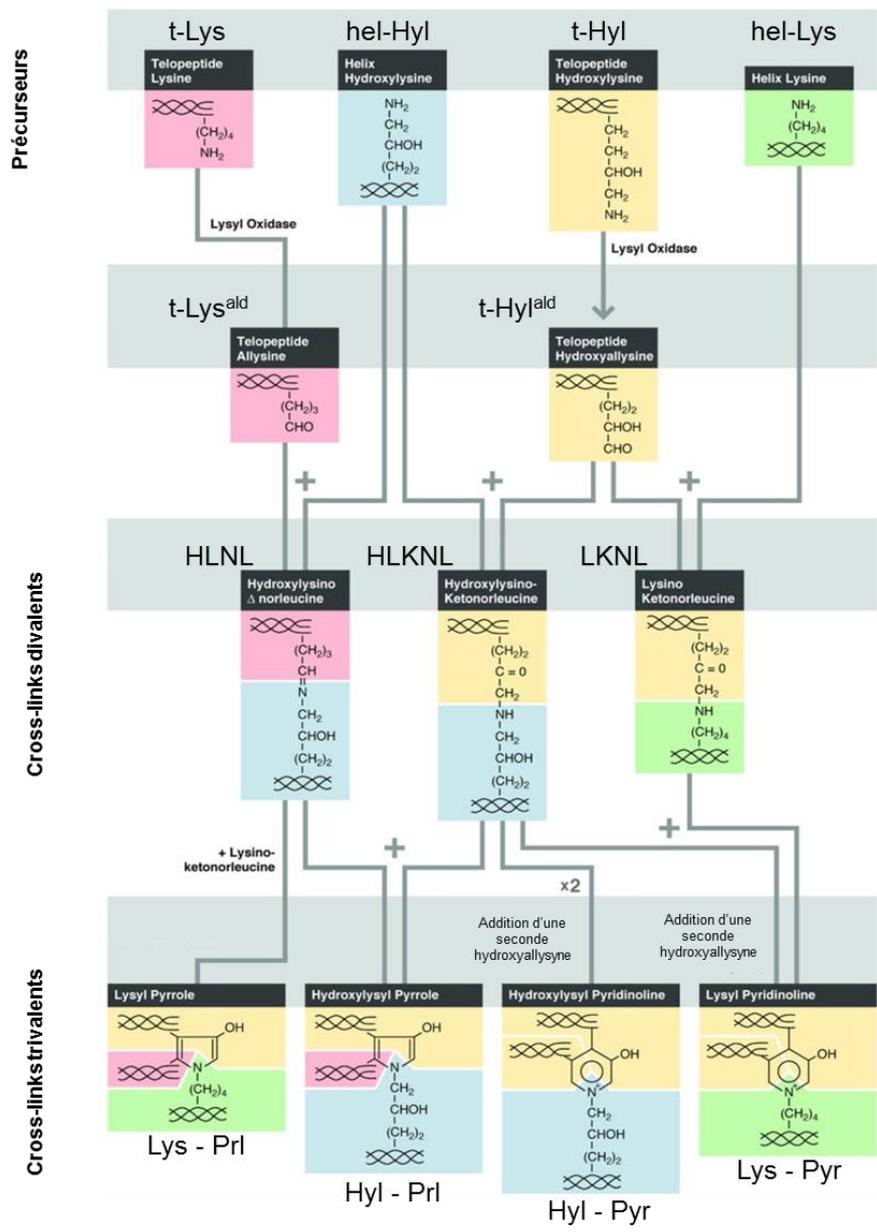


Figure 24 : Voies chimiques prédominante dans le tissu squelettique de formation des cross-links des collagènes initiées par la lysyl oxydase. Alors que le collagène osseux présente des cross-links de type pyrrole et pyridinoline, le cartilage mature ne contient que des pyridinolines. Les différentes lysines et hydroxylysines de la triple hélice ou des télopeptides sont suivies par couleur jusqu'aux structures matures. Adaptée de [129].

Il est intéressant de noter que la LOX est premièrement synthétisée sous forme d'un précurseur N-glycosylé de 48 kDa (417 acides aminés, dont les 21 premiers forment le peptide signal) qui sera clivé par BMP-1 dans le milieu extracellulaire, pour obtenir la forme active de 32 kDa [179,180]. Ainsi une même protéase, BMP-1, est à la fois responsable de la maturation protéolytique de l'enzyme, LOX et de son substrat, le procollagène.

Les groupements aldéhydes particulièrement réactifs créés par la LOX interagissent initialement avec des Lys et Hyl spécifiques du domaine hélicoïdal d'une molécule de collagène voisines pour former des réticulations divalentes. Celles-ci subissent d'autres réactions pour produire des structures matures trivalentes, chimiquement plus stables. Jusqu'à très récemment, le cross-link histidino-hydroxylysinonorlonorine (HHL), qui résulterait de l'addition d'une histidine à un cross-link immature divalent impliquant une Lys aldéhyde télépeptidique, était le seul produit de maturation stable connu dans les tissus mous. Il a cependant été montré qu'il ne serait en fait que purement artefactuel [181].

Le Col I osseux est un cas particulier, en ça qu'il possède des cross-links qui lui sont propres. A partir d'une Lys aldéhyde télépeptidique, un dimère intramoléculaire de type aldol se forme entre les Lys des N-télopeptides des chaînes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , et entre  $\alpha 1$  et  $\alpha 1$  [182]. Ces aldols, peuvent également se former de façon intermoléculaire entre les Lys aldéhydes des  $\alpha 1(I)$  C-télopeptides de molécules de collagènes adjacentes [183].

En outre, les Lys modifiées par des sucres (galactosyl – ou glucosyl – galactosyl – hydroxylysines) peuvent également être impliquées dans la formation de cross-links. Parmi les pontages covalents impliquant la lysine  $\alpha 1(87)$  ou  $\alpha 2(87)$  du Col I, ou la même position dans le Col II, les cross-links divalents / immatures portent à la fois des mono – et des disaccharides. En revanche, les cross-links trivalents / matures de type pyrole ou pyridinoline sont principalement monoglycosylés, suggérant que le niveau de glycosylation régulerait le niveau de maturation des cross-links [184].

#### *1.2.2.8. Les fibripositeurs, des structures dédiées à l'export des molécules de collagène vers le milieu extracellulaire*

Avec les récentes améliorations des techniques d'imagerie, il est devenu possible de générer des reconstructions tridimensionnelles à partir d'images de microscopie électronique à balayage et à transmission. Ces technologies ont notamment permis de visualiser les fibrilles de collagène en cours d'assemblage contenues dans des structures membranaires embryonnaires appelées fibripositeurs [152]. Ces structures, retrouvées dans des fibroblastes de tendon, sont des invaginations de la membrane plasmique dépendantes de l'actine [185], qui forment des projections entre les cellules et qui sont alignées parallèlement à l'axe du tendon (Figure 25). La base de la lumière du fibripositeur, enfouie plusieurs microns dans la cellule, est un site de nucléation de la fibrillogenèse des collagènes. La pointe du fibripositeur est le site de dépôt de fibrilles dans la MEC. Les fibripositeurs disparaissent aux stades postnatals, lorsque le diamètre

des fibrilles de collagène n'augmente plus que par accrétion de collagène extracellulaire, maintenant ainsi le parallélisme du tendon.

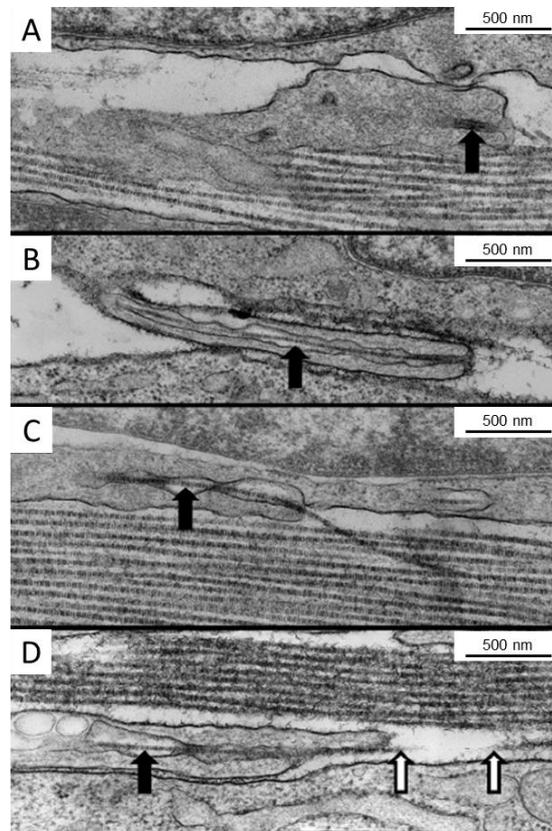


Figure 25 : Les fibripositors sont des structures membranaires qui permettent la nucléation des fibrilles de collagènes et leur dépôt dans la MEC. Image de microscopie électronique à transmission d'un tendon de queue de souris à 15.5 dpc. A. Section montrant la fin d'un fibripositeur. B et C. fibrilles de collagènes (flèches noires) sont continuées depuis le lumen du fibripositeur jusque dans la MEC. Les parois latérales du lumen semblent saisir les fibrilles de collagène. (D) Les compartiments intracellulaires sont souvent associés à la lumière du fibripositeur. Une fibrille est montrée quittant et réintégrant la section (flèches blanches). [152].

### 1.2.3. Structure et assemblage des fibrilles de collagène

La structure des fibrilles de collagène a été abordée principalement par deux approches : la microscopie électronique et la SAXS. Les Col I, Col II, Col III, Col V et Col XI s'assemblent spontanément en fibrilles striées présentant une périodicité axiale caractéristique  $D$  d'environ 67 nm, soit 234 résidus (Figure 26), chaque molécule de collagène mesurant environ  $4.4 \cdot D$  en longueur [186,187]. De nombreuses données obtenues essentiellement sur des fibrilles réassemblées *in vitro* après extraction acide des molécules de collagène [188,189], ont également été vérifiées pour les fibrilles hétérotypiques du cartilage et du corps vitré de l'œil contenant les Col II, Col IX et Col XI [190].

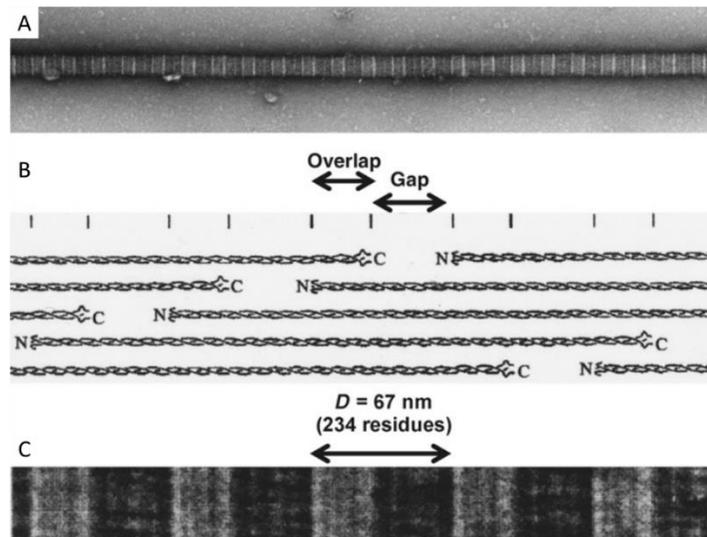


Figure 26 : Structure axiale périodique des fibrilles de collagène. (A) Fibrille de collagène isolée d'un tendon métatarsal d'un embryon de poulet de 18 jours, marquée négativement avec 2% d'acétate d'uranyl. (B) Représentation schématique de l'arrangement dans l'espace des molécules de collagènes assemblées en fibrilles. (C) Fibrille de collagène reconstituée à partir d'un extrait bovin de peau soluble dans l'acide acétique puis marquée négativement par l'acide phosphotungstique de sodium (1%, ph 7). Le marquage strié est permis par la pénétration préférentielle du marquage dans les régions « gap » où l'assemblage est moins dense [191].

De nombreux modèles d'assemblages des molécules de collagènes en fibrilles ont été proposés, notamment sur la base des données de cristallographies, et suggéraient un pré-assemblage en micro-fibrilles des collagènes (de 2, 4, 5, 7 ou 8 molécules), elles-mêmes assemblées par la suite en fibrilles. Des contradictions ont cependant mené Hulmes et Miller à réinterpréter les données obtenues jusqu'alors et proposer un modèle d'assemblage des collagènes qui fait consensus depuis maintenant presque 40 ans. Ce modèle propose que 5 molécules de collagène s'assembleraient en un réseau quasi-hexagonale [192] et est supporté par de plus récentes données à haute résolution obtenues au synchrotron qui ont permis d'affiner le modèle [193].

#### 1.2.3.1. Croissance des fibrilles de collagène

La croissance des fibrilles de collagène semble se produire en trois étapes : (i) nucléation, (ii) croissance par accréation de monomère (ou de petits oligomères) à la surface de la fibrille puis (iii) fusion interfibrillaire. Les télépeptides des collagènes fibrillaires (16 et 25 acides aminés aux extrémités N- et C-terminale du Col I, respectivement) sont essentiels pour orienter et polariser l'assemblage des fibrilles *in vitro*. En effet, la perte partielle de l'un ou l'autre télépeptide conduit à un processus d'assemblage moins efficace [194].

Après nucléation, la croissance des fibrilles de collagène semble suivre le modèle « SNAP » (*surface nucleation and propagation*), qui implique l'accrétion et la propagation à la surface de la fibrille comme déterminant majeur de la taille et de la forme des fibrilles. La croissance longitudinale se fait en partie par fusion interfibrillaire de fibrilles en cours d'élongation (Figure 27) ainsi que par accrétion moléculaire. En effet, les fibrilles de collagène peuvent exister sous deux formes : unipolaire ou bipolaire. Des fibrilles isolées à partir d'un tendon embryonnaire de poulet, principalement composées de Col I, présentent soit une extrémité C-terminale et une extrémité N-terminale, soit deux extrémités N-terminales et une région de commutation de polarité moléculaire (ou zone de transition) dans laquelle l'orientation des molécules de collagène bascule, par exemple de N à C, ou de C à N [195]. Alors que les fibrilles N, N-bipolaires sont couramment décrites, il semblerait que les fibrilles C, C-bipolaires n'existent pas, les extrémités C-terminales des fibrilles favorisant la fusion interfibrillaire [196].

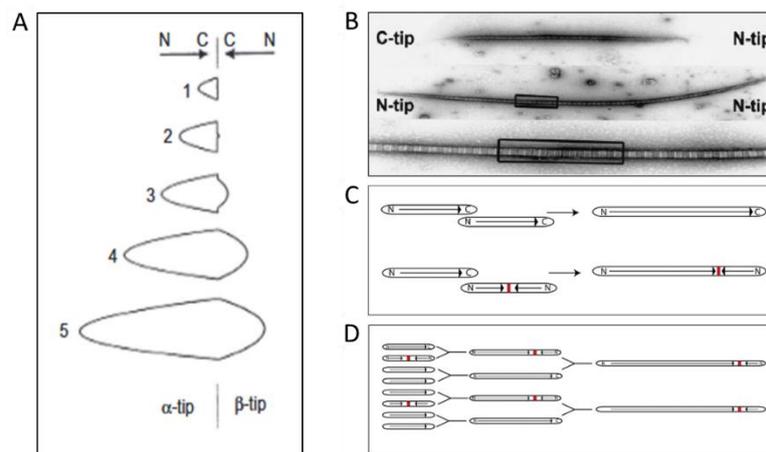


Figure 27 : La croissance en longueur des fibrilles de collagènes implique l'accrétion de molécules de collagène à la surface puis la fusion de fibrilles plus courtes. (A) Croissance de fibrilles de collagène à partir de procollagène purifié dans un système acellulaire. (B) Fibrilles unipolaire et N, N-bipolaire isolées à partir d'un tendon embryonnaire de poulet et négativement marqué à l'acétate d'uranyl. La zone de transition de polarité est encadrée et agrandie. (C) La fusion des extrémités des fibrilles requiert une extrémité C-terminale de fibrille unipolaire. Une fusion de extrémités N-terminale n'est jamais observée. (D) Ainsi une population mixte de fibrilles unipolaires et N, N-bipolaire conduira in fine à une population stable de fibrilles bipolaire ne pouvant plus fusionner. [197].

Le modèle SNAP est par ailleurs applicable à la croissance des fibrilles N, N-bipolaires présentes, avec les fibrilles unipolaires, dans les tissus des organismes vertébrés, et permet dans

ce dernier cas d'expliquer l'augmentation continue du diamètre des fibrilles dans le tendon postnatal. Il est par ailleurs vérifié *in vitro* par l'observation de la croissance des fibrilles de collagène de type I produite dans un système acellulaire : l'assemblage des fibrilles est amorcé en mélangeant du C-pro-collagène qui retient le C-propeptide, avec une procollagène C-protéinase, qui va le libérer, permettant alors la fibrillogenèse *in vitro*. Les fibrilles résultantes sont N, N-bipolaires avec une extrémité mince ( $\alpha$ -tip) et une autre plus grossière ( $\beta$ -tip) [197].

Certains **échinodermes**<sup>7</sup> sont totalement dépourvu de fibrilles unipolaires [198]. Cependant, les fibrilles de collagène se développent en l'absence de fusion interfibrillaire. Au lieu de cela, elles se développent entièrement par accréition de molécules sur un seul noyau de fibrilles. Ces fibrilles exclusivement de type N, N-bipolaire, ont la région de transition de polarité à mi-chemin de la longueur de la fibrille, et des molécules unidirectionnelles de part et d'autre de sorte que les extrémités N-terminales des molécules pointent vers les extrémités.

#### 1.2.3.2. *Contrôle extrinsèque de l'assemblage des fibrilles de collagène*

Les modèles proposés de croissance des fibrilles de collagènes, largement supportés par des études *in vitro*, semblent dénoter une capacité intrinsèque des molécules de collagènes à l'auto-assemblage qui serait contenue dans la séquence primaire et la structure en triple hélice des molécules de collagène [199]. Cependant, les fibrilles de collagène *in vivo* sont des polymères hétérotypiques d'une remarquable complexité, composés d'éléments centraux, les collagènes fibrillaires, et des nombreuses molécules associées à la surface (collagènes fibrillaires minoritaires, collagènes non-fibrillaires, PGs, glycoprotéines...). La formation de fibrilles *in vivo* impliquerait alors un contrôle extrinsèque afin de réguler à la fois leur diamètre et leur organisation tridimensionnelle spécifique, notamment de façon tissu-dépendant [30].

##### 1.2.3.2.1. *Contrôle par d'autres types de collagènes : le rationnel des hétérofibrilles*

Il semble clair que le diamètre et la forme des fibrilles sont affectés par des mutations de gènes codant les collagènes fibrillaires. Il en va de même pour les collagènes minoritaires auxquels ils s'associent dans les hétérofibrilles. Par exemple, tels les collagènes de type XII (Col XII) et XIV (Col XIV), deux FACITs, se lient en surfaces des fibrilles de Col I et régulent la fibrillogenèse dans la cornée [200]. Le Col XI joue un rôle critique dans l'assemblage des fibrilles de Col II en tant que nucléateur (Figure 28) et permet de limiter leur croissance latérale

---

<sup>7</sup> Embranchement d'animaux marins benthiques présents à toutes les profondeurs océaniques, regroupent actuellement cinq classes : étoiles de mer (Astérides), oursins (Echinides), concombres de mer (Holothuries), Crinoïdes et Ophiures.

[201]. En effet, le Col II seul produit des fibrilles bien plus épaisses qu'au sein d'un mélange avec le Col XI, qui aboutit à des fibrilles uniformes et de diamètre inférieur à 20 nm. Des souris présentant un défaut pour la chaîne  $\alpha 1(XI)$  développent une chondrodysplasie sévère, caractérisée par des fibrilles de collagènes particulièrement épaisses, et une désorganisation spatiale totale de la plaque de croissance [202,203].

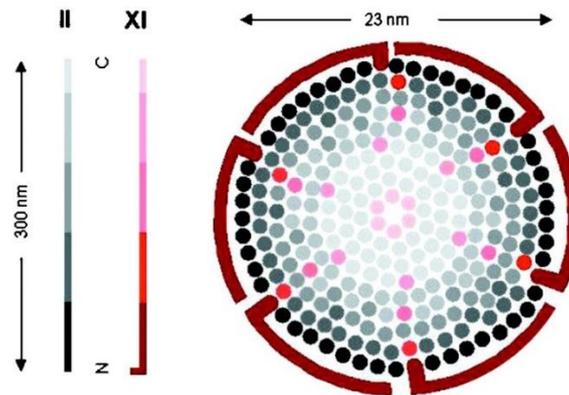


Figure 28 : Modèle structural pour la limitation du diamètre des fibrilles hétérotypiques de collagène II / XI. (Gauche) Les molécules de collagène II et XI sont représentées par des cylindres de 300 nm, chacun étant constitué de segments de  $4,5 D$  ( $D = 67 \text{ nm}$ ) représentés par différentes nuances de gris (collagène II) ou rouge (collagène XI). La largeur des molécules représentée sur le schéma est exagérée par rapport au véritable ratio  $200 : 1$  (longueur : largeur). (Droite) Coupe transversale d'une fibrille hétérotypique présentant les molécules de collagène II et XI sous forme de cercles gris et rouge, respectivement. La nuance des molécules indique les positions axiales relatives des molécules dans la fibrille, en tenant compte de la distribution  $D$  intermoléculaires.

Le domaine N-terminal du collagène mature XI est représenté par une courte projection perpendiculaire à l'hélice principale à la surface de la fibrille et l'extrémités C-terminales au cœur de la fibrille. Le domaine N-terminal du collagène XI est présenté comme un domaine structural recouvrant huit molécules adjacentes de collagène de type II, empêchant ainsi une croissance supplémentaire en diamètre, tandis que la majeure partie de chaque molécule de collagène XI est enfouie à l'intérieur de la fibrille.

De même, une invalidation du gène du Col V l'a montré à la fois comme étant un nucléateur essentiel à la fibrillogenèse des fibrilles de Col I, et comme régulateur du nombre de fibrilles et de leur diamètre (Figure 29 - [204]). En effet, *in vitro*, le diamètre des fibrilles de Col I diminue avec une concentration croissante en Col V [205].

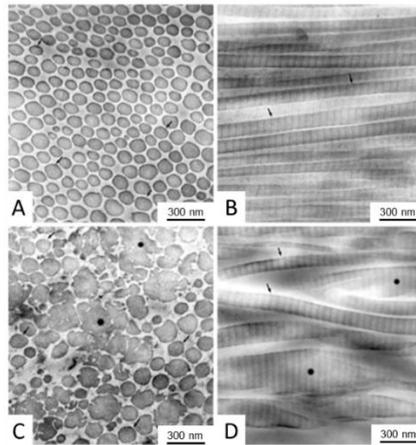


Figure 29 : Les fibrilles de collagène sont anormales chez les mutants adultes hétérozygotes Col5a1<sup>+/-</sup>. Microscopie électronique à transmission du derme profond de souris âgées de 12 semaines sauvages (A – B) et de souris mutantes (C – D) en section transversale (A - C) et longitudinale (B - D). Alors que les fibrilles sauvages sont homogènes dans leur diamètre, deux populations de fibrilles sont observables pour les animaux col5a1<sup>+/-</sup> : fibrilles cylindriques comparable à celles observées dans le derme de type sauvage, mais de plus grand diamètre (petites flèches), et très grosses fibrilles hétérogènes aux contours très irréguliers (\*) [204].

#### 1.2.3.2.2. Contrôle par les proteoglycanes

De nombreux PGs ont été décrit pour fixer les fibrilles de collagènes, et notamment les SLRPs, parmi lesquels : décorine [206,207], lumican [208], fibromoduline [209,210], ou asporine [211] notamment (pour revue, voir [212]). En recouvrant les fibrilles sur leurs longueurs, mais pas les extrémités, les PGs favorisent la fusion interfibrillaire tout en inhibant la fusion côte à côte, et donc l'agrégation des fibrilles en cours de formation. Leur implication dans la régulation de la fibrillogenèse et de la mise en place des MECs s'illustre dans de nombreuses études réalisées *in vivo* sur des souris KO pour des SLRPs. Des exemples notables de dysfonctionnement des tissus conjonctifs suite à ces invalidations sont exposés dans le Tableau 2 [212]. Que ce soit la protéine cœur seule d'une part [213], ou les chaînes de GAGs associées, ces deux composantes des PGs semblent essentiels à la régulation de la fibrillogenèse et la croissance latérale des fibrilles.

Ainsi, le domaine variable de la décorine, qui porte notamment des chaînes de chondroïtine et dermatane sulfate, régule le diamètre et la forme des fibrilles de collagène, en fonction de la teneur en acide uronique ([214] - Figure 30).

Tableau 2 : Distribution des SLRPs dans les tissus et phénotype lié aux collagènes des souris KO. Noter que l'expression des SLRPs au sein des différents tissus est régulée dans le temps et n'est pas largement caractérisé. Adapté de [212].

SLRP	Expression spatiale	Phénotype des souris KO	Régulé à la hausse dans
<b>Biglycan (BGN, PGS1)</b>	Peau, tendon, os, cartilage, reins, muscle, prédentine, PDL (ligament périodontal)	Réduction de la masse osseuse, rupture de l'aorte, tendons fragiles	Fibrose, athérosclérose
<b>Decorin (DCN, PGS2)</b>	Peau, tendon, cartilage, reins, muscle, prédentine, PDL (ligament périodontal)	Peau et tendons fragiles, faible résistance des voies respiratoire, cicatrisation et angiogenèse ralenties	Fibrose, cancer, athérosclérose
<b>Asporin (ASPN)</b>	Foie, cœur, aorte, utérus, perichondre, perioste, prédentine, PDL	-	Sclérodémie, arthrite
<b>Fibromoduline (FMOD)</b>	Tendon, ligament, cartilage, prédentine, PDL	Tendons fragile et arthrite	Fibrose, cancer, athérosclérose
<b>Lumican (LUM)</b>	Ubiquitaire	Peau fragile et cornée opaque	Sclérodémie, cancer

Par ailleurs, alors que les deux formes de décorine (protéine cœur seule, ou avec ses chaînes de GAGs) inhibent la fibrillogenèse *in vitro*, le contrôle du diamètre des fibrilles de collagène exige la présence des chaînes de GAGs [215]. La présence de décorine résulterait en des tissus qui sont davantage en mesure de résister aux forces de traction, notamment *via* une augmentation du diamètre des fibrilles de Col I.

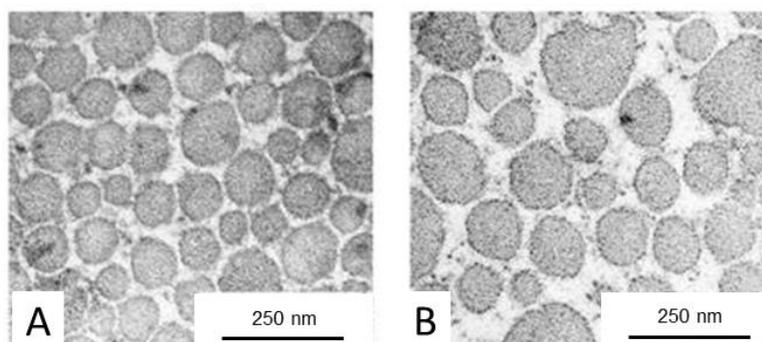


Figure 30 : Les fibrilles de collagène apparaissent anormales chez les mutants homozygotes pour la Dermatan sulfate epimerase 1 ( $Dse^{-/-}$ ). Microscopie électronique à transmission en coupe transversale de fibrilles de collagènes du derme de souris sauvage (A) ou mutante (B) pour *Dse*. Les fibrilles de collagènes mutantes sont plus épaisses et moins empacées que les fibrilles du derme de type sauvage [214].

La décorine peut également lier simultanément les microfibrilles de collagène de type VI (Col VI) avec les microfibrilles de Col I [216] ou Col II en association avec d'autres protéines [217], lui conférant alors un rôle dans la liaison des différents types de collagènes au sein des hétérofibrilles. Enfin, les chaînes de GAGs de la décorine et d'autres SLRPs peuvent également interagir avec les FACITs, tels que les Col XII et Col XIV, pour agir de concert dans la régulation de la fibrillogenèse [218]. Les PGs joueraient également un rôle dans le contrôle des MPTs des collagènes, en amont de la fibrillogenèse. En effet, de récentes données suggèrent un mécanisme de régulation des cross-links des collagènes dépendant de la fibromoduline, dans lequel ce PG, en interagissant avec les collagènes ou avec leurs enzymes de modifications (notamment LOX), régulerait l'accès de l'enzyme à ses sites de réticulation spécifiques [183].

## 1.3. MATRICES EXTRACELLULAIRES DES TISSUS MINERALISES

La biominéralisation, qui se caractérise par le dépôt de minéraux dans un substrat organique, est le processus par lequel des organismes vivants produisent des tissus durs spécifiques, indispensables aux mouvements et au soutien (squelette interne ou externe), à la mastication (dents), la protection ou la défense (coquillages, écailles, épines, carapaces) et d'autres fonctions aussi importantes que la régulation du métabolisme du calcium, du phosphate et d'autres électrolytes, ou la régulation hormonale [219]. Chez les Vertébrés, la minéralisation (ou calcification) est principalement orchestrée par deux types de cellules : les chondrocytes et les ostéoblastes, qui vont déposer des minéraux phospho-calciques sur une phase organique principalement collagénique. La minéralisation est donc directement dépendante et est conditionnée par la MEC, et les fibrilles de collagène ont longtemps été considérées comme l'unique facteur capable d'induire le dépôt de cristaux d'apatite par un processus de nucléation hétérogène. Pourquoi les tissus mous, riches en collagènes également, ne minéralisent-ils donc pas (en conditions physiologique du moins...) ? Comment le ciment (tissu conjonctif spécialisé des dents) peut minéraliser, en l'absence de collagènes ? Ce n'est que plus tard que le rôle régulateur ou de co-facteurs de protéines non-collagéniques a été montré comme permettant le dépôt minéral [220]. Par ailleurs, l'implication de vésicules matricielles permettant l'accumulation de calcium et phosphate semble aussi être un élément déterminant dans ce processus.

### 1.3.1. Ossification endochondrale

Chez les Vertébrés, tout au long du développement, l'ossification joue un rôle crucial dans la mise en place du squelette qui leur apportera l'architecture, la motilité et la protection nécessaires. Les composants squelettiques de la colonne, du bassin et des membres se forment par ossification endochondrale, tandis que la majorité des os du visage et du crâne se forment via une ossification intramembranaire, impliquant la conversion directe de cellules mésenchymateuse non différenciées en ostéoblastes. Seule l'ossification endochondrale sera développée ici. Elle fait intervenir de nombreuses modifications de la MEC, dans une suite d'évènements strictement organisés au sein du cartilage de croissance (Figure 31) et débute avec la formation d'un patron cartilagineux, qui sera progressivement remplacé par de l'os.

La chondrogenèse commence par la migration de cellules mésenchymateuses pre-chondrocytaires dans les zones prédisposées à former le squelette, où elles vont se condenser

(augmentation du nombre de cellules par invasion du tissu sans augmentation de la prolifération cellulaire) [221] et ainsi en former un patron cartilagineux. C'est à ce moment que la position, la forme et le nombre d'os sont fixés. A ce stade, la MEC est composée essentiellement de Col I et de FN [222]. La différenciation en cellules dites chondroprogénitrices, puis en chondrocytes fonctionnels matures marque un changement dans la composition de la MEC qui devient cartilagineuse, notamment avec l'arrêt de la production de Col I [223], au profit d'une synthèse importante de Col II [224,225] et de Col IX [226], et de PGs, notamment aggrecane [227,228]. Les chondrocytes, enfermés dans des logettes, acquièrent une morphologie arrondie caractéristique. Ces cellules se trouvent principalement dans les zones de repos et de prolifération de la plaque de croissance du cartilage. Enfin, c'est dans les parties inférieures du cartilage de croissance que l'on trouve les chondrocytes en différenciation terminale, appelés chondrocytes hypertrophiques. Les marqueurs de l'hypertrophie chondrocytaire sont l'augmentation de l'expression du Col X (au contraire du Col II), l'expression de Runx2 et de la metalloprotéinase-13 (ou collagénase 3).

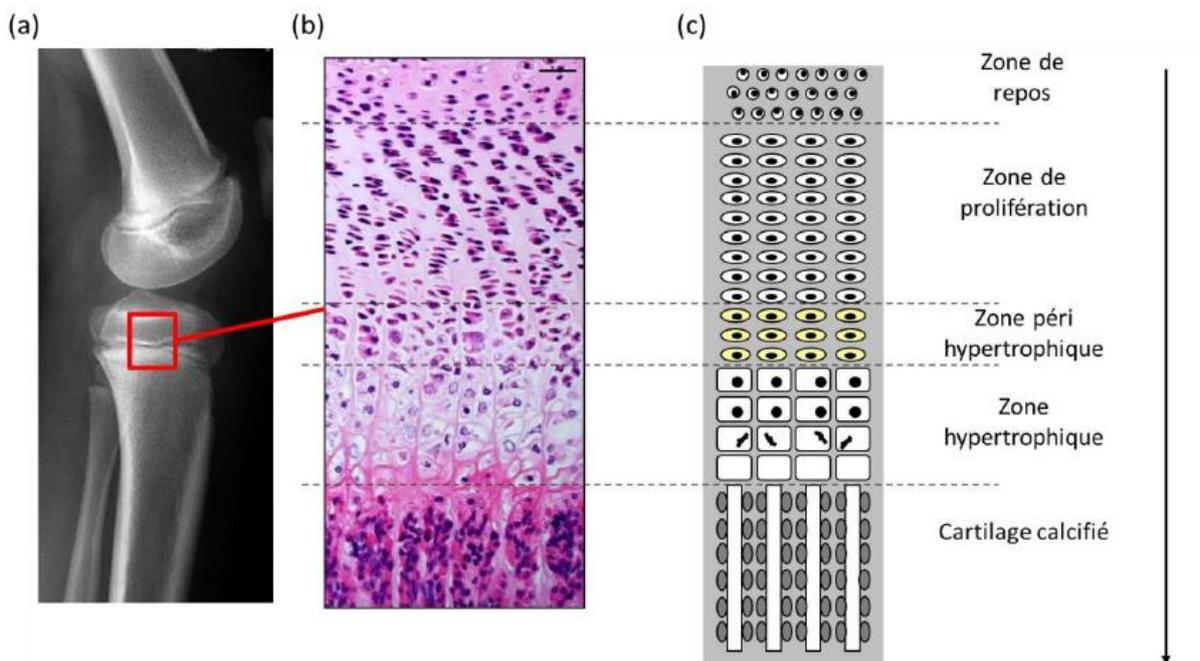


Figure 31 : (a) Radiographie d'un genou d'enfant. (b) Section longitudinale de la plaque de croissance proximale d'un tibia de souris âgée de 3 semaines. Barre : 50  $\mu\text{m}$  ; coloration Hématoxylin – Eosine. (c) Schématisation d'une coupe longitudinale de la plaque de croissance. Flèche : sens de différenciation des chondrocytes progéniteurs depuis l'épiphyse en direction de la métaphyse, afin de permettre la croissance des os dans le sens de la longueur. (Source : <https://blogs.ncl.ac.uk/katarzynapirog/how-do-long-bones-grow/>. Consultée le 20/08/2019).

Finalement, les chondrocytes vont produire une MEC minéralisée suite au dépôt de précurseurs de cristaux d'hydroxyapatite (HA) et entrer en apoptose, laissant des travées de cartilage calcifié sur lesquelles les ostéoblastes, apportés par la circulation envahissante, vont progressivement déposer une matrice osseuse [229] minéralisée et essentiellement composée de Col I. La récente mise en évidence de la transdifférenciation d'une sous-population de chondrocytes hypertrophiques en ostéoblastes, qui échappent ainsi à l'apoptose, durant l'ossification enchondrale [13–15] a cependant remis en question ce dogme.

### 1.3.2. Régulation de la phase minérale

La composition, l'ultra-structure et l'organisation de la phase minérale des os sont essentielles à ses propriétés mécaniques [230]. Chez les Vertébrés, la minéralisation se fait par l'agrégation de cristaux de HA, une apatite carbonatée, de formule  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

#### 1.3.2.1. Phosphate et pyrophosphate inorganiques

*In vivo*, le pyrophosphate inorganique (PPi), en se fixant aux précurseurs de cristaux d'apatite, est un inhibiteur à faible concentration et de manière dose-dépendante de la minéralisation [231]. Sa dégradation en phosphate inorganique (Pi) par la TNAP (phosphatase alcaline non spécifique de tissu) favorise la biominéralisation, car le Pi entre directement dans la composition des cristaux de HA. Il est par ailleurs retrouvé en concentration élevée dans la zone hypertrophique.

La régulation des apports en minéraux au sein de la MEC se fait *via* des vésicules matricielles (MVs) dérivées d'ostéoblastes ou de chondrocytes. Les MVs semblent initier la minéralisation en fournissant un environnement optimal pour l'accumulation de calcium et de phosphate, facilitant la nucléation et la formation de cristaux de HA qui sont libérés dans le milieu extracellulaire, où calcium et phosphate extracellulaires participent au processus de minéralisation [232]. Les MVs sont des vésicules de tailles hétérogènes, formées par bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules qui les produisent et qui présentent un contenu protéique spécifique et des protéines de surfaces différentes de leurs cellules mères. Outre leur rôle de stockage, ce sont des acteurs indispensables de la régulation de la minéralisation, *via* le contrôle du ratio Pi/PPi (Figure 32). Les MVs contiennent notamment deux enzymes, NPP1 (la nucleotide pyrophosphohydrolase qui converti les nucleotides triphosphates extracellulaire en PPi extracellulaire, ou ePPi) et la TNAP (qui converti l'ePPi en Pi extracellulaire) [233,234]. La TNAP, qui est un marqueur de l'hypertrophie chondrocytaire

[235], est une enzyme membranaire dont le site catalytique est extracellulaire. Son implication dans le processus de minéralisation a notamment été suggérée par l'hypophosphatasie, une pathologie génétique rare caractérisée par une hypominéralisation sévère et généralisée [236] et qui résulte d'une mutation du gène *TNAP*. Ce phénotype est également retrouvé dans des souris invalidées pour ce gène [237].

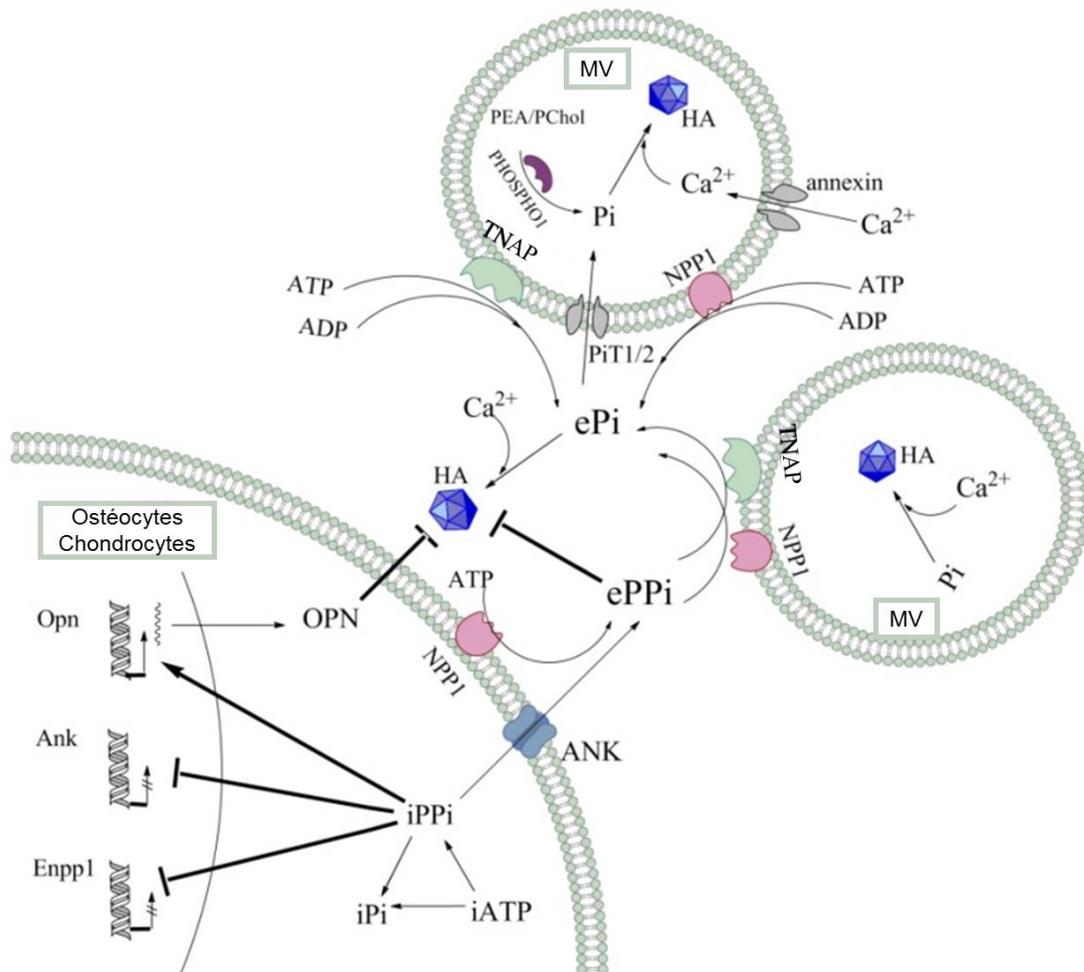


Figure 32 : Représentation schématique de la régulation de la balance  $Pi / PPi$  impliquée dans la minéralisation médiée par les MVs. Les cristaux de HA sont composés de  $Pi$  et de  $Ca^{2+}$ . Dans les MVs, le  $Pi$  est importé par des transporteurs de phosphate  $PiT1/2$  (en gris), ainsi que par l'hydrolyse des phosphomonoesters PEA et PChol par la phosphatase PHOSPHO1 (en violet), et le  $Ca^{2+}$  est importé par les annexines (gris). Le pool d'ePPi est obtenu à la fois par l'hydrolyse d'ATP catalysée par NPP1 (rose) et par l'export vers le milieu extracellulaire de de iPPi via transporteur ANK (bleu), au niveau des membranes de chondrocytes et d'ostéoblastes. La TNAP, et en moindre mesure NPP1, contribuent également à entretenir le pool d'ePi par leur activité ATPase et ADPase. De plus, une boucle de rétroaction négative existe en intracellulaire. Le PPi, produit par NPP1 et internalisé via ANK, inhibe

*l'expression des gènes Enpp1 (codant NPP1) et Ank, et induit l'expression de l'OPN, inhibant ainsi la propagation et la croissance des cristaux de HA. Adapté de [238].*

Le rôle du Pi et du PPi dans la minéralisation va cependant bien au-delà de leur rôle de constituant inorganique des MEC. En tant que facteur pro-minéralisant puissant, le Pi contribue à la régulation de la différenciation chondrogénique et hypertrophique [239,240], et de l'expression de protéines impliquées dans la minéralisation, tels que le Col X [240], Runx2 [241], ou l'OPN [242]. Dans cette dernière étude, la minéralisation n'a cependant pas été investiguée. *Ex vivo*, l'ajout de phosphate dans des culture d'explant osseux de rat promeut la synthèse de collagène [243]. Au contraire, la présence ubiquitaire du PPi permet notamment de prévenir la minéralisation des tissus mous *via* au moins trois mécanismes distincts : la liaison directe aux minéraux, l'expression accrue de l'OPN dans sa forme inhibitrice de la minéralisation (voir §1.3.4.), et la diminution de l'activité ALP [244].

#### *1.3.2.2. Perte de l'équilibre Pi/PPi*

La régulation de la balance, précaire, entre Pi et PPi est indispensable au maintien de l'homéostasie des tissus. Les pathologies rénales chroniques peuvent altérer cet équilibre, et conduire soit à une hyperphosphatémie, soit au contraire à une diminution du PPi, conduisant dans les deux cas à la calcification indésirable du système vasculaire [245]. De même, des patients atteints d'ACDC (*arterial calcification due to deficiency of CD73*), une pathologie autosomale récessive résultant d'une perte de fonction du gène *NT5E* codant le CD73, présentent une activité TNAP régulée à la hausse et donc une perturbation de l'équilibre Pi/PPi qui conduit à une calcification progressive des artères des membres inférieurs et, *in fine*, à leur ischémie [246].

La calcification anormale du cartilage affecte une grande partie de la population vieillissante. Dans le cartilage, lorsque le PPi est en excès, il conduit à la formation de cristaux de calcium de pyrophosphate dihydratés (CPPD) : c'est une chondrocalcinose. En revanche, une balance qui pencherait vers un excès de Pi conduirait au dépôt aberrant de cristaux de phosphate basique (CPB) comme le HA, tels que l'on en retrouve dans l'arthrose. Les CPPD et les CPB sont retrouvés chez plus de 20% des personnes âgées de 60 ans et plus, et dans 60% des fluides synoviaux de patients ayant subi une arthroplastie [247].

### **1.3.3. Régulation de la minéralisation par les protéoglycanes**

La minéralisation du tissu osseux s'accompagne de changements dans sa composition en PGs. On observe une diminution globale du contenu en PG, en parallèle d'un changement qualitatif en GAGs [248], ce qui permettrait de favoriser la prise de volume de la phase minérale. Les SLRPs, qui sont de remarquables régulateurs de la fibrillogenèse des collagènes [212], sont également la classe de PG la plus impliquée dans la régulation de la minéralisation.

L'asporine dispose de deux domaines fonctionnels distincts : le premier, en N-terminal, est un domaine variable avec une queue polyaspartate qui présente une forte affinité pour le calcium, et le second, en C-terminal, est un domaine de fixation aux collagènes. Ces deux domaines semblent travailler de concert en faveur de la minéralisation. Cette fonction est semblable à celle portée par d'autres domaines riches en aspartates, notamment dans l'OPN. La fixation de l'asporine ainsi que sa fonction promotrice de la minéralisation peuvent toutes deux être inhibées par la décorine, l'un des SLRPs majoritaire dans les tissus minéralisés [211].

De manière cohérente, *in cellulo* [249] et *in vivo* par implantation de cellules modifiées dans des souris [250], la surexpression de la décorine conduit à un retard de minéralisation, en accord avec l'accélération de la minéralisation observée quand elle est en défaut. Cette action inhibitrice serait vraisemblablement secondaire à la désorganisation des fibrilles de collagène, ou au manque d'accès des minéraux aux sites de nucléation. En effet, la décorine est un SLRP qui se fixe aux abords de la région « gap » sur les fibrilles de collagène [207].



Figure 33 : La teneur en minéraux est sévèrement réduite à l'âge de 2 mois chez les animaux doubles mutants. Analyse par imagerie électronique quantitative rétrodiffusée de fémur de souris sauvage, déficiente en biglycan ou double déficiente en biglycan et en décorine. La teneur en minéraux est indiquée par l'échelle de couleur de droite, dans laquelle les valeurs les plus élevées sont indiquées en bas de l'échelle. Une teneur réduite en minéraux est observée à la fois chez les animaux simples et doubles déficients, par rapports animaux sauvages [251].

Un phénotype opposé est observé dans le cas du biglycan, un autre SLRP très semblable structurellement à la décorine. La surexpression *in cellulo* ou par implantation de cellules modifiées *in vivo* [252] accroît grandement la minéralisation et la différenciation ostéoblastique, en accord avec des données *in vitro* d'étude d'accrétion de cristaux de HA sur des gels de gélatine [253]. Étonnamment, les souris déficientes pour la décorine ne présentent qu'un phénotype osseux léger, alors que les doubles mutants décorine<sup>-/-</sup> biglycan<sup>-/-</sup> sont caractérisés par une ostéopénie sévère, mimant les SED (Figure 33 - [251]).

Les effets d'une déficience en un SLRP en particulier sont spécifiques des tissus [251] et l'expression d'un phénotype dépend de multiples variables, notamment leur niveau d'expression et la synergie qui peut exister entre différents SLRP (et probablement d'autres macromolécules). Ainsi, bien que l'effet des SLRPs sur la biominéralisation ne soit pas encore totalement élucidé, il est clair à la lumière des phénotypes induits par leur déficience qu'ils sont des éléments clés de la régulation fine de ce processus, probablement de par leur fonction essentielle dans la régulation de la formation des pontages covalents.

#### **1.3.4. Régulation de la minéralisation par les protéines non-collagéniques**

De nombreuses protéines non-collagéniques (PNCs) assument la fonction de régulateur de la minéralisation. L'ostéocalcine (OC) et l'OPN, qui sont parmi les plus abondantes des protéines dans le tissu osseux après les collagènes, affectent les propriétés de la MEC par leur action sur les cristaux de HA, pour lesquels ils ont une très forte affinité.

L'OPN (ou *secreted phosphoprotein-1* – *SPPI*), est une glycoprotéine dont l'activité est hautement régulée de manière post-traductionnelle. L'OPN ne compte en effet pas moins de 29 sites potentiels de phosphorylation. Dans sa forme majoritaire (13 des 29 sites sont phosphorylés), l'OPN est un inhibiteur puissant de la minéralisation, à l'inverse de la forme hyperphosphorylée qui la promeut, et de la forme non-phosphorylée qui n'agit pas sur la minéralisation [254].

Les Gla protéines dépendent de l'activité glutamate  $\gamma$ -carboxylase (GGCX) qui modifie un résidu acide glutamique (Glu) en acide  $\gamma$ -glutamique (Gla). L'OC est une petite protéine d'une cinquantaine d'acides aminés de la famille de protéines Gla, aussi appelée *Bone Gla Protein* (*BGP*). La présence de Gla confère à l'OC une forte affinité pour le calcium qui lui permet de favoriser les dépôts de minéraux dans la matrice osseuse [255]. Dans leur forme carboxylée, la

*Matrix Gla Protein* (MGP) et la *Gla – Rich Protein* (GRP) sont des inhibiteurs puissants de la calcification, en particulier de la paroi des vaisseaux sanguins [256]. La GGCX nécessite la présence de vitamine K comme cofacteur enzymatique, et la carence en cette vitamine est souvent associées chez les personnes âgées et plus particulièrement chez les femmes ménopausées à un dysfonctionnement de la biominéralisation (diminution de la densité osseuse et calcification artérielle) [256]. En particulier, l'absence de MGP carboxylée a été décrite dans des chondrocytes de patients atteints d'arthrose et pourrait être à l'origine de la calcification inappropriée du cartilage [257].

L'utilisation de souris invalidées pour OC, OPN ou de double mutants OC<sup>-/-</sup> OPN<sup>-/-</sup> a permis de montrer que l'OC est un régulateur essentiel de la taille et de la morphologie des cristaux d'apatite, alors qu'OPN agit comme nucléateur de la minéralisation et régule notamment la composition en éléments traces (Mg, S, F, Na) des cristaux et leur croissance (Figure 34 ; [258]). A l'échelle macroscopique, alors que les os de souris OC<sup>-/-</sup> ou OPN<sup>-/-</sup> ne présentent pas de différences morphologiques avec les souris sauvages, suggérant une redondance fonctionnelle, les souris double mutant, plus petites, présentent une zone corticale des os plus épaisse, probablement de manière à compenser la perte de l'organisation microstructurale [259].

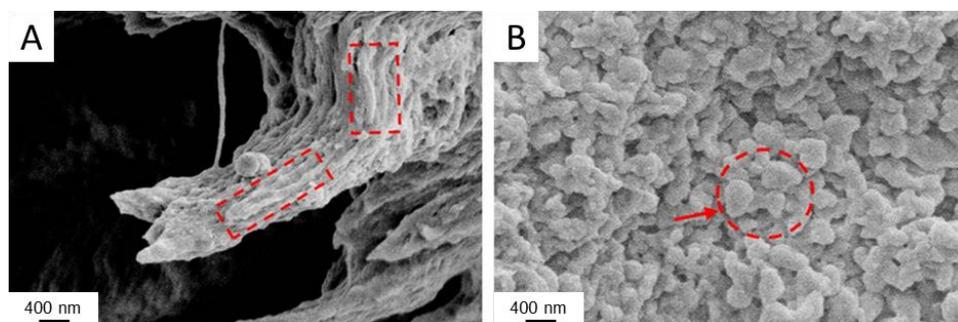


Figure 34 : L'organisation des minéraux est perturbée dans les souris double mutant OC<sup>-/-</sup> OPN<sup>-/-</sup>. Analyse au microscope électronique à balayage (MEB) des os de souris sauvages (A) ou double mutant OC<sup>-/-</sup> OPN<sup>-/-</sup> (B). Le minéral présent dans les souris sauvages à un aspect longiligne (contour rectangulaire en pointillé rouge), et orientée dans la direction de la fibrille de collagène. En revanche, dans les os des souris OC<sup>-/-</sup> OPN<sup>-/-</sup>, les cristaux sont arrondis, en forme de plaques (flèche) qui forment des agrégats (contour circulaire en pointillé rouge). Adapté de [258].

### 1.3.5. Régulation de la minéralisation par les collagènes

La nucléation des cristaux d'apatite dans les tissus minéralisés commence sur les fibres de collagènes au niveau des régions « gap » (Figure 35) à proximité immédiate des résidus

impliqués dans la formation des cross-links entre les molécules de collagène [260]. L'assemblage périodique des molécules de collagènes, et la présence si caractéristique des régions « gap » alignées les unes avec les autres, permet notamment la formation d'un canal favorisant la nucléation de l'HA [261].

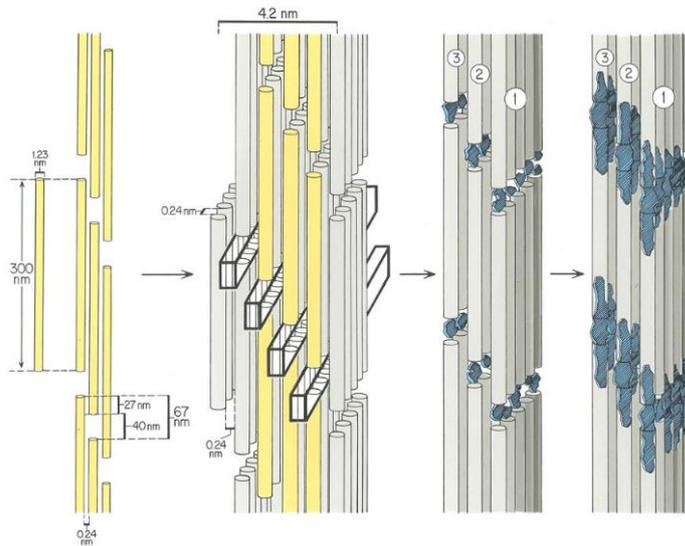


Figure 35 : Les dépôts de minéraux intra fibrillaires se font dans les zones « gap », entre les molécules de collagènes [261].

La minéralisation se poursuit ensuite tout au long des fibrilles, dans l'espace interfibrillaire (Figure 36 ; [262]). Les cristaux de HA, allongés, à l'apparence de plaques ou d'aiguilles, s'alignent parallèlement aux fibres de collagènes. Leur dépôt est donc directement dépendant de la phase organique collagénique sur laquelle ils se fixent.

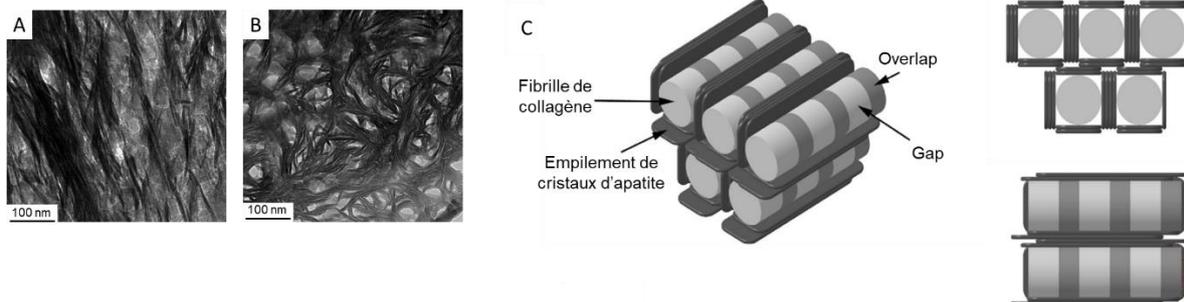


Figure 36 : Les cristaux d'hydroxyapatite se forment le long des fibrilles de collagènes. Analyse au microscope électronique à transmission d'une même section de fémur humain sous différentes orientations. La section a été coupée à 45° par rapport à l'axe du fémur, puis inclinée de -45° (A), montrant les structures minérales (foncées) alignées parallèlement aux fibrilles de collagènes (plus claires), à +45° (B), montrant ces mêmes structures enveloppant les fibrilles de collagènes. (C) Modèle simplifié des fibrilles de collagènes enveloppées par des empilements de minéraux. Des fibrilles de collagène de 45 nm de diamètre sont représentées avec des zones de gap de 40 nm de long et des zones de chevauchement (overlap) de 27 nm. Des structures minérales de 5 nm d'épaisseur, 65 nm de large et 200 nm de long entourent tangentiellement les fibrilles de collagène. Les structures minérales sont empilées sur 4 couches entre les fibrilles adjacentes. Adapté de [262].

Dans la plaque de croissance, la calcification suit immédiatement la production de Col X, suggérant qu'en plus de réguler la fibrillogénèse, les collagènes non-fibrillaires jouent aussi le rôle d'initiateur de la minéralisation [263].

#### *1.3.5.1. Cross-links des collagènes et minéralisation*

Il semble alors intuitif que différents motifs de cross-links dans différents tissus permettent le contrôle de la minéralisation. Une minéralisation aberrante peut directement être liée à un problème de formation des cross-links par les enzymes impliquées. L'expression des différentes enzymes de modification des collagènes, et notamment les LOXs, est indispensable à la minéralisation lors du processus d'ossification. Alors que l'hydroxylation des Lys de la triple hélice est essentiellement régulée par LH1/PLOD1, celle des télopeptide semble être régulée par LH2/PLOD2 et est associée à une régulation à la hausse de la minéralisation dans un modèle cellulaire de différenciation ostéogénique [264]. La régulation fine des processus de formation des cross-links semble cruciale pour la minéralisation. En effet, la surexpression de LH2 et donc la surhydroxylation des résidus Lys, conduit à une fibrillogénèse altérée (fibre plus fine notamment) et un retard dans la minéralisation [265].

#### *1.3.5.2. Maturation protéolytique des collagènes et minéralisation : implication de la Chondrocalcine*

Historiquement, une protéine dimérique résultant de l'assemblage de sous-unités de 35 kDa a d'abord été identifiée comme l'un des composants majoritaires du cartilage de croissance épiphysaire [266], trouvé en association étroite avec les zones calcifiées du cartilage (Figure 37), ce qui lui a valu le nom de la Chondrocalcine [267,268]. Elle a ainsi été montrée comme impliquée dans le processus de minéralisation du cartilage de croissance au cours de l'ossification endochondrale, mais pas de l'ossification membranaire [269].

Chondrocalcine est présente en grande quantité dans la zone hypertrophique du cartilage calcifiant, où des concentrations locales étonnamment élevées de PGs sont retrouvées [270], à l'inverse du cartilage non calcifiant. En revanche, et contrairement au postulat de base, la Chondrocalcine a aussi été identifiée au niveau du cartilage de croissance non – calcifié [268], ou dans le cartilage articulaire (Figure 37 - [271,272]) et plus globalement dans les cartilages jeunes d'individus en croissance, mais jamais dans les os calcifiés [270].

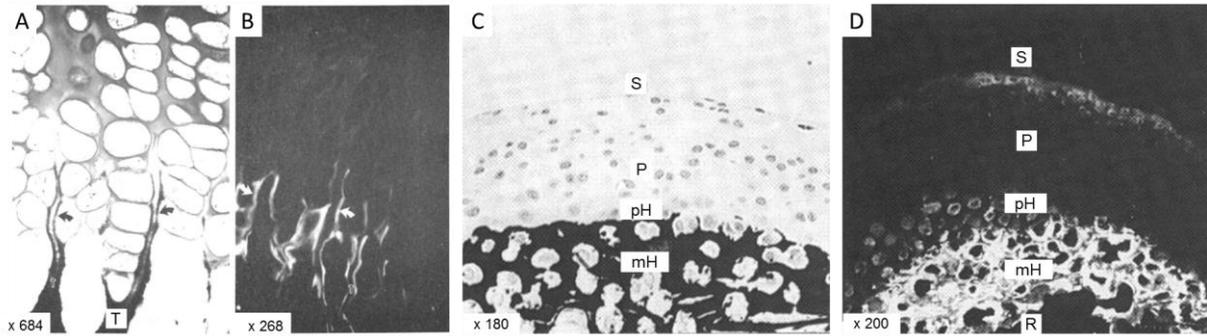


Figure 37 : la Chondrocalcine est associée à la calcification dans la zone hypertrophique de la plaque de croissance. Section d'un cartilage de croissance fœtal bovin. (A) Coupe non décalcifiée de tissu fixé au formol et traité avec la coloration de von Kossa montrant les dépôts minéraux (flèches noires) dans les septa longitudinaux de la zone hypertrophique inférieure et dans les travées (T) calcifiées de la métaphyse. (B) Le tissu a été fixé dans 2 % de formaldéhyde et 2 % de glutaraldéhyde, décalcifié, sectionné et marqué avec un anticorps spécifique de la Chondrocalcine. Dans ces conditions, la Chondrocalcine n'est détectable que dans les sites extracellulaires. Une fluorescence intense est observée dans la zone hypertrophique inférieure dans les mêmes sites (flèches) que ceux où la minéralisation est observée. (C) et (D) Sections frontale d'un condyle mandibulaire de souris âgée d'un mois traité avec la coloration de von Kossa (C) montrant les dépôts minéraux le long de la zone hypertrophique mature (mH) ou marqué avec un anticorps spécifique de la Chondrocalcine (D). Un marquage peu intense et diffus est observé à la surface articulaire (S), de manière intracellulaire dans la zone préhypertrophique (pH) et de manière très intense dans la zone hypertrophique mature (mH). (S) Surface articulaire ; (P) cellules progénitrices – chondroprogéniteurs ; (pH) zone préhypertrophique, hypertrophique précoce ; (mH) zone hypertrophique mature ; (R) : front de résorption [268,271].

La raison de cette calcification sélective du cartilage n'a cependant jamais été établie, mais il semblerait que la Chondrocalcine agisse en tant que nucléateur de la minéralisation : faisant suite à la concentration focale de PGs, le calcium et le phosphate interagissent pour former de l'HA, sur lequel va se fixer la Chondrocalcine. En s'intégrant dans la MEC, elle va permettre l'accrétion en grande quantité de HA et la propagation de la calcification [270]. Par ailleurs, la Chondrocalcine semble contribuer à l'ancrage des MVs à la MEC du cartilage par liaison avec la protéine d'ancrage CII, dont elles sont un composant majeur [273].

Tirant parti de sa grande affinité pour l'HA, sa purification a permis de montrer qu'elle correspond au propeptide carboxyterminal du Col II (CPII) (Figure 38– [274]) qui est un trimère.

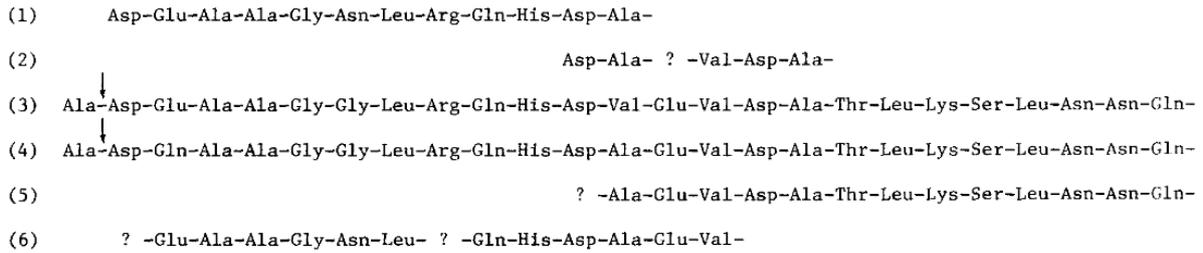


Figure 38 : Analyse de la séquence N-terminale de la Chondrocalcine issue du cartilage trachéal ((1) et (2)) et de croissance ((5) et (6)) bovin, avec les propeptides carboxyterminaux des collagènes de type II aviaire (3) et humain (4). La flèche en (3) et (4) indique le site décrit de clivage de la C-protéinase [272].

En outre, la Chondrocalcine peut être extraite du cartilage non-minéralisé par une extraction saline (1M NaCl), ce qui a notamment permis de mettre en évidence l'existence de deux sites de clivage. Cette facilité d'extraction à forte concentration en sel implique une simple liaison ionique de la protéine à d'autres macromolécules non diffusibles de la MEC, probablement les PGs [272].

Chondrocalcine semble être liée également aux processus de minéralisation dans un contexte pathologique. En effet, CPII, qui est normalement absent du cartilage articulaire adulte, est observé en contexte arthrosique [275].

## 1.4. A LA RECHERCHE D'UN MODÈLE D'ASSEMBLAGE DES MATRICES EXTRACELLULAIRES

Les MEC les plus denses et les plus riches en collagènes chez les Vertébrés comptent notamment celles des os et du cartilage, c'est pourquoi le chapitre qui suit se focalisera essentiellement sur elles.

Les MEC et leurs constituants principaux, les collagènes, ont joué un rôle fondamental dans l'évolution des organismes pluricellulaires, et notamment dans le cas des organismes vertébrés, pour la mise en place d'un tissu de soutien propre à la mobilité et la protection des organes internes, le squelette. La perte de l'intégrité des MEC est au centre de nombreuses pathologies à forte prévalence telle que l'arthrose, qui se caractérise essentiellement par des pertes locales de cartilage articulaire et une inflammation généralisée des tissus de l'articulation [276], auxquels sont associés des défauts du métabolisme des collagènes et de la minéralisation [277]. La population vieillissante est de plus en plus sujette à cette maladie rhumatismale qui est l'une des 10 maladies les plus invalidantes dans les pays développés. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'à l'échelle mondiale, 9,6% des hommes et 18% des femmes âgés de plus de 60 ans en souffrent [278]. Le cartilage est un tissu avasculaire, aneural et alymphatique, dont la MEC est composée essentiellement de protéines ayant une extrême stabilité dans le temps, et qui possède de ce fait des capacités d'auto-régénération quasi inexistantes.

Bien que notre compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la chondrogenèse soit loin d'être complète, des études transcriptomiques [279] et protéomiques [59,280–282] ont notamment permis une description relativement exhaustive des acteurs moléculaires impliqués dans le maintien du phénotype chondrocytaire et la différenciation endochondrale. Cependant, de récentes identifications de nouvelles protéines du cartilage [283,284] permises par un fractionnement cellulaire adapté, suggèrent qu'une partie de son protéome reste encore à être exploré.

### 1.4.1. Modèles *in vitro*

Les modèles d'assemblage des MEC *in vitro* existant se limitent pour beaucoup à l'étude de la fibrillogenèse des protéines telles que les collagènes ou l'élastine. Dans le but de reproduire et étudier plus en détail la fibrillogenèse des collagènes observée dans les tissus, un système purement *in vitro* d'assemblage de fibrilles sans cellules a été développé à partir de l'isolement

et la purification de procollagène retenant les deux propeptides [144] d'une part, et des N- et C-procollagène protéinases d'autre part. Ce système largement utilisé pour l'étude de la fibrillogenèse a également permis d'étudier *in vitro* l'assemblage de fibrilles de collagène en l'absence de cross-links dérivés de la lysyl oxydase [129]. Les propriétés d'auto-assemblage *in vitro* des collagènes ont par ailleurs été mises à profit dans le design de biomatériaux biocompatible tentant de reproduire le plus fidèlement possible le microenvironnement *in vivo* [285,286].

Cependant, ces biomatériaux sont souvent essentiellement composés de peu (voire un unique) type de protéines, et sont loin d'égaliser la complexité extrême d'une MEC *in vivo*. Une alternative est offerte par la décellularisation d'un tissu et l'utilisation de la MEC mise à nue, qui conserve une conformation et une composition pour l'essentiel natives [287]. Leur utilisation rend possible l'étude des interactions MEC – cellules, mais limite grandement l'étude de son assemblage ou de son remodelage.

#### **1.4.2. Modèles cellulaires**

Que ce soient des cellules primaires, immortalisées, ou des lignées établies, les cellules en culture sont probablement les modèles dont l'utilisation est la plus répandue dans les laboratoires, notamment parce qu'elle reste facile et pratique. Cependant, la caractérisation protéomique et l'analyse de chondrocytes authentiques est difficile, en raison de l'interdépendance du phénotype avec le microenvironnement.

*In vivo*, les chondrocytes de cartilage articulaire sain sont essentiellement dans un état post-mitotique et ont une capacité de prolifération quasi nulle. Une fois mis en culture en monocouche, ils se différencient rapidement, changent de morphologie (Figure 39. A - B) et adaptent leur expression génique, entraînant la suppression de nombreux gènes codant des protéines de la MEC du cartilage, notamment le Col II, des facteurs de croissance et d'adhérence [288,289], en accord avec des données non-publiées du laboratoire (Figure 39. C). Il semblerait par ailleurs que la LOX serait un marqueur sensible de la différenciation rapide des chondrocytes en culture (Figure 39. C). Par ailleurs, ils commencent à produire du Col I, qui est un marqueur ostéogénique [290].

En raison de l'instabilité phénotypique des chondrocytes en monocouche, les analyses protéomiques utilisant ce système semblent disposer d'une pertinence limitée et peu comparable au protéome du cartilage *in vivo*.

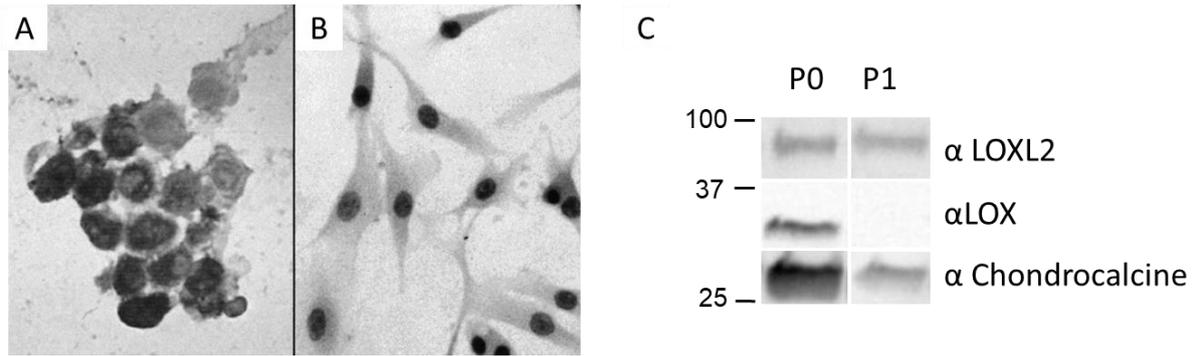


Figure 39 : Dédifférenciation de chondrocytes primaires humains en culture. (A – B) Immunocytochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre le collagène de type II sur de chondrocytes primaires humains fraîchement isolés (A) ou cultivés (B). La morphologie des cellules change également : des cellules polygonales différenciées (A) adoptent un phénotype allongé de type fibroblastique (B). (C) Immunoblot sur les protéines concentrées au DOC/TCA de milieu conditionné de chondrocytes humains en primo-culture (P0), ou après un passage (P1). Noter la chute drastique de sécrétion de LOX, mais pas de LOXL2, ainsi que de CPII à P1.

En effet, les chondrocytes *in vivo* résident dans une MEC péricellulaire spécialisée, où ils sont exposés à des forces de compression, et à des signaux moteurs et solubles sous forme de cytokines. Leur environnement jouant donc un rôle majeur dans le maintien de leur phénotype, a incité au développement de modèle de culture tridimensionnelle, dont l'objectif est de reproduire ces conditions *in vivo* [291]. Ainsi, des cellules maintenues dans un hydrogel biomimétique contenant notamment des chondroïtine sulfate [292], ou sur des billes d'agarose [293] ou d'alginate [294] conservent un phénotype très similaire à celui des chondrocytes *in vivo*, notamment l'expression de Col II et d'agrécan. Une étude a examiné la différenciation de cellules dérivées de fémurs humains fœtaux et cultivées en pellets (considéré ici comme une étude *in cellulo*, mais décrite comme *ex vivo*) dans un milieu ostéogénique. Les pellets ont ainsi acquis une configuration tridimensionnelle unique consistant en une couche fibreuse externe, une « coque » semblable à un ostéoïde et entourant une région cellulaire cartilagineuse, typique de la section transversale des fémurs fœtaux [295].

*In vivo* au cours de l'ossification membranaire, les ostéoblastes prennent leur origine de cellules souches mésenchymateuses qui prolifèrent et se différencient. Ainsi, les sources les plus courantes d'ostéoblastes sont les calvarias<sup>8</sup> murines, qui contiennent un grand nombre de précurseurs pouvant facilement être isolés mécaniquement ou par traitement avec des collagénases et la culture subséquente des cellules [296]. L'isolement des ostéoblastes humains

<sup>8</sup> Portion supérieure du crâne

est difficile et la méthode la plus courante est l'isolement des précurseurs des ostéoblastes dans les populations de cellules de la moelle osseuse [297].

L'influence du nombre de passage et la variabilité interindividuelle sont des caractéristiques inhérentes à la primo-culture de cellules. Bien que ces défauts puissent être palliés par l'établissement de lignées immortalisées, assurant des résultats reproductibles, plus homogènes et consistants, les problèmes majeurs restent le taux de prolifération excessif et une expression moindre des gènes impliqués dans la synthèse et le renouvellement de la MEC, par rapport à des cellules *in vivo* [298,299].

Ainsi, des lignées cellulaires établies ont été développées, telles que la lignée murine stromale MC3T3-E1, qui peut être utilisée pour étudier la plupart des aspects de la biologie de l'ostéoblaste. Des lignées de cellules humaines peuvent également être utilisées, telles que les cellules d'ostéosarcome MG63 et SAOS2. Ces lignées offrent une population de cellules homogène et permettent l'étude de stades particuliers du phénotype des ostéoblastes. Recommandées pour l'évaluation et le screening d'agents thérapeutiques ou des tests de cytocompatibilité, ces lignées ne reflètent cependant pas complètement le comportement des cellules primaires, qui restent le gold standard des études sur les ostéoblastes (voir [300] pour revue exhaustive).

### **1.4.3. Modèles *ex vivo* et culture d'explant**

Une alternative au maintien des chondrocytes en culture est l'utilisation de fragments de tissu cartilagineux qui retiennent les chondrocytes dans leur environnement tridimensionnel natif en préservant leur phénotype. Historiquement la culture d'os complets a été utilisée depuis les années 1960, notamment pour étudier la synthèse des collagènes dans les os [301]. Plus récemment, la formation osseuse a été suivie *ex vivo* en isolant puis en maintenant en culture la calvaria (de souris notamment) puis par étude histologiques [302].

Des systèmes de culture d'explants ont depuis été développés en utilisant différentes sources de cartilage (nasaux et articulaires) appartenant à diverses espèces animales, mais bien que le phénotype soit conservé, une dégradation progressive de la MEC (notamment l'agrécane et le Col II), met en évidence l'étude sur le long terme comme une limite majeure de ce modèle [303]. Le cartilage sain et pathologique de donneurs humains a également été utilisé pour étudier le rôle des cytokines inflammatoires et pour l'analyse ciblée des modifications de

l'agrécane et de l'expression des protéines associées à l'arthrite [304,305], montrant là encore des différences interindividuelles remarquables.

#### **1.4.4. Modèles animaux et *in vivo***

Le poulet est un excellent organisme modèle pour les études de l'embryogenèse et de la morphogenèse des organismes vertébrés, principalement en raison de la facilité de manipulation des membres supérieurs en développement *in vivo* [222]. La première substance pharmacologique identifiée comme pouvant impacter la morphogenèse, l'acide rétinoïque, a d'ailleurs été découverte par des expériences sur le développement des membres de poussins et, depuis plus de 30 ans, le rôle d'un nombre croissant de gènes importants pour le développement a été découvert, notamment en lien avec la chondrogenèse et l'ossification endochondrale [306].

L'analyse protéomique globale par spectrométrie de masse de cartilage de croissance murin [307], de cartilage articulaire murin juvénile, en combinaison avec une fragmentation tissulaire et cellulaire [280], ou d'échantillons aussi complexes que le sécrétome de chondrocytes primaires humains [282] a notamment permis d'apporter une compréhension globale de l'expression protéique du cartilage en développement et mature. Bien que des échantillons de tissus pathologiques provenant de donneurs humains, tels que le cartilage ou l'os, sont facilement disponibles, l'accès extrêmement limité à leurs contrôles sains appariés constitue un défi majeur [308]. Ainsi, de nombreux modèles animaux de pathologies ostéochondrales ont vu le jour [309], permettant une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la dégénérescence des articulations.

De même, des modèles animaux d'inactivation de gène codant des protéines des MEC, ou exprimant des mutations caractéristiques de pathologies humaines sont rependus et ont permis de décrypter certains mécanismes pathologiques. Notamment des souris invalidées ou ayant des mutations dans les gènes codants les collagènes [310], des enzymes de modifications des collagènes [158,171,311], ou d'autres protéines des MECs [183,214,237]. Cependant, les analyses se focalisant sur les MECs restent rares [281].

#### **1.4.5. Le choix du bon modèle**

Un défi majeur à la caractérisation protéomique d'un tissu *in vivo* est le mélange complexe de protéines telles qu'elles sont extraites, avec leur abondance relative, rendant la détection de protéines peu abondantes très difficiles. En outre, la faible quantité d'intermédiaire de synthèse,

en comparaison au pool de protéines matures synthétisées et accumulées, rend difficile leur caractérisation. Enfin, dans les MECs, les différents constituants sont souvent hautement cross-linkés, et donc particulièrement difficiles à extraire. Ainsi, le travail achevé sur la caractérisation des collagènes et des différents acteurs de la chondrogenèse a été en grande partie réalisée sur des tissus jeunes ou embryonnaires [184,312,313], dans lesquels le niveau de cross-link est plus faible [44]. Ces études sont essentiellement *in vivo*, précisément parce que l'homéostasie des MECs est étroitement régulée par des programmes de différenciation subtils des cellules impliquées, et par des facteurs environnementaux difficilement reproductibles *in vitro*. Les modèles animaux présentent pourtant de nombreux désavantages, tels que la différence des paramètres biocinétiques avec l'Homme, en plus d'un manque de maniabilité certains, en comparaison aux modèles cellulaires (manipulation génétique, criblage pharmacologique...).

En revanche, les études déterminantes pour la caractérisation de la fibrillogenèse des collagènes ont été réalisées essentiellement par des approches strictement *in vitro* [98,194,199,205] (c'est-à-dire avec des protéines purifiées dans un tampon adéquate, qui s'oppose à l'*in cellulo*, dans lequel les conditions se rapprochent plus de l'environnement physiologique). Il n'est bien sûr pas attendu de ces études, très éloignées du contexte multifactoriel des MECs, qu'elles reflètent la complexité des mécanismes *in vivo*. En effet, certaines études sont même quelque peu en contradiction avec les observations *in vivo* [314–317]. Ainsi, un examen attentif des ressources disponibles et la sélection du matériel le plus approprié à l'étude sont indispensables.

Afin de promouvoir une caractérisation plus complète des mécanismes moléculaires de la synthèse des MECs, le domaine bénéficierait de modèles de complexité intermédiaire, telles que des lignées cellulaires établies qui récapitulent une partie importante des événements séquentiels se produisant *in vivo*. Bien que l'inconvénient majeur des modèles *in cellulo* est qu'ils reposent principalement sur des lignées cellulaires cancéreuses, ayant donc des fonctions substantiellement anormales, ils sont largement utilisés dans les domaines de la biologie. De nombreuses lignées cellulaires sécrètent notamment des procollagènes et au moins certains de leurs intermédiaires de synthèse qui peuvent être retrouvés dans le milieu conditionné. Néanmoins, très peu d'entre elles sont capables d'assembler les collagènes en un réseau insoluble, et lorsqu'elles le font dans une certaine mesure, les collagènes sont anormalement maturés [318–320], démontrant à quel point elles résument mal les situations *in vivo*.

#### 1.4.6. Le modèle cellulaire ATDC5

La lignée ATDC5 dérive d'un teratocarcinome embryonnaire murin. Elle est décrite comme un modèle *in vitro* couvrant toutes les étapes de la différenciation chondrocytaire observées au cours de l'ossification endochondrale *in vivo* [321,322]. En effet, alors qu'en absence d'insuline, les cellules prolifèrent abondamment et maintiennent un phénotype fibroblastique, en culture supplémentée de 10 µg/mL d'insuline, et sans aucun autre ajout de facteur de croissance, les cellules ATDC5 entament une différenciation complète et séquentielle, récapitulant notamment l'expression des collagènes et le processus de minéralisation au cours de la chondrogenèse sur une période de culture de 30 à 40 jours. Depuis sa première description, le modèle ATDC5 est devenu très populaire et s'est vite répandu dans les laboratoires du monde entier. A ce jour, plus de 600 publications parues dans des journaux à comité de lecture font état d'expérimentations sur ce modèle. Différents protocoles de culture ont ainsi été proposés, notamment afin d'optimiser la chondrogenèse, et réduire le temps de culture.

L'acide ascorbique est un cofacteur enzymatique essentiel aux réactions d'hydroxylation des Pro et Lys des collagènes [323], indispensable à la formation du domaine en triple-hélice, à la sécrétion, la stabilité et la formation des cross-links des collagènes. Il joue par ailleurs un rôle direct sur la synthèse des collagènes. En effet, la supplémentation en acide ascorbique de chondrocytes primaires en culture issus de cartilage articulaire bovin augmente l'expression des marqueurs chondrogéniques (Col II et agrécane) [324] et hypertrophiques (Col X et activité ALP) [325]. Dans la lignée ATDC5, en plus de favoriser la synthèse des marqueurs de la chondrogenèse et de l'hypertrophie, l'acide ascorbique a un effet direct sur leur différenciation : il induit la formation de nodules cartilagineux plus nombreux et de plus grande taille, tout en réduisant considérablement le temps de culture [326]. L'effet de l'acide ascorbique sur la lignée ATDC5 est d'autant plus remarquable qu'il a été montré capable d'induire leur différenciation en absence d'insuline, en favorisant le dépôt d'une matrice cartilagineuse de qualité [327].

En tant que modèle de chondrogenèse, le modèle ATDC5 a largement été utilisé pour décrire les voies de signalisations impliquées dans la différenciation endochondrale et s'est illustré dans l'identification de ses acteurs clés, notamment les voies de l'hormone parathyroïdienne (PTH/PTHrP [322]), Ihh (Indian Hedghog [328]) et BMP (Bone Morphogenetic Protein [329]). Par ailleurs, la chondrogenèse est affectée par de très nombreux facteurs (facteurs de croissance, cytokines, hormones) et les ATDC5 ont été d'une grande aide afin d'en déterminer les

mécanismes d'actions (passés en revue dans [330]), et leur utilisation a déjà fait ses preuves dans l'évaluation de biomatériaux [331].

Par ailleurs, bien que les cellules ATDC5 aient d'abord été décrites pour minéraliser leur MEC en absence de tout facteur exogène (Figure 40 – [322]), le changement de pression des gaz atmosphériques ( $\text{CO}_2$ ) lors de la phase de différenciation précoce [332] ou l'ajout de  $\beta$ -glycérophosphate ( $\beta\text{GP}$ ) [333], un substrat pour la TNAP, permet également de conduire à la minéralisation de la MEC, et ce en un temps de culture réduit. Le modèle cellulaire ATDC5 a par ailleurs été décrit comme un excellent modèle pour l'étude de la minéralisation et des différents facteurs qui peuvent l'influencer [334] et notamment de la régulation du Pi [335]. Par ailleurs, le contrôle *in vitro* de l'apport exogène en Pi dans le milieu de culture de cellules ATDC5, cultivée en deux ou trois dimensions, a montré la possibilité de réduire davantage le temps de culture et représente ainsi un modèle optimisé pour l'étude de la chondrogenèse et de la minéralisation [336]. Supportant ce constat, il a été montré que le Pi induisait l'expression du Col X [241] et de MGP [337], des marqueurs de l'hypertrophie et acteurs essentiels de la minéralisation. L'utilisation des ATDC5 a ainsi permis de mettre en évidence que le transport du Pi était dépendant de la signalisation du TGF- $\beta$  [338]. En outre, l'inactivation de gènes dans les cellules ATDC5 a permis de découvrir de nouveaux acteurs de la différenciation hypertrophique et la minéralisation, tel que Osterix/Sp7 [339].

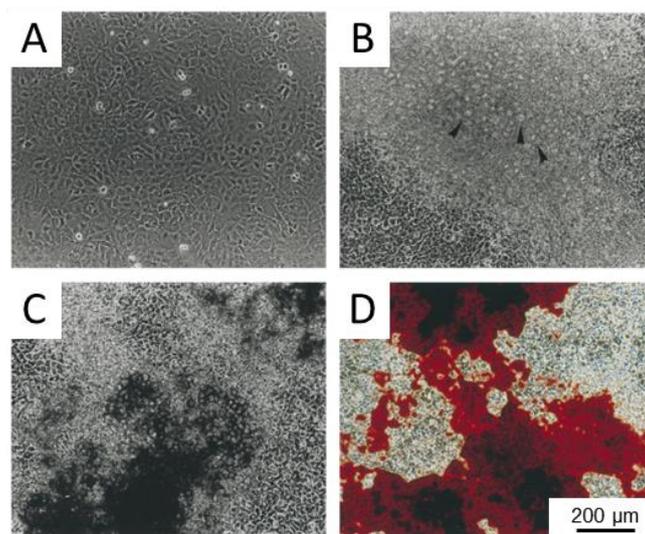


Figure 40 : Les cellules ATDC5 forment de nodules types cartilagineux et minéralisent leur matrice extracellulaire. Micrographies à contraste de phase de cellules ATDC5. (A) cellulesensemencées en monocouche ayant atteint la confluence au jour 3. (B) Les nodules cartilagineux typiques apparaissent au jour 24. Les pointes de flèches indiquent la présence de cellules hypertrophiques dans les nodules. (C) Les nodules cartilagineux minéralisent au jour 45. (D) Coloration au rouge alizarine de la culture minéralisante au jour 45. [322]

De manière surprenante, bien que les profils de transcription global et temporel des cellules ATDC5 soient assez bien compris [332,340,341], en particulier sur des temps de culture courts, très peu de données ont été rapportées sur les changements d'expression au niveau protéique, à l'exception des marqueurs chondrogéniques et hypertrophiques communs. Ainsi, les protéines de la MEC et leur accumulation dans le temps pendant la différenciation chondrogénique du modèle ATDC5 restent à être décrites.

## 2. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE ET DESIGN DE L'ETUDE

---

Chondrocalcine a depuis longtemps été décrite comme impliquée dans la minéralisation du cartilage. Elle est retrouvée associée à la matrice dans le cartilage de croissance, et en particulier dans les zones calcifiées [267–269] ainsi que dans différents contextes de minéralisation pathologique [275]. Cependant, son rôle précis dans le processus de minéralisation reste toujours à être précisé.

**Les rôles multiples de CPII – la Chondrocalcine dans la mise en place de la MEC du cartilage et dans sa minéralisation semblent profondément liés, et l'objectif principal de ce travail de doctorat a eu pour but de les élucider.** Pour cela, nous nous sommes notamment intéressés à son clivage. Des études complémentaires *in vivo* et *in cellulo* ont été réalisées : d'une part, l'étude du site de clivage de la Chondrocalcine issue de cartilage bovin (développé en §4.1.1), et d'autre part, l'étude du mécanisme de son clivage sur des chondrocytes humains en primo-culture à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique de BMP-1 (développé en §4.1.2.). Ces données ont notamment suggéré que les clivages des C-propeptides des collagènes fibrillaires de type I et II étaient dépendants de mécanismes différents.

Afin de disséquer au mieux les mécanismes de maturation des collagènes, nous avons fait le choix de nous orienter sur l'utilisation du modèle cellulaire ATDC5. En plus de nous apporter une reproductibilité non atteinte par des primo-cultures de chondrocytes humains, ce modèle nous offre une grande maniabilité. De par sa capacité impressionnante à exprimer un vaste panel de collagènes (notamment fibrillaires de type I et de type II), le modèle ATDC5 a déjà montré sa force dans la caractérisation de nouveaux types de collagènes [342]. En outre, ces cellules sont capables de minéraliser leur MEC, et produisent et sécrètent abondamment PCPE-1, ce qui le propose comme modèle idoine pour la caractérisation du clivage des C-propeptides.

À ce jour, et selon le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), la lignée cellulaire ATDC5 a été utilisée comme modèle *in vitro* dans plus de 600 études publiées, avec des différences mineures à substantielles avec le protocole de culture d'origine. Notre processus expérimental vise à créer un consensus entre eux. Cependant, et de manière surprenante, bien que les profils de transcription global et temporel des cellules ATDC5 soient assez bien compris

[332,340,341], très peu de données ont été rapportées sur les changements d'expression au niveau protéique. Ainsi, l'un des objectifs de ce travail de thèse a été de **décrire de la manière la plus exhaustive possible les protéines réellement synthétisées par les cellules ATDC5 au cours de leur différenciation chondrogénique induite par l'insuline**, en se focalisant sur les protéines extracellulaires sécrétées et solubles (sécrétome) ou intégrées dans la MEC (matrisome), avec une attention particulière donnée au profil d'expression et des modifications des collagènes. Ce travail a été réalisé à l'aide d'une méthode de fractionnement cellulaire dédiée et une quantification relative *label-free* par LC-MS/MS (MALDI – TOF/TOF), et les résultats discutés en §4.2. ont été soumis au journal à comité de lecture *Journal of Proteomic Research* en septembre 2019.

Une différence dans les mécanismes de clivage des C-propeptides suggère une implication différente des acteurs de la maturation protéolytique, et le modèle ATDC5 s'est notamment révélé particulièrement propice à leur étude. Les interactions protéiques élucidées au cours de ce travail de thèse sont discutées en §4.3.

Outre les procollagènes fibrillaires qui nécessitent le retrait de leurs deux extrémités amino et carboxy-terminales, de nombreuses protéines impliquées dans la formation des MEC sont synthétisées sous forme de précurseurs qui seront ensuite maturés par clivage protéolytique. De multiples protéines ont notamment des sites de clivages relativement similaires à ceux des collagènes, et en particulier avec le site de clivage des C-propeptides (Figure 41). En effet, BMP-1 possède de nombreux substrat, parmi lesquels le biglycan [343], la laminine 5 [344], le procollagène de type VII [345], la lysyl oxydase [180] ou la chordine [158]. Au contraire cependant, le site de clivage du N-propeptides du procollagène de type V par BMP-1 est totalement différent de ceux des procollagènes fibrillaires [346], suggérant que des substrats de BMP-1 restent encore à être identifiés. Afin d'éviter toutes mésinterprétations de résultats qui serait imputable à l'altération de la maturation d'une autre protéine que les collagènes suite à l'inhibition pharmacologique de BMP-1, nous nous sommes orientés vers une approche plus ciblée : **l'inhibition du clivage des C-propeptides se ferait par l'invalidation de PCPE-1 dans le modèle cellulaire ATDC5.**

<b>Procollagens <math>\alpha</math>1(I)</b>	GGR <b>Y</b> YRA . . . . . <b>D</b> DANVVR
<b><math>\alpha</math>2(I)</b>	DGDF <b>Y</b> RA . . . . . <b>D</b> QPRSAP
<b><math>\alpha</math>1(II)</b>	PLQ <b>Y</b> MRA . . . . . <b>D</b> QAAGGL
<b><math>\alpha</math>1(III)</b>	GFAP <b>Y</b> YG . . . . . <b>D</b> EPMDFK
<b>Chordin N-terminus</b>	PEHR <b>S</b> YS . . . . . <b>D</b> RGEPGV
<b>C-terminus</b>	LGDP <b>M</b> QA . . . . . <b>D</b> GPRGCR
<b>Prolysyl oxidase</b>	HVDR <b>M</b> VG . . . . . <b>D</b> DPYNPY
<b>Probiglycan</b>	DGP <b>F</b> MMN . . . . . <b>D</b> EEASGA
<b>Prodecorin</b>	LFDF <b>M</b> LE . . . . . <b>D</b> EASGIG

*Figure 41 : BMP-1 est une enzyme protéolytique qui possède de nombreux substrats. Alignement des séquences primaires des sites de clivages en C-terminus des procollagènes de type I – III, et de la prolysyl oxidase, avec les sites en N-terminus du probiglycan et de la prodecorine, avec les sites en N-terminus de la chordine [343].*

L'emploi de particule virale permettant la transduction de shARNs dirigés contre PCPE-1 a fait l'objet de la première année de thèse. La procédure expérimentale décrite en §3.4.1. n'a cependant pas permis l'obtention de résultats concluant, nous conduisant à adapter notre démarche. Ainsi, la section §3.4.2. décrit la mise en place d'une lignée ATDC5 invalidée pour PCPE-1 par utilisation de la technologie CRISPR-Cas9.

# 3. PROCEDURE EXPERIMENTALE

---

## 3.1. ETUDE DES MECANISMES DE CLIVAGE DES C-PROPEPTIDES DES COLLAGENES FIBRILLAIRES DE TYPE I ET II

### 3.1.1. Etude *in vivo* du site de clivage de la Chondrocalcine

#### 3.1.1.1. *Extraction et purification de la Chondrocalcine*

Des têtes fémorales de jeunes bovins ont été obtenues chez Saveurs d'Orient (Vandoeuvre – les – Nancy). Les tissus ont été congelés et des sections longitudinales de 20 cm ont été réalisées à froid. Des punchs de 5 mm de diamètre de tissu articulaire cartilagineux et de croissance ont été réalisés, broyés sous azote liquide et rincés deux fois au PBS – Triton 1%. L'extraction saline a été réalisée à l'aide de 1,5 mL de tampon (NaCl 500 mM, PBS 1%), 90 minutes. Après centrifugation 5 min à 15 000 g à 4°C la fraction soluble a été prélevée et conservée à -20°C.

Les protéines de l'extrait salin ont ensuite été séparées par FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) selon le protocole de Choi et al., 1983 [266]. L'extrait protéique salin ensuite d'abord dialysé contre 1 L de tampon Kp (phosphate de potassium 20 mM contenant 50 mM de NaCl à pH 6.5) puis appliqué sur une colonne d'hydroxyapatite équilibrée par le même tampon. La colonne a été lavée avec 30 mL de tampon Kp 20 mM / NaCl 50 mM, pH 6.5, puis éluée avec un gradient de 0 à 60% de phosphate de potassium 20 mM à 1 M à un débit de 5 mL / min.

L'extraction saline a été réalisée une deuxième fois sur les culots insolubles, qui ont ensuite été lavés rapidement trois fois à l'eau, puis incubés une nuit dans 1,35 mL d'acide acétique 0,5 M. 150 µl de NaCl 5 M ont alors été ajoutés et incubés 90 min. Après centrifugation 5 min à 15 000 g à 4°C la fraction soluble a été prélevée et conservée à -20°C.

#### 3.1.1.2. *Préparation des échantillons*

500 µL des extraits protéiques ont été précipités 1 h à température ambiante au chloroforme 100% (2/5 volume / poids), suivi de 1/1 (volume / poids) de méthanol 100 %. Après centrifugation 15 min à 15 000 g à température ambiante, la fraction soluble a été éliminée et les culots ont été lavés 2 fois au méthanol 100%. Les culots ont été séchés en les centrifugeant

sous vide 5 min, puis ils ont été repris dans 50 µL de tampon à échantillon 2D (2DTE : 7 M urée, 2 M thio-urée, 4% (volume / poids) CHAPS, 0.2% (volume / poids) Triton X-100). Les échantillons ont été dilués à 1µg/µL dans du 2DTE supplémenté à 1% (volume / poids) en DTT (ou non) et en bleu de bromphénol (à l'état de trace), aliquotés par 200 µL, et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

### *3.1.1.3. Electrophorèse bidimensionnelle*

Les aliquotes ont été décongelés et agités pendant 2 h, ultracentrifugés (100 000 g pour 30 min à température ambiante) pour éliminer les matières insolubles. Des bandes IPG (1632016 ; Bio – Rad ; 24 cm ; pH 3 – 10) ont été réhydratées avec la phase soluble pendant 10 h à température ambiante dans un volume final de 450 µl de tampon (2DTE supplémenté en DTT, sauf dans le cas d'une électrophorèse en conditions non-réductrices dans les deux dimensions, et en bleu de bromphénol). L'électrofocalisation a été réalisée à l'aide d'un Protean IEF cell (Bio-Rad) avec un programme en une seule étape selon les recommandations du fabricant. Les bandes ont été coupées de sortes à obtenir des bandes dont le pH est compris entre 4,5 et 8. Les liaisons disulfure des protéines ont été réduites par incubation de 10 min dans 4 mL de tampon d'équilibrage (6M urée, 2% SDS, 50 mM Tris, pH 8,8, 20% glycérol (volume / volume)) contenant 130 mM DTT, sauf dans le cas d'une électrophorèse en conditions non-réductrices dans les deux dimensions. Les groupes sulfhydryles libres ont été alkylés par traitement avec 135 mM d'iodoacétamide pendant 10 min dans un tampon d'équilibrage, puis les bandes ont été transférées sur la partie supérieure de gel SDS - PAGE d'acrylamide 12% en condition dénaturantes ou non – dénaturantes, coulés dans des cassettes Criterion (3459902 ; Bio-Rad) puis le run a été réalisé à 17 mA.

## **3.1.2. Etude *in cellulo* du mécanisme de clivage de la Chondrocalcine**

### *3.1.2.1. Obtention des tissus et culture primaire*

Le cartilage articulaire humain a été obtenu sous anesthésie générale lors d'arthroplasties totales du genou, en collaboration avec le service d'Orthopédie de l'Hôpital Central de Nancy. Le protocole a été validé par le Comité d'Ethique local (numéro d'enregistrement UF 9757 - CCRP 2004 - Cellules Souches et chondrogénèse), et les patients ont donné leur consentement écrit, conformément avec les règles éthiques habituelles. Les chondrocytes articulaires ont été obtenus comme suit : des pièces saines de cartilage ont été excisées des surfaces articulaires, émincées et rincées dans du PBS, puis digérées sur la nuit avec 2 mg/mL de collagénase A

(10103586001 ; Roche) à 37°C. Le digestat a été filtré (100 µm stérile ; SCNY00100 ; Millipore), les cellules ont été collectées après une centrifugation pour éliminer le milieu, puis rincées au PBS, et ensemencées à  $1,2 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) contenant 15% de sérum de veau fœtal (SVF ; 11320-033 Gibco), Pénicilline/Streptomycine 100 µg/mL (15140122 ; Gibco), L-glutamine 2mM (25030081 ; Gibco), acide ascorbique 50 µg/mL (A92902 ; Sigma – Aldrich) et proline 50 µg/mL (P0380 ; Sigma – Aldrich) en conditions d'hypoxie (2% O<sub>2</sub> ; 5% CO<sub>2</sub>) jusqu'à confluence, soit environ 10 jours. Le milieu a été changé tous les deux jours.

#### *3.1.2.2. Traitement pharmacologique*

Après 72 h de culture, les chondrocytes primaires ont été traités par du UK 383367 (2073 ; Axon Medchem), un inhibiteur de BMP-1, utilisé entre 2 µM et 10 µM. Arrivées à confluences, les cellules ont été lavées deux fois au PBS et privées en sérum pour 24 h afin de permettre l'analyse du sécrétome.

## 3.2. ETUDE DES PARTENAIRES PROTEIQUES ET DU CLIVAGE DES C-PROPEPTIDES DES PRINCIPAUX COLLAGENES FIBRILLAIRES

### 3.2.1. Construction des plasmides d'expression par recombinaison homologue codants les miniprocollagènes recombinants étiquetés

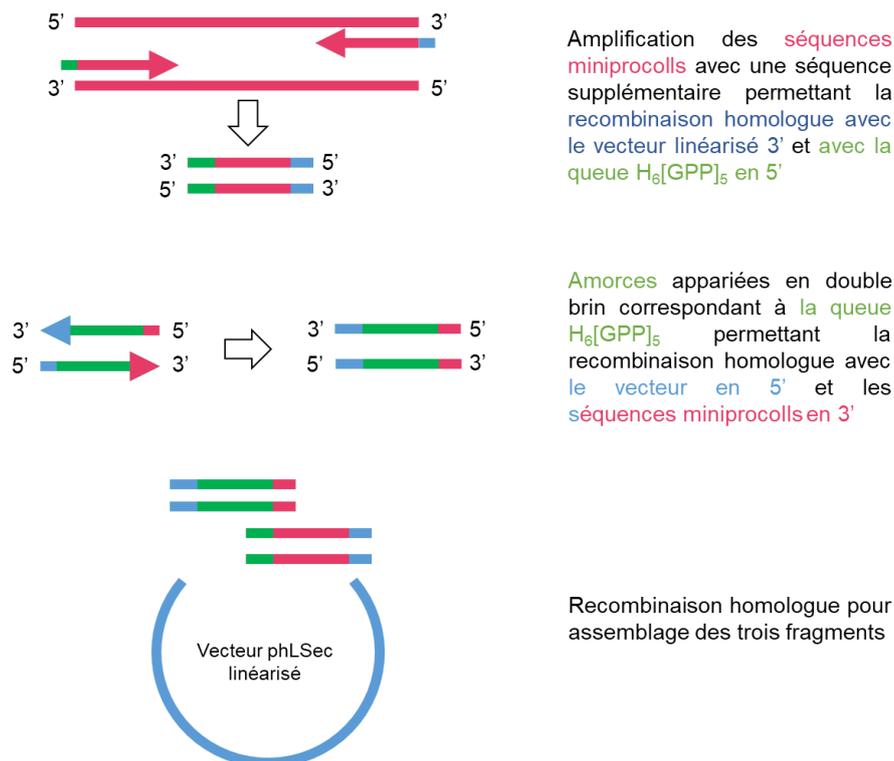


Figure 42 : Processus d'obtention des constructions miniprocollagènes de type I, II et III. Les constructions miniprocoll1, miniprocoll2 et miniprocoll3, ont été réalisées par amplification des séquences d'intérêt « miniprocoll » (voir 3.2.1.2). Une queue N-ter contenant le tag His6 et permettant la mutation des 5 derniers triplets N-ter en triplets GPP (queue  $H_6[GPP]_5$ ) a été obtenue par appariement double brin d'amorces synthétisées à façon (voir 3.2.1.3). La CDS de CPIII a été excisée du plasmide pHLSec - CPIII puis les fragments d'intérêt ont été assemblés par recombinaison homologue (voir 3.2.1.3).

Les constructions miniprocollagène de type I, II et III (miniprocoll1, miniprocoll2 et miniprocoll3 respectivement) réalisées au cours de ce travail de thèse sont des constructions permettant l'étude du clivage des CP, et contenant l'extrémité C-terminale du procollagène correspondant, additionné du télépeptide et des 15 premiers triplets Gly - Xaa - Yaa de la triple hélice. Les 5

derniers triplets de la triple hélice en N-ter ont cependant été remplacé par des triplets GPP afin de garantir la meilleure stabilité de la protéine recombinante. La démarche d'obtention des constructions miniprocoll1, miniprocoll2 et miniprocoll3 est récapitulée en Figure 42.

Le plasmide pHLSec [347] permettant l'expression du C-propeptide du collagène de type III (CPIII) étiqueté His6 en N-ter est un don généreux de l'équipe du Docteur Catherine Moali (IGBMC, Lyon). Dans ce plasmide, la séquence codante de CPIII est précédée de la séquence Kozak, de la séquence codant un peptide signal de sécrétion et l'étiquette N-terminale K\_His6.

### 3.2.1.1. *Extraction d'ARN et transcription inverse*

Les ARN totaux ont été isolés de chondrocytes primaires humains avec le kit RNeasy mini kit® (74104 ; Qiagen). 100ng d'ARN totaux ont ensuite été retro-transcrits en utilisant une M-MLV reverse transcriptase (28025021 Invitrogen) et des amorces hexamériques aléatoires, selon les instructions fournies par le fabricant.

### 3.2.1.2. *Amplification des séquences codantes de miniprocoll1, miniprocoll2 et miniprocoll3*

Les séquences des amorces utilisées pour le clonage de miniprocoll1, miniprocoll2 et miniprocoll3 sont listées dans le Tableau 3. Le cDNA de chondrocytes primaires humains obtenus a été utilisé comme ADN matrice dans la réaction de PCR qui a été réalisée dans un volume final de 20 µL, en utilisant la polymérase Phusion® (M0530L ; NEB) en suivant les indications du fournisseur, et selon le programme donné en Tableau 4.

Tableau 3 : Séquence des amorces utilisées pour l'amplification des miniprocollagènes de type I, II et III dans le plasmide pHLSec par recombinaison homologue.

<i>Amorce</i>	<i>Séquences des amorces (5'-3')</i>
<i>TAG_mini2_for</i>	GGA CCA CCA GGG CCT CCT GGT CCC CGT GGA
<i>HL_STOP_COL2</i>	ATC GCG ATA CTA GTC TGGGTCAGGTTT TTA CAA GAA GCA ACG GAT TGT G
<i>TAG_mini3_for</i>	GGA CCA CCA GGG CCT CCA GGG CCT CGA GGT
<i>HL_UTR_COL3</i>	ATC GCG ATA CTA GTC TGT CGG TCA CTT GCA CTG GTT GAC
<i>TAG_min1_for</i>	GGA CCA CCA GGC CCT CCT GGT CCT CGC GGT
<i>HL_UTR_COL1</i>	ATC GCG ATA CTA GTA GGA GGG AGT TTA CAG GAA GCA GAC

Tableau 4 : Programme de PCR pour l'obtention des amplicons d'intérêt

<b>Etape PCR</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Temps (secondes)</b>	<b>Nombre de cycle</b>
Dénaturation initiale	98	30	1
Dénaturation	98	10	5
Hybridation	65	30	
Elongation	72	60	
Dénaturation	98	10	25
Hybridation	72	30	
Elongation	72	60	
Elongation finale	72	10	1

### 3.2.1.3. Ajout d'une queue $H_6[GPP]_5$ aux constructions miniprocolls

Afin de garantir une meilleure stabilité des protéines recombinantes, les 5 derniers triplets d'acides aminés N-ter de la triple hélice de chacun des miniprocoll ont été remplacés par des triplets GPP. En outre, une étiquette His6 a été ajoutée en N-ter. Pour cela, les amorces dont la séquence est donnée en Tableau 5 ont été synthétisées, appariées en ADN double brin et assemblées avec les amplicons précédemment obtenus à l'aide du kit Gibson Assembly® Cloning Kit (E5510S ; NEB).

Tableau 5 : Séquence des amorces utilisées pour la queue  $H_6[GPP]_5$  par recombinaison homologue

<b>Amorce</b>	<b>Séquences des amorces (5'-3')</b>													
<i>HL_his_GPP_rev</i>	AGG	CCC	TGG	TGG	TCC									
	GTG	ATG	GTG	GTG	ATG	ATG	ACC	GGT	TTC	AGC	TAC	GCA	AC	
<i>HL_his_GPP_for</i>	GTT	GCG	TAG	CTG	AAA	CCG	GTC	ATC	ATC	ACC	ACC	ATC	ACG	GAC
	CAC	CAG	GAC	CAC	CAG	GAC	CAC	CAG	GAC	CAC	CAG	GGC	CT	

### 3.2.1.4. Linéarisation du vecteur et clonage par recombinaison homologue

L'ORF de CPIII a été retirée du plasmide pHLSec – CPIII par digestion avec les enzymes de restrictions *AgeI* et *Xho* et selon les instructions du fournisseur. Le vecteur ainsi linéarisé a été purifié et utilisé pour y cloner les constructions miniprocolls à l'aide du kit Gibson Assembly® Cloning Kit (E5510S ; NEB).

## 3.2.2. Transfections transitoires de cellules ATDC5 pour l'expression des « appâts »

Des cellules ATDC5 ont étéensemencées à  $2,5 \cdot 10^6$  cellules par puits en plaque 6 puits dans 4 mL de milieu d'expansion décrit en §3.1.1., puis transfectées après 24h avec 2 µg de plasmide

pCDNA3.1 – CPI, pCDNA3.1 – CPII, pHLSec – CPIII, ou pHLSec – pCDNA3.1, ou pCDNA3.1 – GFP comme témoin positif de transfection et 4 µL de Turbofect (R0531 ; Thermofischer), en suivant les instructions du fournisseur. 24 h après transfection, le milieu a été changé pour du milieu sans sérum. Le milieu conditionné a enfin été récolté après 48h.

Matn3 code la matriline – 3, une protéine matricielle cartilagineuse utilisée ici comme témoin négatif pour les expérimentations de pull down. Le plasmide pCDNA3.1 contenant l'ORF codant la GFP a été utilisé comme témoin de transfection.

### **3.2.3. Pull down de l'interactome**

Pour chaque condition, 1 mL de milieu conditionné a été équilibré à 15mM d'imidazole - 0.05% Tween, et 5 µL de billes magnétiques HisPur™ Ni-NTA (88831 ; Thermofisher) ont été préparées et lavées dans un tampon de lavage (Milieu DMEM/F12 15mM imidazole, pH 8, 0,05% Tween). Chaque centrifugation a été faite à 750 g, 30 sec. Les billes ont été ajoutées au milieu conditionné et laissées à incuber 2 h à 4°C sous rotation. Après centrifugation, la fraction soluble contenant les protéines non fixées a été récupérée et précipitée au DOC/TCA. La fraction fixée a été lavée trois fois 5 min sur roue dans 500 µL de tampon de lavage. L'éluion a été faite dans 20 µL de mix 1 : 1 (tampon de lavage : 200 mM imidazole) et les échantillons ont été conservés à -20°C.

### **3.2.4. Western Blot**

Les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE sur des gels PROTEAN® TGX Stain-Free™ gradients de 4 à 20 % (456-8095 BIO-RAD) et transférés sur les membranes de difluorure de polyvinylidène des packs de transfert Trans-Blot® Turbo™ (170-4157 BIO-RAD) avec le système de transfert Trans-Blot® Turbo™. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : anticorps de lapin dirigé contre la LOX (cat#ATB112 ; Lot#2733373 ; 1:1000 ; Millipore), de lapin dirigé contre la LOXL2 (cat#ABE831 ; Lot #UP1604185 ; 1 :10000 ; Millipore), de chèvre dirigé contre PCPE-1 (cat#AF2239 ; Lot YKN01 ; 1 :1000 ; R et D system) de lapin dirigé contre CPII murin, de poulet dirigé contre CPI humain [50], ou de souris dirigé contre un tag pentahistidine (cat#34660 ; 0,1 µg/mL ; Quiagen), avec l'anticorps secondaire correspondant anti-souris (cat#7076 ; 1 :3000 ; Cell signaling technology), anti-lapin (cat#7074 ; 1 :4000 ; Cell signaling technology) ou anti-chèvre (cat# HAF017 ; Lot WVR01 ; 1 :1000 ; R et D système) et conjugué à la peroxydase de raifort. Les immuno-blots ont été développés par chimioluminescence (1705061 BIO-RAD) et l'acquisition a été réalisée sur un Chemidoc XRS+ imager (BIO-RAD).

### 3.3. CARACTERISATION PROTEOMIQUE EXHAUSTIVE DU MODELE CELLULAIRE DE CHONDROGENESE ATDC5

#### 3.3.1. Culture cellulaire

Les cellules ATDC5 ont été obtenue de la banque Riken Cell, basée à Tsukubai (Japon), au passage 12. Toutes les étapes d'incubation ont été réalisées à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% CO<sub>2</sub> – 20% O<sub>2</sub>. Les cellules ATDC5 ont été cultivées dans un milieu d'expansion constitué de DMEM/F-12 contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF ; 11320-033 Gibco), 10 µg/mL de transferrine d'origine humaine (T3309 Sigma), et 3.10<sup>-8</sup> M de sodium sélénite (S5261 Sigma) comme décrit dans la littérature [321]. De nombreuses variantes du protocole initialement proposé par Atsumi et ses collègues ont été proposées, afin d'optimiser le modèle en termes de chondrogenèse et de rapidité de différenciation [326,332,333]. Nous avons choisi d'utiliser la plus consensuelle : les cellules ATDC5 ont étéensemencées à 6.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> en plaque 12-puits et cultivées en monocouche. A atteinte de la confluence, correspondant au J0 de l'expérimentation, et pour les 14 jours suivants, les cellules ont soit été maintenues dans le milieu d'expansion (**condition contrôle cATDC5**) ou basculées dans le même milieu supplémenté avec 10 µg/mL d'insuline d'origine bovine (I3146 Sigma) afin d'induire la chondrogenèse (**condition induite iATDC5**). A partir de J14 et jusqu'à la fin de l'expérimentation, le DMEM/F12 a été remplacé par du α-MEM medium (12561-056 ; Gibco) supplémenté avec 10 mM de βGP (G9422 ; Sigma-Aldrich). Le milieu de culture a été renouvelé un jour sur deux. Aux point expérimentaux J3, J7, J14, J17, J21, J28, et J35, les cellules ont été rincées puis lavées 5 min dans du PBS puis déprivées en SVF deux jours (permettant une meilleure analyse subséquente des protéines sécrétées par spectrométrie de masse).

#### 3.3.2. Design de l'étude

L'étude requérant de multiples méthodes analytiques ne pouvant pas être réalisées sur le même échantillon, 15 répliques de chaque condition de culture ont été préparés pour chaque point expérimentaux. Parmi eux, 3 répliquas ont été destinés à l'analyse histologique de la minéralisation, 3 à l'analyse histologique du contenu en PG, 3 pour le dosage de l'ADN total, et 3 pour l'ensemble des études protéomiques, permettant ainsi l'analyse de tripliquas technique pour chaque procédure analytique. Des données préliminaires non publiées ont montré que pour

des expérimentations indépendantes les cellules iATDC5 répondaient différemment en termes de ratios de régulation à des points expérimentaux donnés, mais en suivant toujours la même tendance. Ainsi, la quasi-totalité des données décrites dans le présent manuscrit a été obtenue d'une expérimentation unique (sauf mention contraire), chaque répliquas techniques ayant été cultivé et passé en même temps.

### **3.3.3. Etudes histologiques de la différenciation et de la minéralisation**

Les tapis cellulaires cATDC5 et iATDC5 ont été colorés au bleu Alcian 8GX pH 0.1 (S/6-2 ; RA Lamb) et au rouge Alizarin (A5533 ; Sigma-Aldrich) à différents points expérimentaux pour analyser le contenu en PGs et la minéralisation de la MEC, respectivement. Les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS, fixées dans de l'éthanol glacial 90% à -20 °C jusqu'à la fin de l'expérimentation, permettant l'analyse histologique de tous les points expérimentaux d'intérêts en même temps. Après les avoir décongelées et rincées dans l'eau puis colorées au bleu Alcian 0,1% dans de l'HCl 0,1M sur la nuit, ou au rouge Alizarin 1% dans de l'eau distillée (pH 4,1-4,3) pour 45 sec, les cellules ont été rincées à l'eau distillée, séchées puis photographiées avec un scanner conventionnel. Par la suite, le bleu Alcian a été dissout dans de l'HCl 6M sur une nuit, et une mesure de l'absorbance à  $\lambda = 600\text{nm}$  a été réalisée en plaque 96 puits, à l'aide d'un spectrophotomètre Varioscan (Thermofischer). La mesure par spectrophotométrie de la coloration au rouge Alizarin a été réalisée comme décrit dans la littérature [348].

### **3.3.4. Dosage du contenu en ADN par le dosage de Hoechst**

Les tapis cellulaires cATDC5 et iATDC5 ont été lysés par deux cycles de sonication en mode pulsatif de 30 sec dans 1 mL de tampon contenant 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH 7,4. Les échantillons ont été centrifugés 30 min à 4°C, 16 000 g. 200  $\mu\text{L}$  de solution de Hoechst 33258 à 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (H3569 Invitrogen) ont été ajoutés à 10  $\mu\text{L}$  de surnageant et placé dans une plaque 96-puits. La mesure fluorométrique a été réalisée sur un Varioskan Flash (Thermo Scientific) avec le logiciel *Skant* 2.4.3. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'absorption ont respectivement été fixées à 348 nm et 456 nm. La quantification absolue a été déterminée en utilisant une courbe standard préparée à partir d'ADN de thymus de veau (D3664 ; Sigma).

### **3.3.5. Extraction d'ARN et transcription reverse**

Les ARN totaux ont été isolés de cellules cATDC5 et iATDC5 grâce au kit RNeasy mini kit® (74104 ; Qiagen). 100 ng d'ARN totaux ont ensuite été retro-transcrits en utilisant une M-MLV

reverse transcriptase (28025021 ; Invitrogen) et des amorces hexamériques aléatoires, selon les instructions fournies par le fabricant.

### 3.3.6. Réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel

Les PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées et calibrées par des courbes standards en utilisant les amorces listées dans le Tableau 6. Les résultats ont été normalisés au niveau d'ARNm de *RPS29* comme décrit dans la littérature [349] et exprimés en ratios de régulation par rapport au contrôle (iATDC5 v. cATDC5).

Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées et gènes cibles étudiés par PCR quantitative en temps réel.

<b>Gène cible</b>		<b>Séquences des amorces (5'-3')</b>
<i>PS29</i>	For	GGAGTCACCCACGGAAGTT
	Rev	GCCTATGTCC TTCGCGTACT
<i>COL1A1</i>	For	GTCCCGCTGGTCAAGATG
	Rev	CTCCAGCCTTTCCAGGTTCT
<i>COL2A1</i>	For	TGGTATTCCTGGAGCCAAAG
	Rev	ACCAGTTGCACCTTGAGGAC
<i>COL10A1</i>	For	TTCATCCCATACGCCATAAAG
	Rev	AGGGACCTGGGTGTCCTC
<i>PGCA</i>	For	GCTGCAGTGATCTCAGAAGAAG
	Rev	GATGGTGAGGGAAGACCCTA
<i>MMP13</i>	For	ACTCAAATGGTCCCAAACGA
	Rev	GGTGTCACATCAGACCAGACC

### 3.3.7. Fractionnement protéique

Le processus analytique est résumé en Figure 43. Sauf mentions particulières, les centrifugations ont toutes été réalisées à 16 000 g, toutes les étapes ont été réalisées à 4 °C, et les fractions ont été conservées -80°C jusqu'à leur utilisation. Les sécrétomes ont été collectés, clarifiés et conservés. Les monocouches ont été lavées deux fois dans du PBS, grattées dans 1 mL de PBS-Triton X-100 1%, transférées dans un tube 1,5 mL (Eppendorf) et centrifugées. La fraction soluble a été collectée et le contenu protéique total a été dosé grâce au kit Pierce® BCA Protein Assay Kit (23225 ; Thermo Scientific) selon les recommandations du fabricant. La fraction insoluble a été lavée une fois dans 1 mL de PBS-Triton X-100 1% puis extraite dans 500 µL de tampon guanidine [guanidine hydrochloride (G3272 ; Sigma-Aldrich), 6 M ; Tris 50 mM, DTT 50 mM, pH 8,0] une nuit et sous rotation. La fraction soluble dans la guanidine a été collectée. La fraction insoluble restante a été lavée une fois dans du tampon guanidine puis deux

fois dans de l'eau distillée, et équilibrée une nuit sous rotation dans 500  $\mu$ L d'acide formique pure (AF ; 405792 Carlos Erba). 1 vol. d'eau a été ajouté et la fraction soluble dans l'AF a été retirée. Le matériel restant insoluble a été resuspendu dans 200  $\mu$ l AF, 70% contenant 0,125 M de bromure de cyanogène (CNBr ; C91492 Sigma-Aldrich) et incubé une nuit sous rotation à température ambiante dans le noir et sous une hotte. A ce stade, aucun matériel insoluble n'était visible à l'œil. 5 vol. d'eau distillée ont été ajoutés et les échantillons ont été séchés sur la nuit avant leur conservation, les effluents ont été collectés dans un piège à vide contenant de la soude en excès.

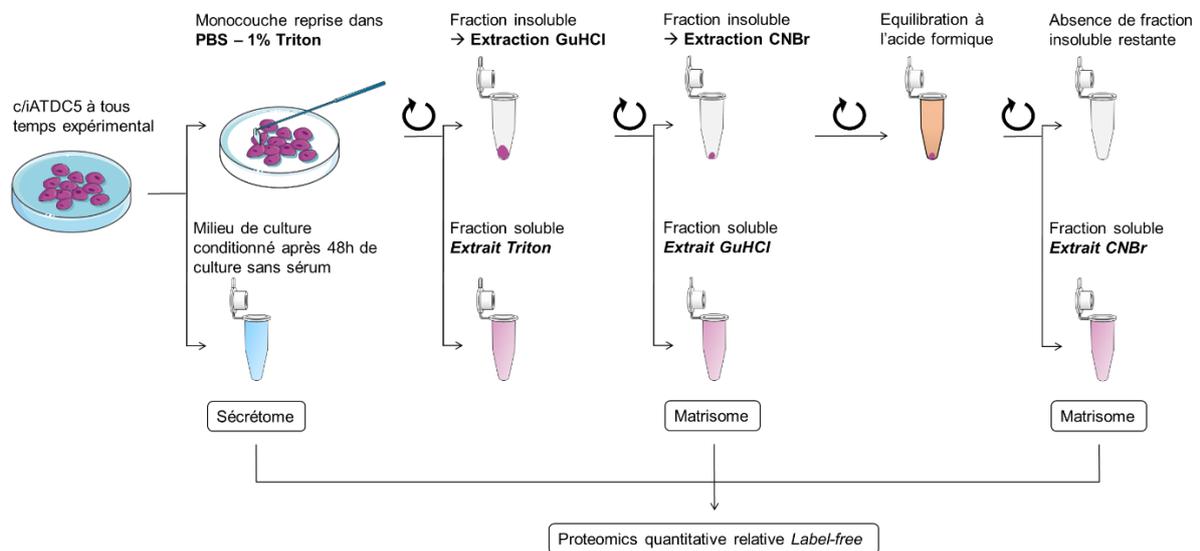


Figure 43 : Schéma récapitulant le processus expérimental employé pour la préparation des échantillons issus des cellules cATDC5 et iATDC5.

### 3.3.8. Normalisation des échantillons pour l'analyse protéomique

Tous les échantillons ont été normalisés en fonction du contenu en ADN au point expérimental correspondant (Figure 44).

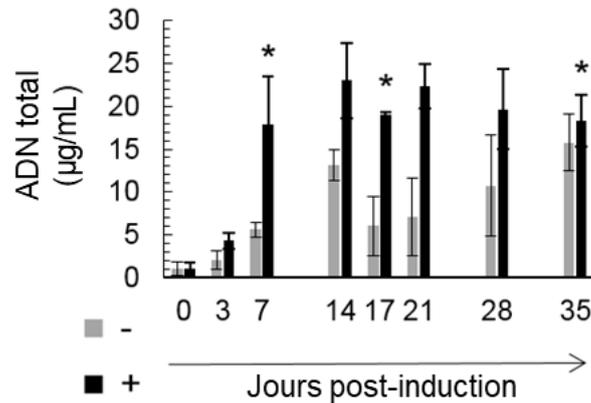


Figure 44 : Contenu total en ADN mesuré par le dosage de Hoechst des cellules iATDC5 (+) et cATDC5 (-). Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard à la moyenne de trois mesures à partir de triplicatas biologiques. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative (test t \*: valeur  $p < 0,05$  ; \*\*: valeur  $p < 0,01$ ).

Les sécrétomes ont été normalisés par dilution dans du milieu d'expansion, précipités au DOC (Na-deoxycholate 2% ; D6750 ; Sigma) / TCA (Trichloroacetic acid 15% ; T6399 ; Sigma), rincés deux fois dans l'acétone, resuspendus dans 20 µL de tampon urée (6 M Urea, 50 mM Tris, pH 8.0) et stockés jusqu'à utilisation. Les extraits guanidine ont été précipités dans 2 vol. d'éthanol glacial sur une nuit à -20 °C, rincés deux fois dans l'éthanol glacial, séchés 5 min et resuspendus dans un volume adéquat de tampon de Laemmli pour la normalisation, le volume minimal étant 100 µL. les échantillons ont été resuspendus par 3 cycles de congélation/décongélation. Des aliquotes de 20 µL ont été précipités à l'éthanol, séchés et resuspendus dans 20 µL de tampon urée, puis conservés jusqu'à utilisation. Les extraits secs CNBr ont été directement resuspendus dans du tampon de Laemmli, normalisés et préparés pour analyses de la même façon.

### 3.3.9. Préparation des échantillons pour l'analyse protéomique

Avant la digestion à la trypsine des sécrétomes et des extraits guanidine uniquement, 20 µL des échantillons normalisés dans du tampon urée ont été traités à température ambiante avec 0,8 µl de DTT 100 mM pour 45 min, puis avec 0,8 µl IAA (iodoacetamide) 1 M pour 45 min, et finalement avec 0,8 µl DTT 1 M pour 10 min. Les échantillons ont été dilués 10 fois dans du Tris, 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8,0, contenant 200 ng de trypsine de grade séquençage (V5280 ; Promega) et incubés à 37 °C sur la nuit. Les digestats tryptiques ont été purifiés sur des colonnes C18 (89870 ; Thermofischer) selon les recommandations du fabricant, resuspendus

dans 20  $\mu$ l d'ACN (Acétonitrile) 2 %, TFA (acide trifluoroacétique) 0,1 % et transféré dans des tubes destinés à l'analyse par nanoHPLC.

### **3.3.10. Nano-HPLC setup pour investigations protéomique**

Le fractionnement des échantillons a été réalisé comme décrit précédemment [350], avec quelques légères adaptations dépendantes de l'échantillon : pour les sécrétomes et les extraits guanidine, les échantillons ont été séparés en 340 fractions sur de plus longs cycles de chromatographie liquide, le gradient en ACN étant allongés à 60 min, afin de mieux faire face à la complexité de l'échantillon. Pour les extraits CNBr, compte tenu de l'hydrophobicité relativement faible de la plupart des peptides des collagènes, les gradients de LC ont été maintenus à 30 min et la collecte de 170 fractions a été réglée entre 17,5 et 34,5 min.

### **3.3.11. Quantification relative des peptides par LC-MALDI label-free**

Les données de protéomique par spectrométrie de masse ont été déposées dans le consortium ProteomeXchange [351] *via* le référentiel partenaire PRIDE [352], avec les identifiants suivants : PXD014121 et 10.6019 / PXD014121. Les mesures ont été effectuées principalement comme décrit précédemment [353]. Les rapports et les valeurs  $p$  du test  $t$  de Student pour toutes les coordonnées ( $m/z$  ; temps de rétention) ont été calculés à l'aide du logiciel ProfileAnalysis 2.3 (Bruker) en comparant les chromatogrammes des ions MS avec les filtres suivants : écart de masse de 50 ppm ; écart de temps de rétention de 30 secondes ; décompté au moins 3 fois dans un groupe biologique. La plupart des calculs ont été effectués à un temps expérimental donné, entre un échantillon issu de cellules iATDC5 et son contrôle cATDC5 correspondant. Cependant, les sécrétomes cATDC5 se sont avéré être progressivement contaminés par les protéines du sérum utilisé pour la culture cellulaire de J21 à J35 (Figure 45), protéines qui étaient susceptibles de réduire les quantités relatives apparentes de protéines individuelles d'intérêt dans les échantillons correspondants.

Ainsi, les protéines trouvées augmentées dans les cellules iATDC5 à ces temps expérimentaux ont été validées par le calcul de leur ratio de régulation entre des temps successifs, de J14 à J35. Tous les calculs autorisés ont été exportés vers le serveur ProteinScape 2.4.

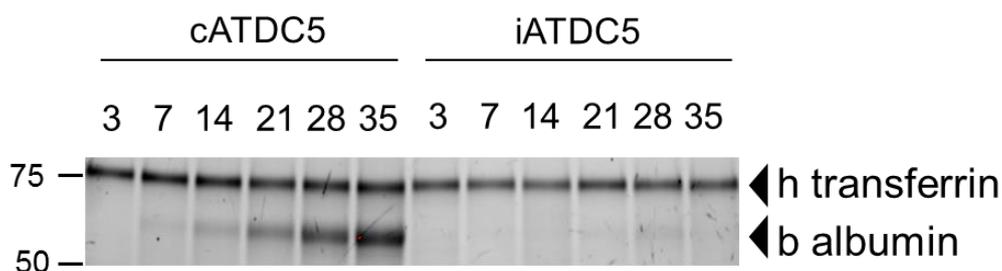


Figure 45 : Les sécrétomes des cellules cATDC5 sont progressivement contaminés par les protéines du sérum, notamment l'albumine. Gel révélé en stain-free, technologie Bio-Rad® permettant de révéler aux UV le profil électrophorétique d'un gel SDS-PAGE. NB : Ne révèle que les protéines contenant des tryptophanes, donc typiquement pas les collagènes dépourvus de leurs propeptides.

### 3.3.12. Identifications des peptides, PTM et protéines

Toutes les coordonnées (m/z : temps de rétention) trouvées régulées significativement (valeur  $t$  du test de Student  $< 0,05$ ) à tout moment avec des rapports relatifs inférieurs à -2 ou supérieurs à +2, ont été sélectionnées en créant des listes correspondantes de précurseurs classés dans ProfileAnalysis, qui ont ensuite été utilisés pour la fragmentation MS/MS automatisé à l'aide de méthodes automatiques dédiées dans le logiciel WARP-LC (Bruker). De plus, dans un échantillon aléatoire de chaque analyse, tous les peptides dont la masse a été trouvée avec un ratio  $s/n > 20$  ont également été sélectionnés pour l'analyse MS/MS. Tous les spectres MS/MS obtenus, ainsi que les coordonnées (m/z ; temps de rétention) correspondantes ont été exportés vers le serveur Proteinscape 2.4 et utilisés pour l'interrogation de la base de données des protéines de souris Swissprot via le serveur Mascot 2.4. En fonction des échantillons considérés (sécrétomes, extraits guanidine ou CNBr), il existe des distinctions dans les filtres d'interrogation de base de données et le traitement des données, qui sont détaillés dans les légendes des données supplémentaires correspondantes, disponibles au format numérique. Pour l'analyse globale des extraits, les protéines ont été considérées comme identifiées avec une certitude suffisante si elles obtenaient un FDR (false discovery rate) inférieur à 0,5% en utilisant la stratégie du leurre aléatoire.

### 3.3.13. Calcul du ratio de régulation protéique et interprétation statistique

Les ratios et les valeurs  $p$  correspondantes ont été attribués aux peptides identifiés dans Proteinscape 2.4 en utilisant les critères d'alignement suivants : écart m/z  $< 0,03$  Da ; écart du temps de rétention  $< 30$  s. Pour chaque protéine identifiée avec 4 peptides ou plus ayant passé le contrôle qualité, les deux peptides présentant les valeurs de rapport les plus basses et les plus

élevées ont été exclus. De plus, lors de l'analyse des sécrétomes, en raison de la régulation massive de l'hydroxylation des prolines dans les collagènes fibrillaires (voir §4.1.3.2.), tous les peptides correspondant à leurs triples hélices ont été désélectionnés manuellement, ne laissant pour le calcul que les peptides provenant des régions des C-propeptides. Pour tous les peptides restants d'une protéine donnée, la valeur médiane des rapports observés a été utilisée comme ratio de régulation protéique. De même, la valeur médiane de toutes les valeurs  $p$  des peptides restants a été utilisée comme valeur  $p$  pour le ratio observé (le cas échéant). Dans le cas de modifications qualitatives (peptides observés dans les trois répliques d'un groupe donné mais manquant dans l'autre), les ratios et tests  $t$  n'ont pas pu être calculés et par conséquent, ces peptides n'ont pas été intégrés dans les statistiques de la protéine correspondante. Cependant, les modifications qualitatives des peptides ont été retenues dans les tables de protéines, car il existait des protéines décrites que par ces peptides, reflétant ainsi une régulation importante mais non quantifiable. Ces cas ont été considérés chaque fois que la protéine correspondante était décrite par au moins deux de ces peptides (tous présentant des régulations cohérentes).

#### **3.3.14. Analyse par Western blot**

Les western Blots ont été réalisés comme indiqués en §3.2.4.

#### **3.3.15. Analyse par SM des bandes de gel polyacrylamide**

Pour l'analyse du contenu en protéines des bandes de gel, les morceaux de gel ont été lavés comme suit : trois fois dans 200  $\mu$ L de bicarbonate d'ammonium (BA) 100 mM pendant 15 min, une fois dans 200  $\mu$ L d'acétonitrile (ACN) 50% / BA 50% pendant 15 min, une fois dans 200  $\mu$ L de BA pendant 15 min et enfin deux fois dans 200  $\mu$ L d'ACN pendant 3 min. Les fragments de gel ont ensuite été soumis à une sonication pendant 2 min et séchés pendant 30 min. 100 ng de trypsine ont été ajoutés dans un volume total de 20  $\mu$ l de BA 50 mM, et la digestion a été effectuée pendant une nuit à température ambiante. Les peptides ont été extraits deux fois dans 25  $\mu$ L d'acide trifluoroacétique (TFA) 1%/ACN 80% sous sonication pendant 7 min, les surnageants ont été regroupés, séchés et remis en suspension dans 10  $\mu$ L d'ACN 2% TFA 0,1% et soumis à une sonication pendant 30 secondes. Les surnageants ont été transférés dans des tubes d'échantillonnage nano-HPLC et traités pour l'analyse MALDI comme décrit ci-dessus, sans notion de quantification relative, les ions étant sélectionnés pour la fragmentation sur la base de leur rapport  $s/n$ , le seuil minimal étant fixé à 20.

### **3.3.16. Analyse bioinformatique d'ontologies des gènes**

Les protéines identifiées par LC-MALDI-MS/MS ont été analysées à l'aide de l'outil en ligne de bioinformatique DAVID v6.7 [354] afin d'obtenir une description complète des processus biologiques surreprésentés et des groupes de protéines fonctionnellement liés dans notre ensemble de données. Pour l'analyse, seuls les termes significativement surreprésentés (FDR ;  $p < 0,005$ ) ont été pris en compte. Le génome par défaut de *Mus musculus* a été utilisé comme référence.

### **3.3.17. SDS-PAGE et coloration des gels**

Les mêmes échantillons utilisés dans l'analyse MS ont été séparés par SDS-PAGE sur des gels PROTEAN® TGX Stain-Free™ à gradient 4-20% (456-8095 ; BIO-RAD), fixés, lavés à l'eau et colorés avec du bleu de Coomassie colloïdal comme décrit [355] ou du bleu de diméthylméthylène [356] (dMMB ; 03610 ; Polysciences) comme suit : 122 mg de dMMB ont tout d'abord été dissous dans 10 mL d'éthanol pendant une nuit, puis soumis à une rotation pendant 2 h. La solution de coloration consistait en 5 mL de la fraction soluble obtenue, diluée dans 100 mL d'acide formique, 1 mM, pH 3,5, éthanol à 20%. Les gels ont été colorés pendant une nuit et lavés à l'eau pure plusieurs fois.

## 3.4. CARACTERISATION DU ROLE DE CPII DANS LA MINERALISATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE CARTILAGINEUSE

### 3.4.1. Invalidation des cellules ATDC5 pour PCPE-1 par des shARNs

#### 3.2.1.1. Design et clonage des shARNs

Le plasmide lentiviral a été créé par Dmitri Wiederschain [357] et mis au service de la communauté scientifique (21915 ; Addgene). Les plasmides permettant la production de particules virales (psPAX2 12260 et pMD 12259 ; Addgene) ont été obtenus chez Addgene. Les amorces décrites dans le Tableau 7 ont été désignées comme recommandé par le fournisseur à l'aide de l'outil en ligne *siRNA* du Whitehead Institute for Biomedical Research et synthétisé par Eurofins genomics (Figure 46). 6 couples d'amorces, soit 6 shRNAs, ciblant des régions différentes de l'ARNm de PCPE-1 ont été générés. Le clonage des amorces dans les plasmides pLKO – TRC (constitutif pour la validation des shARNs) et pLKO – Tet – On (inductible à la doxycycline, pour l'étude de l'effet de l'invalidation de PCPE-1 au cours de la différenciation des cellules ATDC5) a été réalisé selon les recommandations du fournisseur (Addgene plasmid 10878. Protocol Version 1.0. December 2006.)

Tableau 7 : Séquence des amorces utilisées pour la génération de shRNA dirigés contre PCPE-1.

<b>shARN</b>	<b>Séquence des couples d'amorces (5' → 3')</b>
1 (For)	CCGG GCACCTTGCAGAGCAACTTCT CTCGAG AGAAGTTGCTCTGCAAGGTGC TTTTGG
(Rev)	AATT CAAAAA GCACCTTGCAGAGCAACTTCT CTCGAG AGAAGTTGCTCTGCAAGGTGC
2 (For)	CCGG GCTTATTGGTGCTTATAAA CTCGAG TTTATAAGCACCAATAAGC TTTTGG
(Rev)	AATT CAAAAA GCTTATTGGTGCTTATAAA CTCGAG TTTATAAGCACCAATAAGC
3 (For)	CCGG GTTCTTATCCAAATAAATA CTCGAG TATTTATTTGGATAAGAAGC TTTTGG
(Rev)	AATT CAAAAA GTTCTTATCCAAATAAATA CTCGAG TATTTATTTGGATAAGAAGC
4 (For)	CCGG GGCAACCAAGTGACTTTAAGG CTCGAG CCTTAAAGTCACTTGGTTGCC TTTTGG
(Rev)	AATT CAAAAA GGCAACCAAGTGACTTTAAGG CTCGAG CCTTAAAGTCACTTGGTTGCC
5 (For)	CCGGC GCTGACCTTCGAGAAGTTTG CTCGAG CAAACTTCTCGAAGGTCAGCG TTTTGG
(Rev)	AATT CAAAAACGCTGACCTTCGAGAAGTTTG CTCGAG CAAACTTCTCGAAGGTCAGCG
6 (For)	CCGGC CTGACACGTAAGTCCGATAT CTCGAG ATATCGGCAGTACGTGTCAGG TTTTGG
(Rev)	AATT CAAAAACCTGACACGTAAGTCCGATAT CTCGAG ATATCGGCAGTACGTGTCAGG

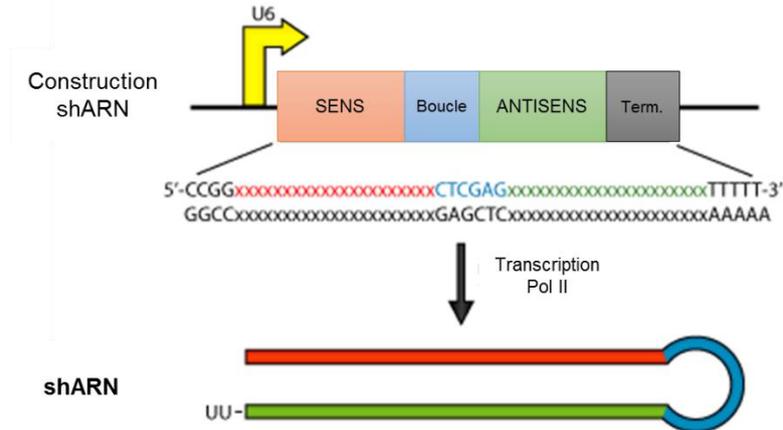


Figure 46 : schématisation d'une construction de shARN et représentation de la structure en tige – boucle caractéristique adopté par les shARNs. sh : short hairspin = structure en tige boucle.

### 3.2.1.2. Génération de lentivirus

Les lentivirus ont été générés dans des cellules HEK - 293T cultivée en milieu DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, 10 % de SVF, 1% d'acide aminés non-essentiels, 1% pénicilline – streptomycine, et 1% L – glutamine.  $4 \cdot 10^6$  cellules HEK - 293T ont étéensemencées en boîte de pétri de diamètre 10 cm. Le lendemain, 3h avant transfection, le milieu de culture a été renouvelé. Les cellules ont été co-transfectées avec 24  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique (12 $\mu\text{g}$  de plasmide pLKO, 9  $\mu\text{g}$  de PAX2 et 3  $\mu\text{g}$  de pMD2G) dilué dans 1,6 mL de milieu de culture sans sérum auxquels sont ajoutés 24  $\mu\text{L}$  de Turbofect. 24h plus tard, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de généticine ont été ajoutés au milieu. Les milieux conditionnés contenant les particules virales produites ont enfin été collectés 24 h après, soit un total de 48h post-transfection. Les particules virales obtenues ont été ultracentrifugées deux fois 1h30 à 24000g afin de les concentrer, puis reprises dans du glycérol 20%. les milieux conditionnés ont été aliquotés et conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

### 3.2.1.3. Détermination du MOI

Des cellules de la lignée HT1080 ont été cultivées en milieu DMEM contenant 4,5 g/L de glucose, 10 % de SVF, 1% d'acide aminés non-essentiels, 1% pénicilline – streptomycine, 1% L – glutamine et 1% sodium – pyruvate.  $2,5 \cdot 10^4$  cellules HT1080 ont étéensemencées en puits de plaque 24 puits. 24h plus tard le milieu a été changé pour du milieu de culture supplémenté en polybrene (TR-1003-G ; Merk) à 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Des volumes croissants de milieux conditionnés contenant les particules virales a été ajouté afin de déterminer le titre en lentivirus : 0, 10, 25,

50, 100 et 200  $\mu$ L en triplicatas. Après incubation 24h dans un incubateur dédié, le milieu a été retiré et changé pour du milieu contenant 2  $\mu$ g/mL de puromycine. La sélection antibiotique a été réalisée sur une semaine avec renouvellement du milieu de sélection tous les jours. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS et fixées avec 100  $\mu$ L de glutaraldehyde 1% PBS, 20 min à température ambiante. Après lavage au PBS, les cellules ont été colorées au cristal violet 0,1%, 10 mM Tris, pH 6,8, 20 min à température ambiante. Après 3 lavages à l'eau, les clones ont été comptés au microscope et le MOI (*Multiplicity of Infection* – multiplicité d'infection) déterminé.

#### 3.2.1.4. *Infection des cellules ATDC5 cibles et sélection clonale*

5.10<sup>6</sup> cellules de la lignée ATDC5 ont été transduites en plaque 24 puits avec les particules virales précédemment produites, permettant l'expression de chacun des shARNs indépendamment, à un MOI de 1 : 250 (1 particule virale pour 250 cellules). Après 24h d'incubation, le milieu a été changé pour du milieu d'expansion décrit en §3.1.1. additionné de 4  $\mu$ g/mL de puromycine. Le milieu a été renouvelé tous les jours et la sélection faite jusqu'à atteinte de la confluence. Les cellules ont ensuite été passées pour permettre leur expansion. Le milieu conditionné sans sérum d'un puit de plaque 6 puits pour chacun des shARNs testé a été précipité et analysé en western blot pour l'expression et la sécrétion de PCPE-1.

### 3.4.2. **Invalidation des cellules ATDC5 pour PCPE-1 par la technologie CRISPR – Cas9**

#### 3.4.2.1. *Design et clonage des ARNs guides*

Le design et la validation de 3 ARNs guides présentés dans le Tableau 8, ainsi que leur clonage dans deux plasmides « tout – en – un », le plasmide pX458 contenant la GFP comme gène rapporteur (pSpCas9(BB)-2A-GFP ; #48138 ; Addgene), ou le plasmide pX459 contenant le gène de résistance à la puromycine (pSpCas9(BB)-2A-Puro ; #62988 ; Addgene) ont été réalisés par la plateforme TACGENE, hébergée par l'équipe Structure et Instabilité des Génomes du MNHN - CNRS UMR 7196 / INSERM U1154 - Sorbonne Universités. Les 3 ARNs guides designés ciblent l'exon 2 du gène codant PCPE-1 murin (chr5 : 137610369 – 137610521).

Tableau 8 : Séquence des ARNs guides utilisés pour la génération de la lignée ATDC5 invalidée pour PCPE-1 par CRISPR – Cas9.

<i>ARN guide</i>	Séquence (5' → 3')	PAM	%InDel
<i>sgmPCPE1_1</i>	CGGTCACGTCCCCTCCGCAC	AGG	7
<i>sgmPCPE1_2</i>	GACCGGGGAGTCAGGTTACG	TGG	4
<i>sgmPCPE1_3</i>	TCAGGTTACGTGGCAAGTGA	GGG	4

Seul le plasmide permettant l'expression de l'ARN guide sgmPCPE1\_1 a été utilisé pour nos expérimentations, car il présente le taux le plus élevé d'insertion de mutation.

#### 3.4.2.2. *Transfection des cellules ATDC5 et sélection clonale*

Des cellules ATDC5 ont étéensemencées à  $2,5 \cdot 10^6$  cellules par puits en plaque 6 puits dans 4 mL de milieu d'expansion décrit en §3.1.1., puis transfectées après 24h avec 2 µg de plasmide du plasmide pX459 – sgmPCPE1\_1 (ou pX458 – sgmPCPE1\_1 comme témoin positif de transfection) et 4 µL de Turbofect, en suivant les instructions du fournisseur. 24h après transfection, la fluorescence des cellules témoins a été vérifiée au microscope à épifluorescence et le milieu a été changé pour du milieu d'expansion supplémenté en puromycine à hauteur de 4 µg/mL. Le milieu a été renouvelé tous les jours et la sélection a été faite jusqu'à atteinte de la confluence. Les cellules ont ensuite été passées en plaque 96 puits avec 1 cellule par puit pour permettre une expansion clonale. Les cellules ont été entretenue dans du milieu d'expansion et passées dans des supports de culture de dimension croissantes. Le milieu conditionné sans sérum d'un puit de plaque 48 puits pour chacun des shARNs testé a été analysé en western blot pour l'expression et la sécrétion de PCPE-1.

#### 3.4.2.3. *Génotypage des clones KO PCPE-1 obtenus par la technologie CRIPR – Cas9*

A l'atteinte de la confluence, et pour chacun des clones obtenus pour lesquels une confirmation du génotype était requise, l'ADN génomique de cellules ATDC5ensemencées en plaque 6 puits a été extrait à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue Kit (69504 ; Qiagen), en suivant les recommandations du fournisseur pour les cellules en culture. Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification de la région ciblée par le sgARN sont indiquées dans le Tableau 9. La réaction de PCR a été réalisée dans un volume final de 20 µL, en utilisant la polymérase TaKaRa LA Taq® (RR002A ; TAKARA BIO INC) selon le programme donné en Tableau 10.

Tableau 9 : Séquence des amorces utilisées pour l'amplification de la région ciblée par le sgARN

<i>Amorce</i>	<i>Séquences des amorces (5'-3')</i>
<i>For</i>	GCTGTCAAGGTTTGGCTTGG
<i>Rev</i>	CTCCTGTCCTTGACTGCCAG

Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR Purification (28104 ; Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur, puis cloné dans le vecteur pCR™-Blunt II - TOPO® (K2800-40 ; Invitrogen) également en suivant les recommandations du fournisseur.

Tableau 10 : Programme de PCR pour l'amplification de la région ciblée par le sgARN

<i>Etape PCR</i>	<i>Température (°C)</i>	<i>Temps (min)</i>	<i>Nombre de cycle</i>
<i>Dénaturation initiale</i>	98	5	1
<i>Dénaturation</i>	98	0.5	25
<i>Hybridation</i>	65	0.5	
<i>Elongation</i>	72	1	
<i>Elongation finale</i>	72	7	1

# 4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

## 4.1. CARACTERISATION DES SITES DE CLIVAGE DE LA CHONDROCALCINE

### 4.1.1. Caractérisation *in vivo* de la Chondrocalcine du cartilage articulaire bovin

#### 4.1.1.1. *In vivo*, la Chondrocalcine est une protéine du cartilage de croissance et du cartilage articulaire

Chondrocalcine est une protéine abondamment retrouvée dans le cartilage de croissance, préférentiellement aux sites de minéralisation [267,268] dans laquelle son implication a depuis longtemps été suggérée mais jamais solidement démontrée. De même, la Chondrocalcine est décrite dans le cartilage articulaire, qui hormis en circonstances pathologiques ne minéralise pas, et où la fraction protéique est essentiellement composée de collagène de type II [271]. Afin d'élucider ces différences de comportement, nous avons cherché à purifier et caractériser la Chondrocalcine issue de ces deux sources. Comme décrit dans la littérature [271], la Chondrocalcine est présente dans le cartilage articulaire et est extraite en grande partie à l'aide d'un tampon salin. A l'inverse, c'est l'acide acétique qui permet d'extraire l'essentiel de la Chondrocalcine dans le cartilage de croissance (Figure 47).

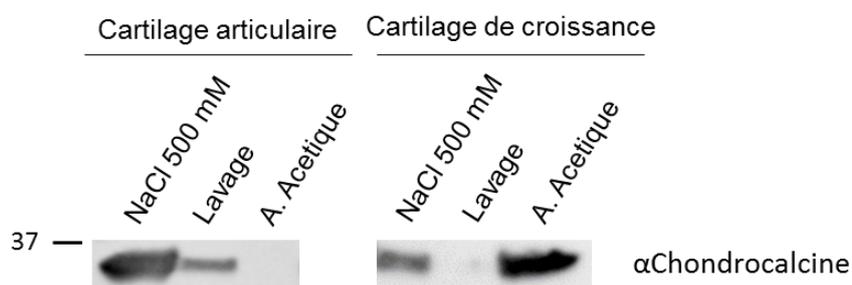


Figure 47 : La Chondrocalcine est présente dans le cartilage articulaire, et possède une extractabilité différente de la Chondrocalcine issue du cartilage de croissance. Western blot sur les extraits protéiques en tampon salin NaCl 500mM et à l'acide acétique fractionnés sur gel SDS-PAGE en condition réductrice et révélés avec un anticorps primaire dirigé contre la Chondrocalcine.

L'analyse par spectrométrie de masse (données non présentées) ne couvrant au maximum que 60% de la séquence peptidique de la Chondrocalcine extraite du cartilage articulaire pour 45%

de la séquence de la protéine extraite du cartilage de croissance, n'a cependant pas permis de mettre en évidence de différences entre les protéines issues de ces deux tissus, notamment en termes de MPT, ne permettant pas d'approfondir les raisons de ces différences d'extractabilité.

4.1.1.2. *In vivo, les sites de clivages de la Chondrocalcine du cartilage articulaire sont identiques à ceux de la Chondrocalcine issue du cartilage de croissance*

Chondrocalcine a été décrite dans le cartilage de croissance comme pouvant exister sous deux formes, en fonction de son site de clivage. La première forme de 35kDa environ, dont le site de clivage proximal au télépeptide est le plus décrit, correspond au site de clivage de BMP-1. En revanche, le second site, distal de 10 acides aminés qui produit un C-propeptide d'environ 34 kDa, ne correspond au site décrit d'aucune protéase ou endopeptidase connue à ce jour (Figure 48.A).

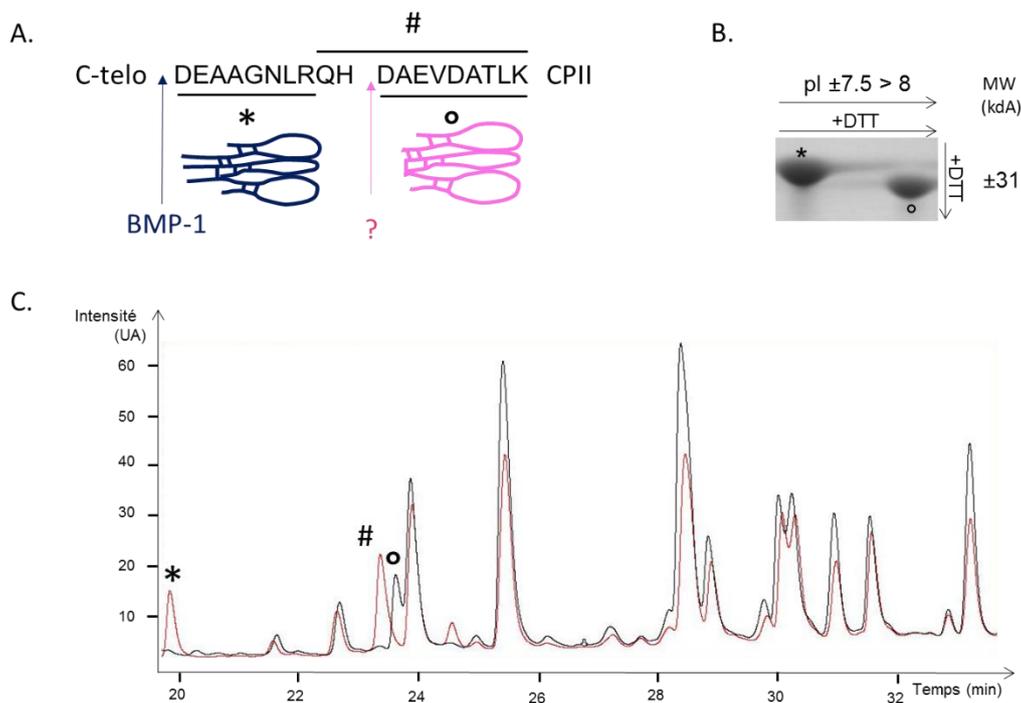


Figure 48 : la Chondrocalcine issue du cartilage articulaire subi une maturation protéolytique identique à Chondrocalcine issue du cartilage de croissance. A. Schématisation de la Chondrocalcine lorsque les trois chaînes polypeptidiques sont respectivement sous leur forme longue (site de clivage proximal par BMP-1, bleu, astérisque) et courte (site de clivage distal, rose, cercle vide). B. Gels 2D-PAGE de l'extrait protéique salins de cartilage articulaire bovin en conditions réductrices dans les deux dimensions. C. Profil nanoHPLC après digestion tryptique des spots excisés du gel 2D-PAGE présenté en B. Spot de gauche correspondant à la forme longue de la Chondrocalcine (rouge) et du spot de droite correspondant à la forme courte de la Chondrocalcine (noir) identifiés par spectrométrie de masse.

L'analyse du gel 2D-PAGE de l'extrait protéique salin de cartilage articulaire bovin en conditions réductrices dans les deux dimensions (Figure 48.B), appuyée par les données de LC-MS/MS (Figure 48.C), révèle que les chaînes polypeptidiques formant le trimère de la Chondrocalcine sont présentes sous les deux mêmes formes décrites dans le cartilage de croissance : la forme longue, clivée au niveau du site de clivage proximal par BMP-1, et la forme courte, clivée au niveau du site distal.

#### 4.1.1.3. *La Chondrocalcine existe sous quatre formes de composition en chaîne polypeptidique distinctes dans le cartilage articulaire*

L'analyse des gels 2D-PAGE de l'extrait protéique salin de cartilage articulaire bovin en conditions réductrices dans les deux dimensions, en conditions non-réductrices dans les deux dimensions, ou en conditions réductrices uniquement dans la première dimension (séparation en fonction du pI - Figure 49), appuyée par l'identification par LC-MS/MS (données non-présentées), révèle que la Chondrocalcine est présente sous forme d'un trimère d'un poids moléculaire apparent d'environ 100 kDa, comme décrit dans le cartilage de croissance.

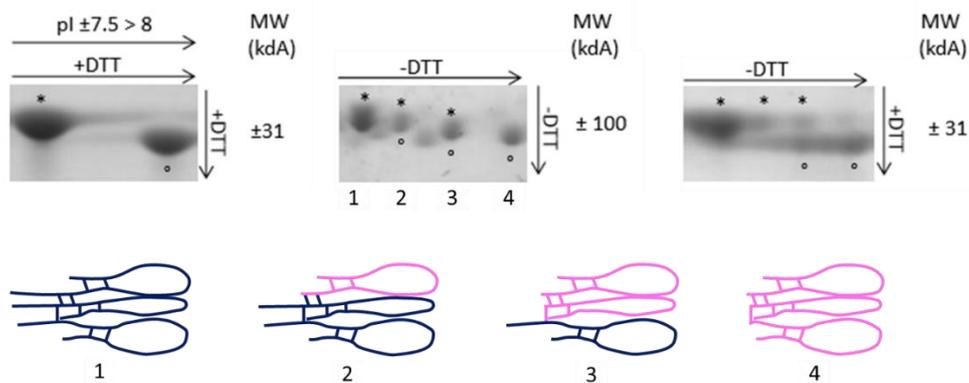


Figure 49 : la Chondrocalcine existe sous quatre formes distinctes dans le cartilage articulaire. Gels 2D-PAGE des extraits protéique salins de cartilage articulaire bovin en conditions réductrices dans les deux dimensions (panel du haut), en condition non – réductrice dans les deux dimensions (panel du milieu), et en conditions réductrices uniquement dans la deuxième dimension (panel du bas). 1, 2, 3 et 4 sont les représentations schématisation des différentes formes existentes de la Chondrocalcine avec leur composition en chaînes polypeptidiques courtes ou longues identifiées par spectrométrie de masse des spots excisés des gels 2D-PAGE. \* : indique un C-propeptide avec un peptide tryptique spécifique du site de clivage proximal,  $m/z$  1+ = 845,45 ; ° : indique un C-propeptide avec un peptide tryptique spécifique du site de clivage distal,  $m/z$  1+ = 961,51.

Par ailleurs, les quatre formes de la Chondrocalcine avec les quatre compositions en chaînes polypeptidiques possibles sont présentes dans le cartilage articulaire : trois chaînes longues, trois chaînes courtes, ou un assemblage 2 : 1 ou 1 : 2 de chaînes longues et courtes. Ces données montrent pour la première fois la coexistence de chaînes courtes et longues au sein d'un même trimère de la Chondrocalcine.

4.1.1.4. *Chondrocalcine dans le cartilage articulaire possède la même affinité pour l'hydroxyapatite que celle décrite pour la Chondrocalcine dans le cartilage de croissance*

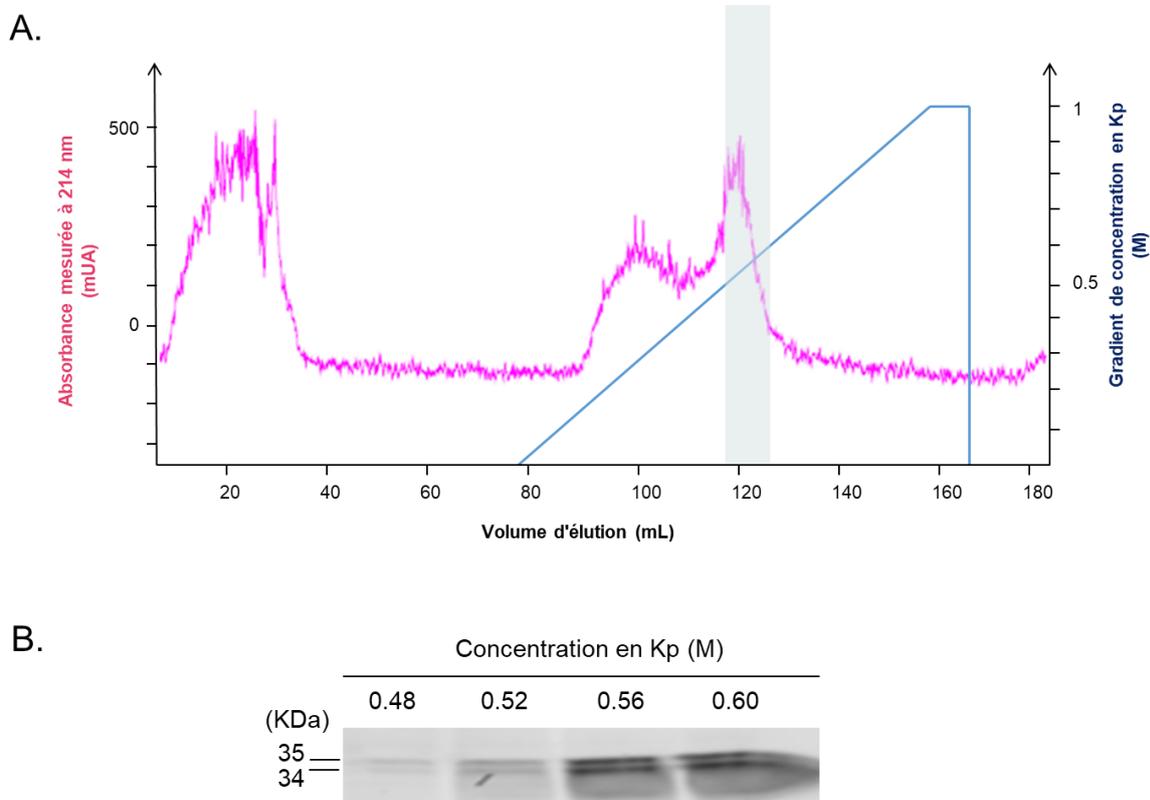


Figure 50 : la Chondrocalcine extraite du cartilage articulaire bovin possède une forte affinité pour l'hydroxyapatite. A. Profil d'éluion sur FPLC de l'extrait protéique salin à partir du cartilage articulaire bovin (rose) et gradient linéaire du tampon phosphate utilisé pour l'éluion (bleu - 20mM à 1M). B. Fractionnement sur gel SDS-PAGE des fractions éluées respectivement à 0,48 ; 0,52 ; 0,56 et 0,60 M du gradient phosphate, correspondant au cadre grisé en A. et révélation du gel par la technologie Stain-free (BioRad®). Kp : tampon phosphate.

Chondrocalcine issue du cartilage de croissance est décrite comme une protéine ayant une forte affinité pour l'hydroxyapatite [266]. Lorsque l'extrait salin des protéines du cartilage articulaire et purifié sur colonne d'hydroxyapatite, deux pics d'élution majoritaires sont observables entre 0,48 et 0,60M de phosphate (Figure 50.A – cadre bleu clair). Le fractionnement sur gel SDS – PAGE révèle que ces fractions sont composées de deux espèces protéiques d'environ 34 et 35 kDa (Figure 50.B). L'analyse par spectrométrie de masse (données non présentées) confirme l'identité de ces deux bandes comme étant la Chondrocalcine.

Ces données prises ensemble montrent pour la première fois que la Chondrocalcine issue du cartilage articulaire possède une affinité comparable à la protéine issue du cartilage de croissance pour l'hydroxyapatite, et les deux formes décrites de monomère (courte ou longue) peuvent coexister au sein d'un même trimère. L'existence de différentes formes de monomère au sein d'un unique trimère suggère un mécanisme de clivage séquentiel, dans lequel chacune des chaînes polypeptidiques serait prise en charge indépendamment. Cette idée supporte la récente mise en évidence du mécanisme d'activation de BMP-1 par PCPE-1 [164].

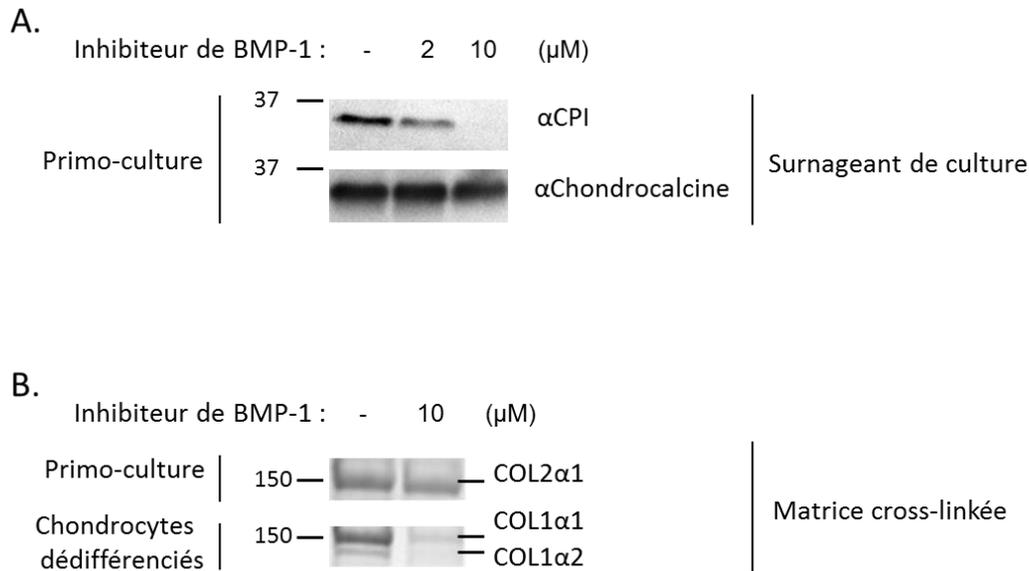
#### **4.1.2. Caractérisation du mécanisme de clivage de la Chondrocalcine**

##### *4.1.2.1. Ex vivo, les clivages de CPI et CPII présentent une différence de susceptibilité à l'inhibition de BMP-1 par un agent pharmacologique*

Les chondrocytes primaires humains en culture produisent en quantité des collagènes fibrillaires, et notamment du collagène de type I et II [350].

Ex vivo, le traitement de chondrocytes humains en culture par un agent pharmacologique inhibiteur puissant de BMP-1, l'UK 383367 [358], conduit de manière dose-dépendante à une diminution de la quantité de CPI clivé soluble détecté par western blot, jusqu'à inhiber complètement son clivage à 10  $\mu$ M (Figure 51. A – panel du haut). Notons qu'à ces doses, l'UK 383367 n'exerce pas de toxicité cellulaire évidente, puisque les chondrocytes prolifèrent de manière comparable aux contrôles et conservent une morphologie similaire (données non présentées). En revanche, le traitement par l'UK 383367 ne semble que peu influencer la quantité de la Chondrocalcine clivée soluble, même à de fortes doses (Figure 51.A – panel du

milieu). Ces résultats suggèrent que dans ce contexte d'inhibition, une autre enzyme que BMP-1 pourrait être responsable du clivage de la Chondrocalcine.



*Figure 51 : L'inhibition pharmacologique de BMP-1 réprime le clivage du C-propeptide du collagène de type I, mais pas du collagène de type II. A. Les chondrocytes primaires du patient 1 ont été exposés à des doses croissantes d'UK 383367 jusqu'à confluence, soit 10 jours. Des western blots utilisant un anticorps dirigé contre CPI ou CPII ont été réalisés sur le milieu conditionné. B. Les chondrocytes primaires du patient 3 ou les chondrocytes dédifférenciés (après deux passages successifs) du même patient ont été exposés à des doses croissantes d'UK 383367 jusqu'à confluence, soit 10 jours. Les protéines collagéniques ont été extraites et fractionnées comme indiqué en XXX et déposées sur gel polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie. COL1α1 : chaîne α1 du collagène de type 1 ; COL1α2 : chaîne α2 du collagène de type 1 ; COL2α1 : chaîne α1 du collagène de type 2*

Dès le premier passage, les chondrocytes en culture se dédifférencient et perdent l'expression de certains marqueurs phénotypiques, notamment le Col II, au profit du Col I [288]. En effet, contrairement aux chondrocytes en primo-culture qui expriment et intègrent du Col II à leur MEC cross-linkée (visible à la bande unique à environ 150 kDa correspondant aux chaînes COL2α1 qui composent l'homotrimère de Col II), les chondrocytes dédifférenciés expriment et intègrent essentiellement du Col I (visible aux deux bandes à environ 150 et 130 kDa correspondant aux chaînes COL1α1 et COL1α2 qui composent l'hétérotrimère du Col I – (Figure 51.B). En présence d'UK 383367, alors qu'il n'y a pas d'effet observable sur l'accumulation du Col II cross-linké, une chute brutale de l'accumulation du Col I cross-linké est observable. Ainsi, l'inhibition de BMP-1 et du clivage sous-jacent de CPI conduit à une

diminution importante de l'intégration du Col I dans la MEC des chondrocytes humains en culture, probablement liée à une altération de la fibrillogenèse [144]. Afin d'éviter l'accumulation de molécules improprement maturées, il est envisageable que les chondrocytes dégradent le C-procollagène de type I (procollagène débarrassé uniquement de son extrémité N-terminale) avant même sa sécrétion.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que les procollagènes de type I et de type II seraient soumis à des mécanismes de maturation protéolytiques différents.

#### 4.1.2.2. *L'inhibition de BMP-1 par un agent pharmacologique conduit à l'intégration matricielle de la Chondrocalcine*

Alors que le traitement à l'UK 383367 ne semble pas avoir d'effet sur la quantité de la Chondrocalcine soluble détectée, il conduit de manière dose-dépendante à la diminution de la quantité de CPII dans la fraction intracellulaire, et en parallèle, à l'augmentation de la quantité de CPII dans la fraction contenant les protéines collagéniques intégrées à la MEC non cross-linkée (Figure 52). Ainsi, dans ce contexte d'inhibition, le produit du clivage C-terminal du procollagène de type II s'intègre à la MEC, et semble avoir des propriétés physico-chimiques différentes de son homologue soluble.

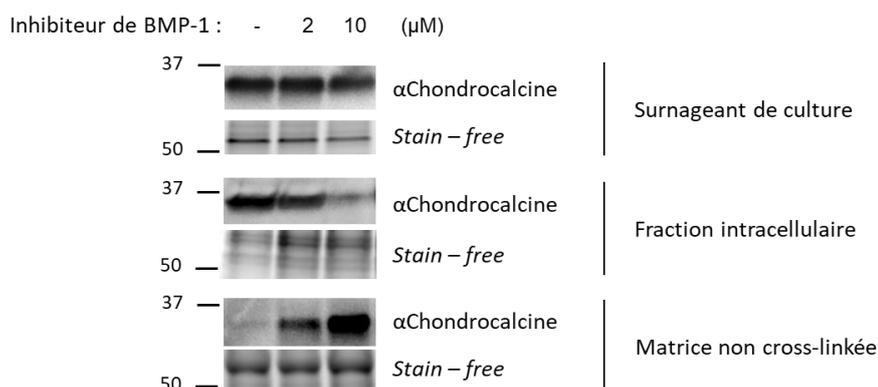


Figure 52 : L'inhibition pharmacologique de BMP-1 conduit à l'intégration matricielle de la Chondrocalcine. Les chondrocytes primaires du patient 1 ont été exposés à des doses croissantes d'UK 383367 jusqu'à confluence, soit 10 jours. Des western blots utilisant un anticorps dirigé contre CPII ont été réalisés sur le surnageant de culture, l'extrait intracellulaire ou l'extrait acide contenant les protéines intégrées à la MEC de façon non cross-linkées. Les gels révélés par la technologie Stain – free BioRad® sont montrés comme contrôle de dépôt.

Le clivage des C-propeptides est un mécanisme décrit comme pouvant prendre place de manière intracellulaire [151,153], ce qui expliquerait la quantité observée de CPII intracellulaire à l'état basal dans les chondrocytes primaires humains. Il semblerait alors que l'inhibition pharmacologique de BMP-1 conduise à l'inhibition de son clivage en intracellulaire, qui serait alors retardé dans la voie de sécrétion, lorsque le collagène est intégré à la MEC. Cependant, une donnée qui pourrait corroborer cette hypothèse n'a pas été observée : le procollagène conservant son C-propeptide n'est pas détecté en intracellulaire. Il est par ailleurs à noter que les résultats observés sur chondrocytes humains sont entièrement dépendant du patient. En effet, deux types de réponses ont été observées suite à l'inhibition de BMP-1 par l'UK 383367 : d'une part, les résultats types tels que présentés dans la Figure 52 et correspondant aux patients « répondeurs ». D'autre part, pour d'autres chondrocytes humains issus de patients dits « non-répondeurs » (données non présentées), la Chondrocalcine se comporte de la même façon que CPI : son clivage est inhibé par l'UK 383367. L'hétérogénéité inter-individuelle des réponses observées incite à développer un modèle cellulaire plus performant en termes de reproductibilité.

Une autre possibilité, réside dans la capacité des chondrocytes primaires à réinternaliser CPII [49]. L'inhibition de BMP-1, et les modifications physico-chimiques subséquentes de CPII, pourrait prévenir cette ré-internalisation, expliquant la quantité de CPII s'accumulant dans la MEC et la diminution de la quantité de CPII en intracellulaire. Cet import intracellulaire a été montré comme dépendant d'une séquence de 18 acides aminés [49], elle-même située à environ 100 acides aminés du site de clivage du CPII. Il est donc envisageable qu'une modification au niveau du site de clivage dû à l'inhibition pharmacologique de BMP-1 pourrait influencer cette séquence signal d'import, ou perturberait le recrutement d'autres interactants.

L'ensemble de nos résultats *in vivo* sur du cartilage articulaire bovin, et *in cellulo* sur des chondrocytes primaires humains en cultures corroborent ainsi l'hypothèse qu'une autre enzyme que BMP-1 serait impliquée dans le clivage de la Chondrocalcine. Cette protéase reste toutefois à être identifiée.

La caractérisation approfondie par spectrométrie de masse de la Chondrocalcine produite par les chondrocytes primaires humains, notamment en termes de longueur des chaînes polypeptidiques et de leur composition au sein du trimère n'a pas été réalisée. L'anticorps utilisé pour la détection de CPII par western blot étant dirigé contre un épitope se trouvant à l'extrémité N-ter de la Chondrocalcine, n'est pas en mesure de reconnaître la forme courte de 34 kDa

résultant du clivage distal par une protéase non-identifiée. Il est donc impossible d'affirmer sur la base des western blot ce qu'il advient de la forme de 35 kDa, si elle existe dans les chondrocytes primaires humain. Afin de disséquer au mieux les mécanismes de maturation des collagènes, et notamment le clivage de Chondrocalcine et des C-propeptides des principaux collagènes fibrillaires, le modèle cellulaire ATDC5 a été utilisé.

## 4.2. CARACTERISATION PROTEOMIQUE DU MODELE CELLULAIRE ATDC5

Les résultats obtenus pour cet axe de recherche ont été soumis en septembre 2019 dans le journal à comité de lecture *Journal of Proteomics Research* (Annexe 1).

### 4.2.1. Caractérisation phénotypique des cellules ATDC5

#### 4.2.1.1. Confrontation des résultats préliminaires avec la littérature.

Bien que les méthodes de cultures des ATDC5 proposées dans la littérature puissent diverger, les critères analytiques communément utilisés et auxquels nous avons décidé de confronter nos résultats sont les analyses histologiques, ainsi que l'analyse de l'expression des ARNm des marqueurs de la chondrogenèse (*COL2A1*, *ACAN*) et de l'hypertrophie (*COL10A1*, *MMP13*).

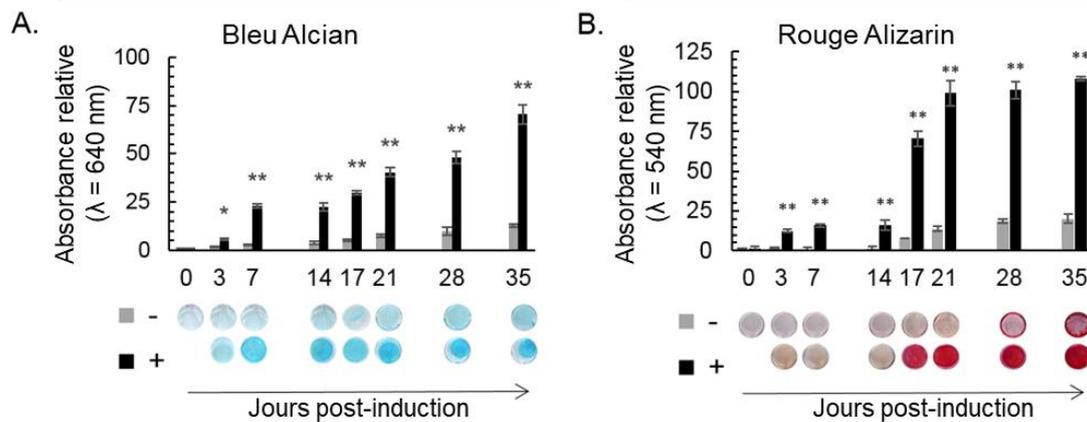


Figure 53 : Les cellules ATDC5 produisent une matrice extracellulaire minéralisée, riche en glycosaminoglycane, tout au long de l'expérimentation. La différenciation chondrogénique des cellules ATDC5 a été induite (iATDC5 ; +) ou non (cATDC5 ; -) par l'insuline. A. Production de glycosaminoglycane sulfatés étudié par coloration au bleu alcian et dosage spectrophotométrique. B. Minéralisation de la matrice extracellulaire étudiée par coloration au rouge alizarine.

Ainsi, la coloration au bleu Alcian confirme l'accumulation significative de GAGs sulfatés dès J3 dans les cellules iATDC5 comparées aux cellules contrôles cATDC5 (Figure 53. A), et tout au long de l'expérimentation. De manière cohérente, l'ARNm de l'aggrécane, le PG sulfaté majoritaire de la MEC du cartilage et marqueur de la chondrogenèse, est retrouvé régulé à la hausse tout au long de l'expérimentation (Figure 54 ; ACAN).

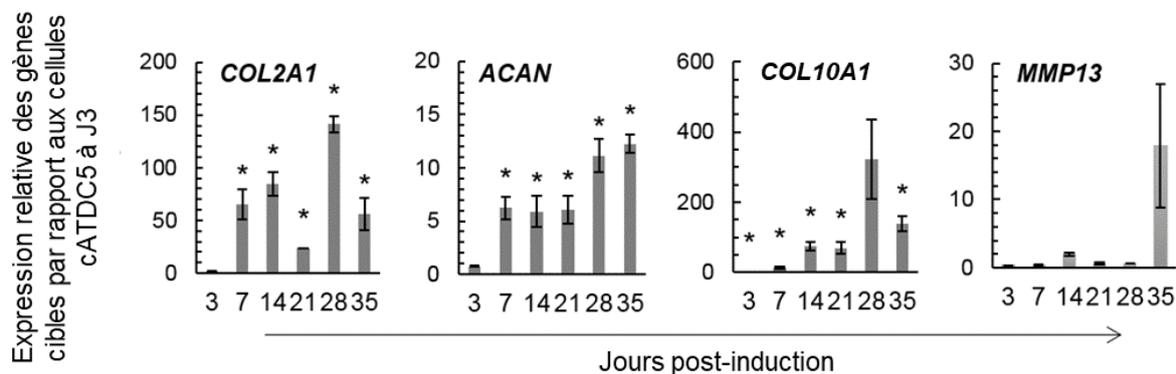


Figure 54 : Les cellules iATDC5 expriment les ARNm des principaux marqueurs chondrogéniques (COL2A1 et ACAN) et hypertrophiques (COL10A1 et MMP13). Valeurs normalisées par rapport à RPS29 et exprimée en fonction du niveau d'expression du gène d'intérêt par les cellules cATDC5 à J3. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard à la moyenne de trois mesures à partir de tripliquas biologiques et sont parfois masquées par les barres. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative (test t \*: valeur  $p < 0,05$  ; \*\*: valeur  $p < 0,01$ ).

La coloration au rouge Alizarin, qui marque les dépôts calciques, suggère une minéralisation modeste mais déjà significative de J3 à J14 (Figure 53. B), qui augmente drastiquement dès J17, soit juste après le changement de milieu de culture pour le milieu de minéralisation, contenant du  $\beta$ -glycérophosphate ( $\beta$ GP). Le niveau d'ARNm du collagène de type X (COL10A1), principal marqueur de l'hypertrophie, est significativement augmenté dans les cellules iATDC5 vs. cATDC5 tout au long de l'expérimentation pour atteindre un ratio de 200 fois à J35, alors que MMP13 ne semble pas, ici, être significativement régulée (Figure 54). Hormis l'expression de MMP13 [359], qui montre une tendance tardive mais non significative à l'augmentation, nos données sont en accord avec la littérature.

#### 4.2.1.2. L'analyse du secretome des cellules iATDC5 confirme leur phénotype chondrogénique.

Nous avons ensuite examiné les sécrétomes solubles [360] comme précédemment décrit par notre équipe [350,353]. L'analyse a révélé 72 protéines significativement *up*- ou *down*-régulées dans les cellules iATDC5 v. cATDC5, en fonction du temps. Afin d'obtenir une description complète des groupes de protéines régulées apparentés, nous avons effectué des analyses d'enrichissement annotées par Gene Ontology (GO). Une ontologie est un ensemble structuré de termes et de concepts qui représentent le sens d'un champ d'informations. Le projet de bioinformatique GO se concentre sur les fonctions des gènes, plutôt que les gènes et produits

de gènes eux-mêmes, et a pour but de permettre une interprétation fonctionnelle de résultats expérimentaux en termes de composant cellulaire, fonction moléculaire et processus biologique [361,362]. Nos analyses se sont concentrées sur les processus biologiques enrichis dans les cellules iATDC5 comparées aux cellules cATDC5 (Figure 55).

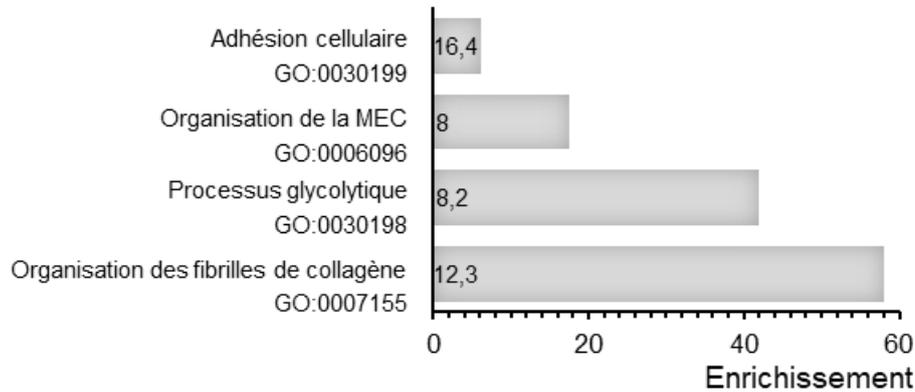


Figure 55 : Ontologie des gènes trouvés régulés dans les sécrétomes des cellules iATDC5 v. cATDC5, concentré sur les processus biologiques significativement surreprésentés dans les iATDC5 en cours de différenciation chondrogénique ( $FDR < 0,005$ ). Seuls les quatre termes les plus enrichis sont présentés. Les nombres inclus dans les barres indiquent le pourcentage de protéines impliquées dans le terme correspondant parmi toutes les protéines de notre ensemble de données.

La Figure 55 montre la classification de 33 protéines dans les quatre principaux termes GO les plus significativement enrichis. Le processus glycolytique (GO : 0006096), dans lequel sont classées la Fructose-bisphosphate aldolase A (Aldoa), l' $\alpha$ -énolase (Eno1), la phosphoglycerate kinase 1 (Pfkfb3), la phosphoglycerate mutase 1 (Pgam1), la pyruvate kinase PKM (Pkm), et la triosephosphate isomerase (Tpi1), est le deuxième terme le plus enrichi de notre ensemble de données. Ces enzymes sont toutes régulées positivement dans les cellules iATDC5 immédiatement après stimulation à l'insuline, et pendant toute la durée de l'expérimentation.

Les deux autres termes les plus enrichis sont compatibles avec la différenciation chondrogénique : l'organisation des fibrilles de collagène (GO : 0030199), le terme le plus enrichi de tous, qui contient aggrecane (PGCA), annexin A2 (ANXA2), les collagènes de type II (CO2A1), V (CO5A1 et CO5A2), XI (COBA1 et COBA2), fibromoduline (FMOD) et lysine oxydase (LYOX), et le terme organisation de la MEC (GO: 0030198), qui contient SPARC-related modular calcium-binding protein 2 (SMOC2), la Coiled-coil domain-containing protein 80 (CCD80), les fibulines 1 et 5 (FBLN1 et FBLN5), galectine-3 (LEG3), nidogen-2 (NID2), la périostine (POSTN), et la Basement membrane-specific heparan sulfate

*proteoglycan core protein* (PGCS). Les protéines appartenant à ces termes mettent en évidence une caractéristique essentielle des cellules iATDC5 : la capacité de produire en quantité une large diversité de composants de la MEC, et ce, immédiatement après stimulation à l'insuline.

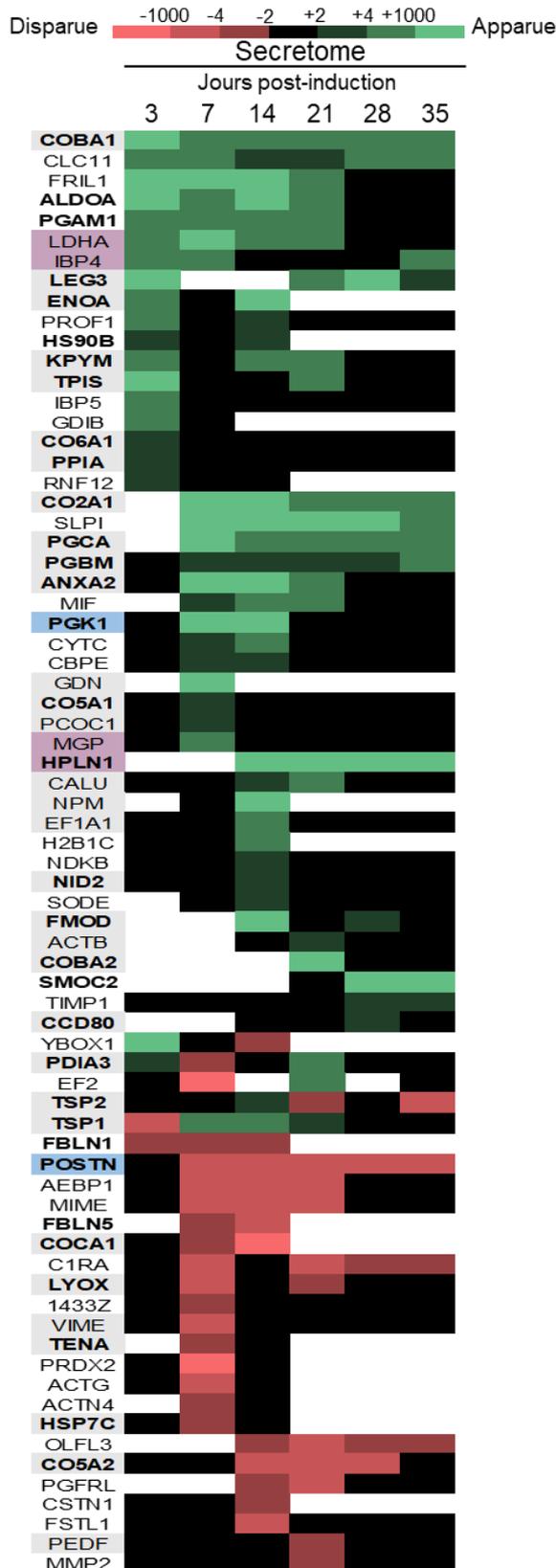


Figure 56 : Régulation en fonction du temps des protéines sécrétées par les iATDC5 par rapport aux cATDC5. Les différentes protéines sont hiérarchisées sous la forme d'une heat-map bidimensionnelle. Les abréviations de protéines sont conformes à la base de données Uniprot. La barre d'échelle indique un code de couleur allant du rouge (profondément régulée à la baisse) au vert (profondément régulée à la hausse). Des protéines « disparues » et « apparues » sont respectivement trouvées uniquement dans les sécrétomes des cATDC5 ou iATDC5, respectivement. Les protéines rapportées dans [310,363,364] sont surlignées en bleu, gris et violet respectivement. L'absence de données est indiquée par des cases blanches. Les protéines impliquées dans au moins un des quatre processus biologiques décrits sont en gras. L'ensemble des données de sortie est répertorié dans les données supplémentaires S.2.

Parmi les 72 protéines régulées au sein des sécrétomes, 42 protéines ont déjà été décrites dans la littérature comme étant régulées au niveau de l'ARNm dans la différenciation chondrogénique des cellules ATDC5 [364] ou au niveau protéique dans des contextes de chondrogenèse *in vivo* [310] et *ex vivo* [363]. Au sein de notre jeu de données, le collagène de type II et l'aggrécane sont trouvés considérablement régulés à la hausse à partir de J7 (Figure 56), confirmant pour la première fois au niveau protéique le profil d'expression de type chondrocytaire du modèle ATDC5. Le collagène de type XI (COBA1), bien que très peu utilisé en tant que marqueur, est un

composant des hétérofibrilles fonctionnelles trouvées *in vivo* dans le cartilage [365] et est observé de manière concomitante avec CO2A1. Il convient de noter que parmi les composants liés à la MEC, des protéines sont identifiées et régulées positivement, mais aussi drastiquement à la baisse, notamment la périostine (POSTN), la fibuline-1 (FBLN1), le collagène de type V (CO5A2) et le collagène de type XII (COCA1), suggérant que les cellules iATDC5 commencent non seulement à synthétiser des protéines liées au cartilage, mais cessent également de synthétiser un certain nombre de protéines liées à leur phénotype basal.

Parmi les 30 protéines non répertoriées dans la littérature sélectionnée précédemment, certaines protéines n'ont à ce jour jamais été décrites dans le modèle cellulaire ATDC5, ni dans un contexte de chondrogenèse, ou plus largement encore, dans un contexte ostéo-articulaire. C'est notamment le cas de trois protéines dont les rôles décrits actuellement sont récapitulés dans le Tableau 11. Ainsi, nos résultats suggèrent un nouveau rôle dans la chondrogenèse pour ces protéines.

En revanche, OLFL1, une glycoprotéine de la famille même famille que OLFL3 a été décrite comme ayant un rôle dans l'inhibition de la minéralisation [366] ce qui pourrait suggérer un rôle semblable pour OLF3. En effet OLFL3 est grandement régulée à la baisse dès J14, soit avant l'ajout du substrat de minéralisation durant le changement de milieu, suggérant que les cellules iATDC5 adoptent déjà un phénotype pro-hypertrophique.

Tableau 11 : Trois protéines identifiées et régulées dans le sécrétome des cellules iATDC5 n'ont pas de rôle décrit à ce jour dans la chondrogenèse.

<b>Protéine</b>	<b>Gène codant</b>	<b>Nomenclature Uniprot</b>	<b>Rôle</b>
<b>Calsyntenin - 1</b>	<i>Clstn1</i>	CSTN1	Protéine transmembranaire des neurones post-synaptique fixant le calcium – transduction du signal nerveux [367]
<b>E3 ubiquitin-protein ligase RLIM</b>	<i>Rlim</i>	RNF12	Ubiquitine – ligase, processus d'inactivation du chromosome X – morphogenèse [368,369]
<b>Olfactomedin-like protein 3</b>	<i>Olfml3</i>	OLFL3	Morphogenèse – MEC de la cornée [370]

#### 4.2.1.3. *Les extraits guanidine mettent en évidence la composition de la MEC des ATDC5.*

Afin de déterminer si les protéines synthétisées par les cellules ATDC5 sont effectivement intégrées au sein de la MEC, nous avons examiné les extraits guanidine, qui, lorsqu'ils sont préparés à partir de cartilage, sont principalement composés de PGs, de collagènes non fibrillaires et de protéines accessoires de la MEC [310]. L'extraction à la guanidine permet notamment d'extraire de la MEC toute protéine intégrée mais non-cross-linkée, c'est-à-dire non intégrée de manière covalente. Les protéines non-solubles dans la fraction extraite au détergent (ici, le triton 1%) sont également retrouvée dans l'extrait guanidine. Lorsqu'ils sont issus des cellules cATDC5 à J3, ces extraits présentent une teneur en protéines si faible que l'analyse de leur contenu en est rendue très délicate. Ainsi, afin de minimiser les biais techniques dans notre analyse, nous avons commencé à étudier les ratios de régulation protéique iATDC5 v. cATDC5 qu'à partir de J7.

Les cellules ATDC5, à partir de J7, en présence ou non d'insuline, sont capable d'assembler une MEC. L'extraction des protéines non-cross-linkées intégrées à la MEC par la guanidine montre un profil qualitativement similaire entre les cellules cATDC5 et iATDC5 (Figure 57), et qui ne varie que peu quantitativement avec le temps, en particulier pour les cellules iATDC5.

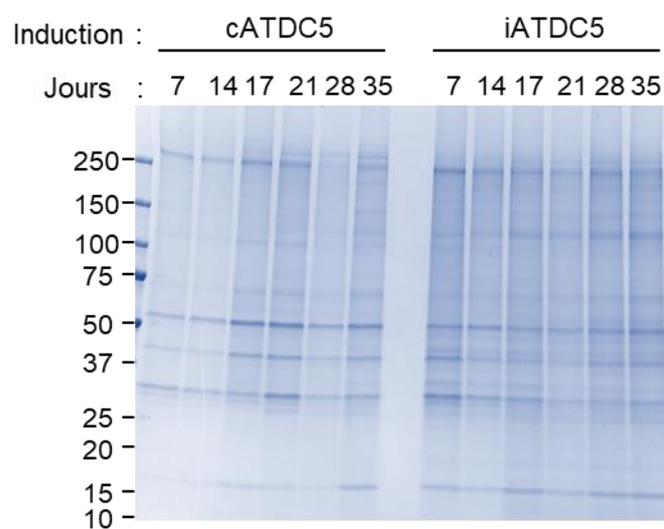
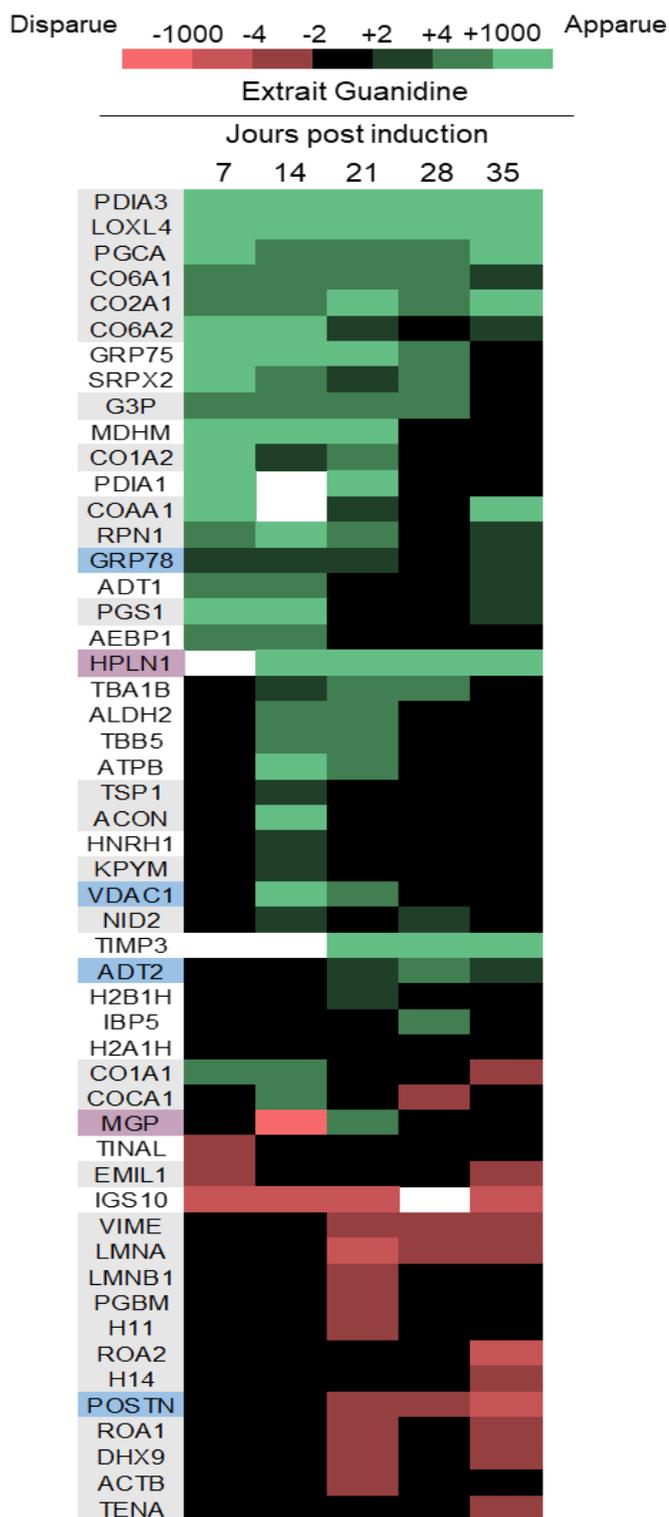


Figure 57 : Etude qualitative du contenu protéique des extraits guanidine obtenus aux temps expérimentaux marquant sur SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. Les profils électrophorétiques sont représentatifs des répliquas.



52 protéines sont trouvées régulées dans ces extraits (Figure 58) tout au long de l'expérimentation, démontrant des événements de remodelage de la MEC à la fois précoces et tardifs. En ce qui concerne les marqueurs de la chondrogenèse, les extraits guanidine sont à nouveau caractérisés par une forte régulation à la hausse du collagène de type II et de l'aggrécane, suggérant que les cellules iATDC5, en plus d'être capables de synthétiser les composants majoritaires de la MEC cartilagineuse, sont à même de les intégrer en une matrice solide. En outre, cette fraction révèle la régulation à la hausse du collagène de type X (COAA1) dès J7, protéine absente des sécrétomes. Cependant, bien que le taux d'ARNm du collagène de type X est retrouvé régulé positivement (Figure 54), il reste un composant très mineur de la MEC des cellules iATDC5, comme le suggère son score d'identification relativement faible (Mascott Score 131,7. Un Mascott Score égale ou supérieur à 80 indique une identification certaine. Disponible dans les données supplémentaires S. 2).

Figure 58 : Régulation en fonction du temps des protéines contenues dans les extraits Guanidine\* issus des cellules iATDC5 par rapport aux cATDC5. Les différentes protéines sont hiérarchisées sous la forme d'une heat-map bidimensionnelle. Les abréviations de protéines sont conformes à la base de données Uniprot. La barre d'échelle indique un code de couleur allant du rouge (profondément régulée à la baisse) au vert (profondément régulée à la hausse). Des protéines « disparues » et « apparues » sont respectivement trouvées uniquement dans les extraits guanidine des cATDC5 ou iATDC5. Les protéines rapportées dans [310,363,364] sont surlignées en bleu, gris et violet respectivement. L'absence de données est indiquée par des cases blanches. L'ensemble des données de sortie est répertorié dans les données supplémentaires S.3.

Parmi les cinquante - deux protéines retrouvées régulées dans cette fraction, vingt - quatre ont déjà été décrites dans la littérature et identifiées par analyse protéomique d'extraits guanidine issus de modèles de chondrogenèse, *in vivo* [310] et *ex vivo* [363]. Celles-ci incluent, outre les marqueurs de la chondrogenèse, les collagènes fibrillaires de type I, II et XII (CO1A1, CO2A1 et COCA1) et non fibrillaires de type VI (CO6A1 et CO6A2), des PGs (le biglycan (PGS1) et *Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein* (PGBM)) et des protéines accessoires de la MEC (le nidogen (NID2), *Sushi repeat-containing protein* (SRPX2), l'emiline-1 (EMIL1), la tenascine (TENA), et la Thrombospondin-1 (TSP1)), des enzymes extracellulaires (LOXL4) et intracellulaires (la Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3P) et la *Protein disulfide-isomerase A3* (PDIA3), des transporteurs (*Voltage-dependent anion-selective channel protein 1* (VDAC1), ADP/ATP translocase 1 et 2 (ADT1 et ADT2)), des protéines chaperonnes (GRP78), mais également des composants du cytosquelette (la tubuline (TBA1B) et la vimentine (VIM)) et nucléaires (Prelamin-A/C (LMNA)). Ainsi, près de la moitié des protéines trouvées régulées dans les extraits guanidines issus des cellules iATDC5 v. cATDC5 ont déjà été décrites dans un contexte similaire [310,363], confirmant ici encore et pour la première fois dans ce modèle au niveau protéique, le profil d'expression de type chondrocytaire des cellules iATDC5.

Nous avons également trouvé un certain nombre de protéines régulées qui n'ont jusqu'alors jamais été décrites dans un contexte de chondrogenèse, notamment un grand nombre de protéines nucléaires (Tableau 12).

Il n'est pas étonnant de retrouver des protéines nucléaires dans la fraction guanidine. En effet, cette fraction contient essentiellement les protéines non solubilisées dans le détergent, et certaines protéines nucléaires et notamment les histones sont des complexes protéiques de haut poids moléculaire classiquement extraits à la guanidine [371]. Par ailleurs, les protéines identifiées et régulées dans ces extraits pourraient davantage être inhérent au statut de cellule cancéreuse des ATDC5, plutôt qu'à un rôle de régulation de la chondrogenèse, particulièrement dans le cas de GRP75/Hspa [372], ou de certains variant des histones [373,374].

Tableau 12 : Huit protéines identifiées et régulées dans les extraits guanidines issus des cellules iATDC5 n'ont pas de rôle décrit à ce jour dans la chondrogenèse.

Protéine	Gène codant	Nomenclature Uniprot	Rôle
<b>Ribophorin 1</b>	<i>Rbm38</i>	RPN1	Sous-unité du complexe oligosaccharyl transferase (OST) – ubiquitination [375]
<b>Stress-70 protein, mitochondrial</b>	<i>Hspa9</i>	GRP75	Protéine chaperonne mitochondriale [376]
<b>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</b>	<i>Atp5f1b</i>	ATPB	ATP – synthase [377]
<b>Histone H1 et H2</b>	<i>Hist1h1a</i> <i>Hist1h2bh</i>	H11 H2B1H	Formation du nucléosome [373,374]
<b>ATP-dependent RNA helicase A</b>	<i>Dhx9</i>	DHX9	Régulation de la transcription [378]
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</b>	<i>Hnrnp1</i> <i>Hnrnpa1</i>	HNRH1 ROA1	Maturation des ARNm [379]

17 protéines apparaissent de manière redondante entre le secretome et l'extrait guanidine, notamment les collagènes de type II, VI et XII (CO2A1, CO6A1 et COCA1), des protéoglycanes (aggrécane (PGCA), *Hyaluronan and proteoglycan link protein 1* (HPLN1), *Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein* (PGBM)), des protéines sécrétées et matricielles (*Adipocyte enhancer-binding protein 1* (AEBP1), *Insulin-like growth factor-binding protein 5* (IBP5), la protéine Gla matricielle (MGP), le nidogen2 (NID2), la périostine (POSTN), la ténascine (TENA) et la Thrombospondin-1 (TSP1)), des protéines du cytosquelette (l'actine (ACTB) et la vimentine (VIME)), ainsi que des enzymes (la Pyruvate kinase PKM (KPYM), et la *Protein disulfide-isomerase A3* (PDIA3)). Parmi elles, seule AEBP1 présente un profil de régulation différent entre le sécrétome et la fraction guanidine. Profondément régulée à la baisse de J7 à J21 dans le sécrétome des cellules iATDC5, elle est en effet trouvée augmentée dans l'extrait guanidine issu des mêmes cellules entre J7 et J14, montrant son intégration rapide à la MEC cartilagineuse, en accord avec son rôle décrit dans la fibrillogenèse [380,381].

4.2.1.4. *Les extraits guanidine montrent que les iATDC5 accumulent de l'aggrécane mûré dans leur MEC.*

Parmi les protéines les plus fortement régulées à la hausse au sein des échantillons extraits à la guanidine, se trouve l'aggrécane. Ce protéoglycane d'environ 3 MDa consiste en une protéine core de 250 kDa, composée de trois domaines globulaires (G1, G2 and G3) séparés par des domaines interglobulaires, avec environ 100 chaînes de glycosaminoglycanes de type chondroïtine sulfate (CS) et 30 chaînes de type kératan sulfates (KS). Les domaines de fixation des CS et des KS sont situés sur un court domaine interglobulaire entre G1 et G2, et majoritairement entre G2 et G3 (Figure 59 ; [382]).

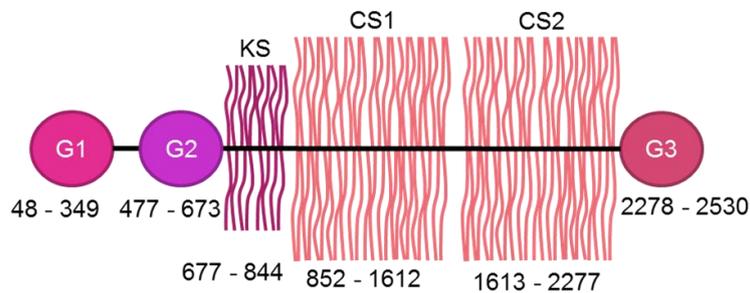


Figure 59 : Schématisation des différents domaines protéiques et porteurs de GAGs de l'aggrécane. G1, G2 et G3 sont les 3 domaines globulaires. Le domaine interglobulaire entre G2 et G3 est le principal porteur de chaînes de GAGs, notamment des kératane sulfates (KS) et des chondroïtines sulfates (CS). Les chiffres indiquent les bornes de chaque domaine dans la séquence primaire en acides aminés.

Dans notre ensemble de données, l'identification des peptides de la protéine core de l'aggrécane (jusqu'à 15 peptides identifiés à J17, détail disponible dans les données supplémentaires en ligne S. 1) est limitée aux domaines globulaires G1, G2 et G3. L'analyse par spectrométrie de masse repose sur une étape essentielle : la digestion tryptique. La trypsine, qui clive les protéines spécifiquement après les résidus Arg et Lys, ne semble pas être en mesure d'agir sur le domaine interglobulaire majoritairement porteur de GAGs car aucun peptide issu de la digestion tryptique ne peut être identifié, suggérant ainsi que ce domaine est suffisamment modifié (possiblement par des GAGs) pour prévenir son identification par LC-MS / MS.

Supposant donc que ces modifications seraient des glycations substantielles, nous avons développé une nouvelle méthode pour estimer qualitativement la taille des chaînes de chondroïtine sulfates : la coloration au bleu de diméthyl-méthylène (DMMB) de gels SDS-

PAGE. Le DMMB est couramment utilisé pour titrer la teneur en CS de divers échantillons [383], mais il serait plus raisonnable de le considérer comme spécifique des GAGs sulfatés en général [356].

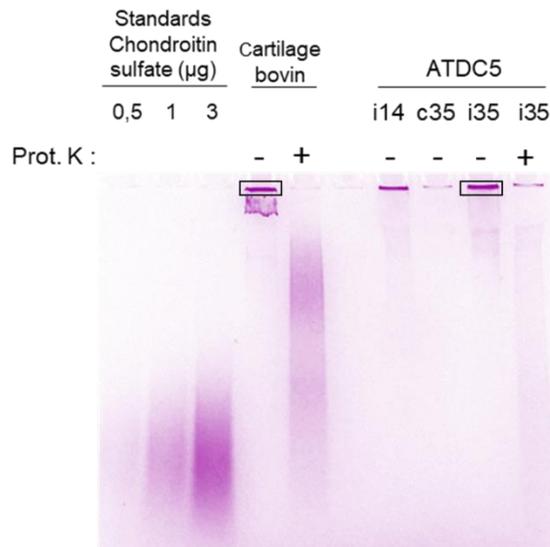


Figure 60 : Examen par SDS-PAGE couplé à une coloration au dMMB du contenu en PGs des extraits guanidine obtenus à partir de cellules iATDC5 aux jours 14 et 35. En comparaison ont été déposés des standards de chondroïtine sulfate, ainsi que des extraits guanidine préparés à partir de cartilage articulaire bovin comme contrôle positif, et de cellules cATDC5 au jour 35 comme contrôle négatif, avec ou sans traitement à la protéinase K. Les cadres noirs indiquent les bandes de gel qui ont été découpées et analysées par MS / MS.

Le DMMB ne révèle aucune coloration vis-à-vis des échantillons obtenus à partir des cellules cATDC5 (Figure 60), même aux temps les plus tardifs, alors que les échantillons iATDC5, dès J14, ainsi que les échantillons issus de cartilage articulaire bovin, présentent des PGs de très haut poids moléculaire (visible à la coloration rose intense des puits du gel). Une analyse par spectrométrie de masse a confirmé l'agrécan comme étant la protéine la plus abondante dans les extraits guanidine à la fois bovin et issus des cellules iATDC5 à J35 (données non présentées). Ces résultats sont en accord avec la notion selon laquelle l'agrécan est en grande partie glycosylé et sulfaté. Lorsque les mêmes échantillons sont examinés après le retrait du squelette protéique par digestion à la protéinase K, les motifs observés s'étalent sur presque toutes la piste, reflétant l'hétérogénéité des longueurs de chaînes de GAGs. Il y a, cependant en proportions, moins de chaînes de très haut poids moléculaire dans la MEC des iATDC5 que de chaînes de moyens à faible poids moléculaire, que dans le cartilage bovin. Néanmoins,

l'agrécane des cellules iATDC5 apparaît hautement glycosylé et sulfaté, de manière très similaire à l'échantillon *in vivo*, ce qui indique que les iATDC5 possèdent en grande partie la machinerie de modification et de glycosylation des PGs présente naturellement dans le cartilage.

#### 4.2.1.5. L'analyse des extraits CNBr révèle la composition de la MEC des iATDC5.

Jusqu'à J14, seuls les échantillons issus des cellules iATDC5 présentent un matériel insoluble et résistant à la guanidine, c'est-à-dire une MEC cross-linkée (voir Figure 70, §4.1.3.1.). La fraction CNBr pour les échantillons issus des cellules cATDC5 avant J14 n'existent donc pas, et ces cellules ne sont pas en mesure de cross-linker leur MEC. Par conséquent, les extraits CNBr aux premiers temps de l'expérimentation ne pouvaient pas être comparés entre les conditions avec ou sans insuline, et nous n'avons étudié la composition que des extraits CNBr issus des cellules iATDC5.

Les extraits CNBr issus des cellules iATDC5 sont presque uniquement composés de collagènes, à la seule exception significative de la fibronectine (FINC, Figure 61), une autre protéine fibrillaire essentielle à la formation d'une MEC cartilagineuse fonctionnelle [130].

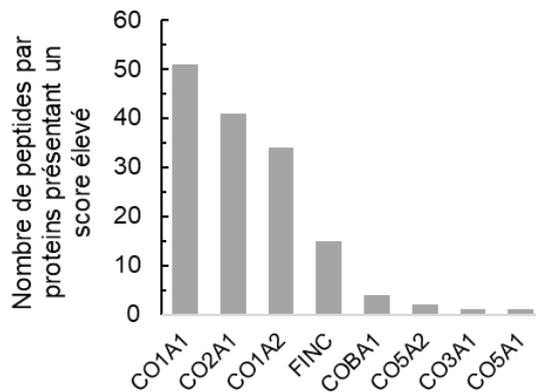


Figure 61 : Nombre de peptides identifiés (score mascotte > 35) pour les sept protéines les plus abondantes identifiées dans les extraits CNBr issus des cellules iATDC5 au jour 14. Les données de sortie correspondantes sont répertoriées dans les données supplémentaires S.4.

Les cellules iATDC5 sont très précocement capables d'intégrer des collagènes dans un réseau solidement cross-linké, tel qu'il est trouvé *in vivo*. Sur la base du nombre de peptides identifiés pour chacun d'entre eux, le collagène de type II (CO2A1) arrive en seconde position, précédé uniquement par le collagène de type I (CO1A1) et représentant environ 1/4 des collagènes

totaux. Étonnamment, le ratio entre les deux chaînes  $\alpha$  du collagène de type I, CO1A1 : CO1A2 qui est normalement de 2 :1, est ici d'environ 2:1,4. Cette légère différence peut être expliquée par les paramètres imposés au logiciel sur la sélection des peptides identifiés et régulés particulièrement stringente. En effet, le score d'identification Mascott a été volontairement vu à la hausse (< 35 pour cette analyse particulière, contre <15 pour une analyse classique).

À partir de J17, les cellules cATDC5 commencent à accumuler du matériel dans la fraction CNBr, ce qui nous a permis de les comparer aux cellules iATDC5 (voir §4.1.3.1 Figure 70).

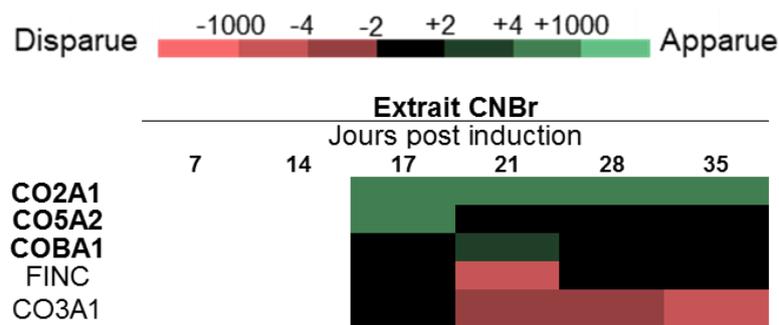


Figure 62 : Régulation en fonction du temps des protéines contenues dans les extraits CNBr issus des cellules iATDC5 par rapport aux cATDC5. Les différentes protéines sont hiérarchisées sous la forme d'une heat-map bidimensionnelle. Les abréviations de protéines sont conformes à la base de données Uniprot. La barre d'échelle indique un code de couleur allant du rouge (profondément régulée à la baisse) au vert (profondément régulée à la hausse). Des protéines « disparues » et « apparues » sont respectivement trouvées uniquement dans les extraits guanidine des cATDC5 ou iATDC5, respectivement. Le manque de données est indiqué par des cases blanches. Les données de sortie correspondantes sont répertoriées dans les données supplémentaires S. 5.

Dans cet extrait, comme dans les autres, le collagène de type II CO2A1 est considérablement régulé à tous les temps expérimentaux étudiés. Au contraire, le collagène de type III (CO3A1) est très fortement régulé à la baisse. D'autres régulations, bien que moins manifestes, sont mises en évidence de manière concomitante, notamment la régulation à la baisse de FINC et à la hausse des collagènes de type V (CO5A2) et XI (COBA1). Ces derniers sont décrits comme des collagènes minoritaires dans les fibrilles hétérotypiques de collagène de type I, et leur présence est cohérente avec l'idée que le collagène de type I est l'élément majoritaire des MEC des iATDC5 (Figure 61).

L'analyse plus fine des ratios de régulation du collagène de type II extrait dans la fraction CNBr au cours du temps (Figure 63) entre les cellules cATDC5 et iATDC5 montre que peu de temps

après l'ajout d'acide ascorbique, soit à J17, les deux types de cellules sont en mesure de l'intégrer à leur MEC cross-linkée. En revanche, les cellules cATDC5 n'en intègrent qu'une faible quantité, comme indiqué par le ratio protéique de plus de 50 entre les extraits issus des cellules iATDC5 comparées à leurs contrôles. Bien que progressivement moins important avec le temps, le ratio de régulation du collagène de type II dans la MEC cross-linkée reste toujours très élevé.

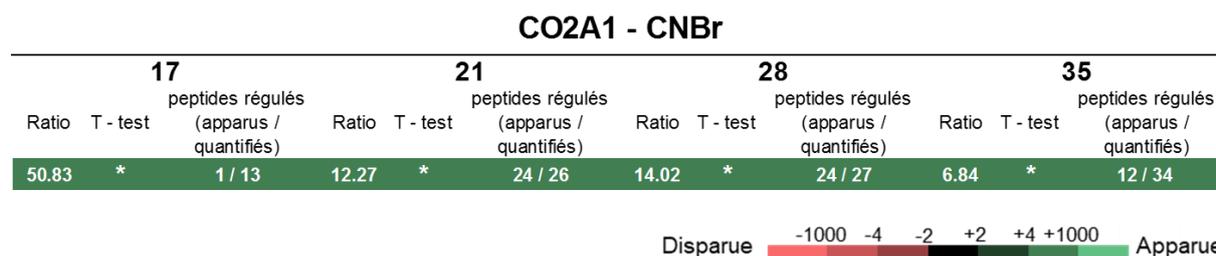


Figure 63 : Détails de la régulation en fonction du temps du collagène de type II intégré à la MEC cross-linkée des cellules iATDC5 par rapport aux cATDC5. J3 et J14 ne sont pas indiqués car les cellules cATDC5 ne sont pas en mesure d'intégrer une MEC à ces temps expérimentaux. La barre d'échelle indique un code de couleur allant du rouge (profondément régulée à la baisse) au vert (profondément régulée à la hausse). Une protéine « disparues » ou « apparues » est respectivement identifiée uniquement dans les fractions CNBr des cATDC5 ou iATDC5. Ici, tous les ratios de régulation quantifiables sont supérieurs à 4, le ton intermédiaire de vert correspond donc à la portion « +4 à +1000 » de la barre d'échelle. Les ratios et p-values indiqués sont les ratios médians et les p-values médianes des peptides quantifiés. (T-test \*: p-value < 0.05 ; \*\*: p-value < 0.01).

Une MEC cross-linkée riche en collagène de type II est ainsi la marque précoce des cellules iATDC5, ou tardive des cellules cATDC5.

#### 4.2.2. Caractérisation des modifications post-traductionnelles du collagène de type II produit par les cellules ATDC5

Dans la perspective d'une caractérisation approfondie du collagène de type II synthétisé par les cellules iATDC5, nous avons étudié ses modifications chimiques.

##### 4.2.2.1. Le clivage protéolytique du procollagène de type II est total dans les cellules iATDC5.

Le clivage protéolytique des procollagènes a été décrit comme étant une étape critique de la fibrillogenèse [384], du moins *in vitro*. Nous nous sommes alors demandé si les propeptides amino- et carboxy-terminaux du procollagène de type II étaient clivés puis sécrétés par les

cellules iATDC5, en réinterprétant les données de spectrométrie de masse du sécrétome de manière spécifique, c'est-à-dire par analyse uniquement des peptides issus des propeptides ou des régions de clivage.

Ainsi, les peptides identifiés démontrent sans équivoque le clivage des propeptides amino- et carboxy-terminaux aux sites conventionnels et aucun ne suggère que le précurseur sécrété ne soit que partiellement clivé. En effet, aucun peptide contenant l'un ou l'autre des sites de clivage complet n'est identifié. Par ailleurs, nos expériences de Western Blot utilisant un anticorps dirigé contre le C-propeptide du procollagène de type II ont révélé, dès J7 et jusqu'à J35, une seule espèce réactive correspondant au C-propeptide clivé (Figure 64).

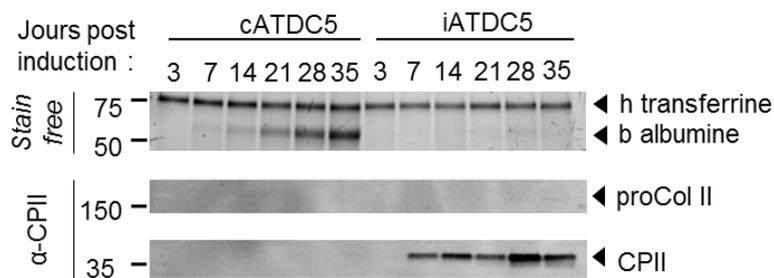


Figure 64 : La maturation C-terminale du procollagène de type II est totale dans les cellules iATDC5. Les sécrétomes ont été analysés par Western Blot avec un anticorps dirigé contre le CPII (propeptide carboxyterminal du procollagène de type II). proCol II: procollagen 2a1 non clivé ; CPII : propeptide clivé

Dans le même temps, les cellules cATDC5 ne semblent pas, quel que soit le temps expérimental étudié, en mesure de sécréter du procollagène de type II, sous sa forme précurseur ou maturée. En effet, le western blot ne révèle aucun signal correspondant soit au procollagène ayant conservé le C-propeptide, soit au C-propeptide lui-même, ce qui est consistant avec les analyses des sécrétomes par spectrométrie de masse, notamment entre les jours 7 et 14 auxquels aucun peptide du collagène de type II n'est détectable (Figure 65) dans ces cellules.

Cependant, l'analyse indique qu'aux jours 21 à 35 jours, soit après changement du milieu de culture et donc supplémentation en acide ascorbique, des peptides sont identifiés et quantifiés dans les cellules cATDC5, en accord avec son rôle décrit dans la chondrogenèse des ATDC5 [326,327]. En revanche ils restent peu nombreux, et les ratios de régulation de l'ordre de 20 ou 50 fois entre cATDC5 et iATDC5 suggèrent bien que leur quantité est minime, permettant d'expliquer l'absence totale de signal proCol II sur le western blot.

### CO2A1 - sécrétome

	7	14	21	28	35
Ratio T - test	peptides régulés (apparus / quantifiés)	Ratio T - test	peptides régulés (apparus / quantifiés)	Ratio T - test	peptides régulés (apparus / quantifiés)
	9 / 0	9 / 0	22,3 **	2 / 5	20,21 *
				2 / 6	55,75 **
					3 / 4

Disparue -1000 -4 -2 +2 +4 +1000 Apparue

Figure 65 : Détails de la régulation en fonction du temps du collagène de type II sécrété par les iATDC5 par rapport aux cATDC5. J3 n'est pas indiqué puisque CO2A1 est indétectable quelques soient les conditions à ce temps expérimental. La barre d'échelle indique un code de couleur allant du rouge (profondément régulée à la baisse) au vert (profondément régulée à la hausse). Une protéine « disparues » ou « apparues » est respectivement identifiée uniquement dans les sécrétomes des cATDC5 ou iATDC5. Les ratios et p-values indiqués sont les ratios médians et les p-values médianes des peptides quantifiés. (T-test \* : p-value < 0.05 ; \*\* : p-value < 0.01).

Prises ensemble, ces données indiquent que le collagène de type II synthétisé et sécrété par les cellules iATDC5 est entièrement mûré en termes de clivage protéolytique. Au contraire, les cellules cATDC5 ne sont pas en mesure de sécréter suffisamment de collagène de type II pour permettre l'étude de la maturation de son clivage, même après supplémentation en acide ascorbique.

#### 4.2.2.2. Chondrocalcine est intégrée à la MEC non cross-linkée dans les cellules iATDC5.

Hormis dans le surnageant des cellules iATDC5, la Chondrocalcine reste indétectable en western blot, quelle que soit la fraction, et quel que soit le temps. En revanche, l'analyse des données de spectrométrie de masse de l'extrait guanidine, contenant les protéines intégrées à la MEC de façon non-covalente révèle la présence de CPII dans les cellules iATDC5 uniquement, à partir du 17<sup>ème</sup> jour. Ainsi, 1 peptide du CPII apparait dans l'extrait guanidine des cellules induites à l'insuline à J17, 2 peptides à J21, 4 peptides à J28 et 3 peptides à J35 (Tableau 13 – lignes roses). Alors que l'extrait guanidine des cellules iATDC5 est déjà riche en protéines (Figure 57) et notamment en collagène de type II dès le 7<sup>ème</sup> jour (Tableau 13 – lignes blanches - Figure 58), la Chondrocalcine ne s'accumule dans la MEC non cross-linkée qu'à partir de J17, soit de manière concomitante avec le début de la minéralisation de la MEC. De manière intéressante, des peptides tryptiques correspondant au N-propeptide sont identifiés, mais jamais régulés dans l'extrait guanidine.

Il faut noter que le nombre de peptides identifiés par spectrométrie de masse est lié à l'abondance de la protéine dans l'extrait analysé. Ainsi, 8 peptides sont identifiés et régulés dans le temps pour l'ensemble de la triple hélice de collagène de type II, soit plus de 1000 acides aminés, alors que 6 sont identifiés et régulés pour la Chondrocalcine qui est presque 5 fois plus petite. Ainsi, le collagène de type II s'accumule dans la MEC des cellules iATDC5 dès J17, mais seule la Chondrocalcine – CPII est régulée en fonction de la phase de minéralisation.

*Tableau 13 : Peptides du collagène de type II murin régulés à la hausse dans l'extrait guanidine des cellules iATDC5 v. cATDC5. La position en acides aminés sur le précurseur est indiquée. La séquence de chaque peptide tient compte du premier acide aminé de part et d'autre de la digestion tryptique. Les flèches indiquent à quel jour (de 7 à 35) chaque peptide est concerné par une régulation à la hausse qualitative (présent dans les extraits issus des cellules iATDC5 mais cATDC5). Les ratios de régulations sont calculés lorsque c'est possible. Ratios significativement régulés uniquement : T-test ; p-value < 0.05. En bleu : peptides du N – propeptide. En blanc : peptides de la triple hélice. En rose : peptides de la Chondrocalcine – CPII.*

Positions	Séquence	7	14	17	21	28	35
119 – 133	R.GPPGPQGPAGEQGPR.G						
263 – 275	K.SGERGLPGPQGAR.G						
575 – 596	K.VGPSGAPGEDGRPGPPGPQGAR.G	↑		↑	↑	↑	
888 – 904	R.GAQGPPGATGFPGAAGR.V	↑	↑	↑	↑	↑	33,6
941 – 980	R.AGDPLQGPAGAPGEKGEPEGDDGPSGLDGPPGPQGLAQQR.G						↑
981 – 989	R.GIVGLPGQR.G	↑	8,4	↑	↑	17,6	
981 - 992	R.GIVGLPGQRGER.G	↑	↑	↑	↑	↑	↑
1085 - 1106	K.QGDRGEAGAQQPMGSPGAGAR.G	↑	↑	↑	↑	↑	
1107 - 1115	R.GIAGPQGPR.G	8,5			7,1	13,9	
1261 - 1276	K. SLNNQIESIRSPDGSR. K					↑	↑
1288 - 1294	K. LCHPEWK. S					↑	
1295 - 1312	K. SGDYWIDPNQGCTLDAMK. V						↑
1313 - 1333	K. VFCNMETGETCVYPNPATVPR. K				↑	↑	
1395 - 1409	K. NSIAYLDEAAGNLKK. A						↑
1410 - 1422	K. ALLIQGSNDVEMR. A			↑	↑	↑	

L'anticorps utilisé pour détecter la Chondrocalcine est dirigé contre la partie N-terminale de la protéine, et ne peut donc reconnaître que la forme longue issue du clivage par BMP-1 [49].

L'absence de détection de la Chondrocalcine en western blot dans l'extrait guanidine laisse à supposer que la forme intégrée à la MEC serait la forme courte. Ici encore, les données de spectrométrie de masse ne permettent pas de trancher, car le recouvrement de séquence est trop faible.

4.2.2.3. *Le  $\beta$ APN inhibe complètement la formation des cross-links au sein de la MEC, mais n'a aucun effet sur la minéralisation*

*In vivo*, la formation des cross-links des collagènes nécessite la déamination oxydative de résidus lysine et hydroxylysine spécifiques, médiée par les enzymes de la famille des LOX [129]. Les cellules iATDC5 ont ainsi été traitées pendant toute l'expérience avec du  $\beta$ -aminopropionitrile à 0,2 mM ( $\beta$ APN), qui inhibe de manière irréversible les enzymes de la famille des LOXs (Figure 66).

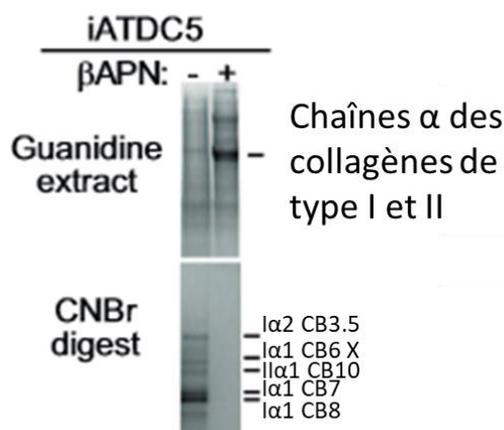


Figure 66 : Le  $\beta$ APN inhibe complètement les cross-links du collagène. La différenciation des cellules ATDC5 a été induite par l'insuline en présence (+) ou en absence (-) de  $\beta$ APN. Les cultures ont été analysées pour déterminer la production de MEC cross-linkée (panneau inférieur – extrait CNBr) et de MEC non cross-linkée (panneau supérieur – extrait guanidine) par SDS-PAGE couplée à une coloration de Coomassie. Les résultats présentés ici proviennent d'un répliquât obtenu à partir des cellules iATDC5 au 21<sup>ème</sup> jour, et sont représentatifs de l'expérience entière, réalisées à tous les temps expérimentaux. Une indication des tailles des fragments est donnée par l'annotation avec les principaux fragments générés par CNBr en fonction de la nomenclature classique. X indique que le fragment annoté est probablement cross-linké en raison de sa mobilité électrophorétique modifiée.

Contrairement aux cellules iATDC5 non traitées, l'ajout de  $\beta$ APN conduit à un déplacement pratiquement total des collagènes depuis l'extrait CNBr vers l'extrait guanidine, donc de la fraction contenant les protéines de la MEC cross-linkées à la fraction contenant les protéines de la MEC non cross-linkées, reflétant une inhibition puissante de la formation des cross-links par le  $\beta$ APN, et ce malgré son activité d'inhibition questionnable [385].

Par conséquent, dans le modèle ATDC5, et comme observé *in vivo* [172], la formation des cross-links entre les protéines de la MEC, et notamment des collagènes, dépend entièrement de l'activité LOX.

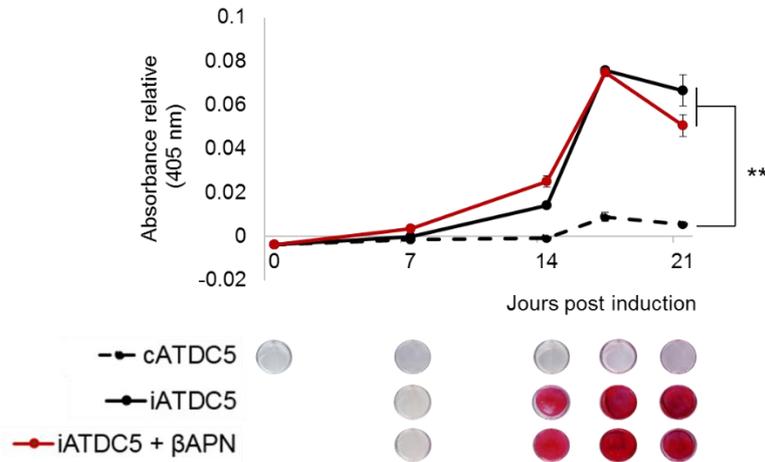


Figure 67 : L'inhibition de l'activité LOX par le  $\beta$ APN n'impacte pas la minéralisation. Des cellules ATDC5 ont été cultivées durant 21 jours en présence (iATDC5) ou en absence (cATDC5) d'insuline, et de  $\beta$ APN pour inhiber la formation des cross-links. Les cellules ont ensuite été fixées et colorées au rouge alizarine. Panel du haut : quantification relative de la coloration par mesure de l'absorbance. Panel du bas : photo d'un puit représentatif d'un triplicata biologique. T-test ; \*\* : p-value < 0.01. Pas de différence significative entre les points iATDC5 avec ou sans  $\beta$ APN à J21.

L'inhibition de l'activité LOX par le  $\beta$ APN ne semble pas avoir d'effet sur la minéralisation, comme l'indique la Figure 67. Ces résultats surprenants au regard de l'importance fondamentale de la formation des cross-links pour la minéralisation *in vivo* mettent ici en évidence un défaut majeur du modèle cellulaire ATDC5 : bien qu'il soit envisageable que le dépôt d'une MEC cartilagineuse dont l'un des composants est la Chondrocalcine soit suffisant dans ce modèle pour soutenir la minéralisation, elle ne semble pas être régulée de la même manière que ce qui est classiquement observé [89,386].

#### 4.2.2.4. Les cellules iATDC5 ne minéralisent pas en absence de $\beta$ GP, dans nos conditions d'expérimentation

Afin d'étudier dans quelle mesure les cellules iATDC5 reproduisent *in cellulo* la minéralisation observée lors de l'ossification endochondrale *in vivo*, nous avons étudié leur phénotype sur 42 jours en présence de ou en absence de  $\beta$ -Glycerophosphate ( $\beta$ GP), le substrat de minéralisation classiquement utilisé à 10 mM dont les cellules sont supplémentées à partir du jour 14, tout en les maintenant dans une atmosphère à 5%  $\text{CO}_2$ , selon les conditions optimisées par Newton et

al. [333]. Historiquement, les cellules ATDC5 ont été décrites comme ne nécessitant pas d'apport de facteur exogène pour leur minéralisation, tout en étant maintenues dans une atmosphère à 3% CO<sub>2</sub> [387].

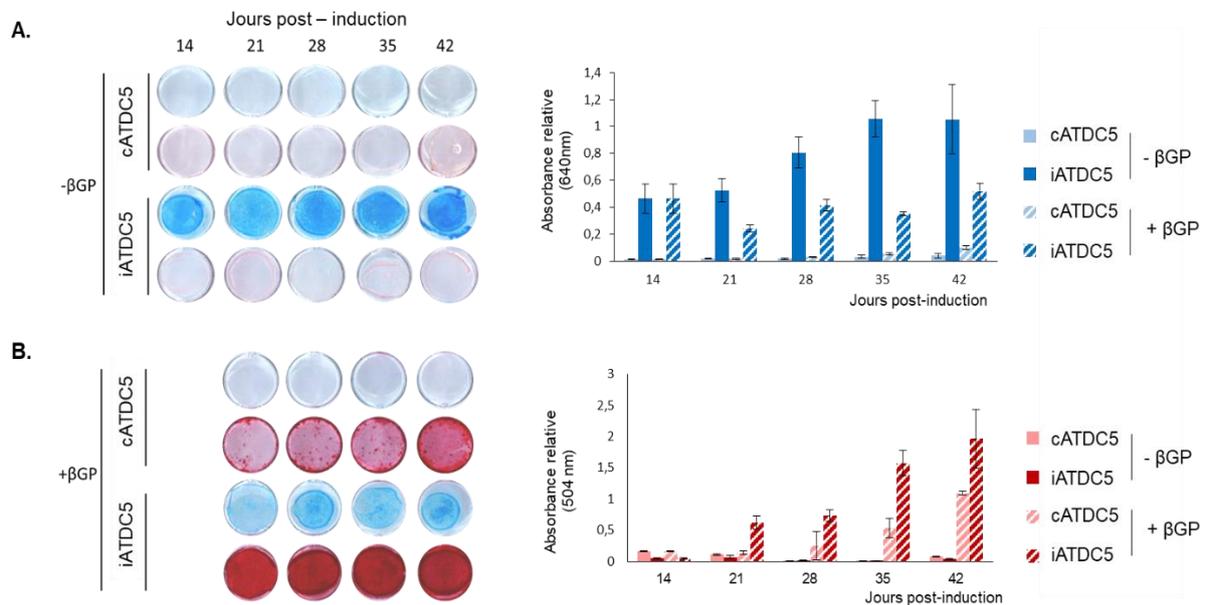


Figure 68 : Les cellules ATDC5 ne sont pas en mesure de produire une matrice extracellulaire minéralisée en l'absence βGP, et à 5% CO<sub>2</sub>. La différenciation chondrogénique des cellules ATDC5 a été induite (iATDC5) ou non (cATDC5) par l'insuline. Les cellules ATDC5 ont été cultivée en l'absence ou en présence de 10 mM βGP. A. Production de glycosaminoglycanes sulfatés étudié par coloration au bleu alcian et dosage spectrophotométrique. B. Minéralisation de la matrice extracellulaire étudiée par coloration au rouge alizarine et dosage spectrophotométrique. βGP : β-Glycerophosphate

Dans nos conditions d'expérimentations, soit à 5% CO<sub>2</sub>, l'absence de βGP ne permet pas la minéralisation des cellules ATDC5, même sur 42 jours. Ainsi, il est envisageable de remettre en question la qualité de la minéralisation observée dès J21 dans cette expérimentation et dans nos conditions, et son extrapolation à ce qui peut être observée *in vivo*. Par ailleurs, à 5% CO<sub>2</sub>, les cellules ATDC5 ne sont pas en mesure de minéraliser leur MEC.

En parallèle, nous avons montré que la minéralisation ne semble pas être dépendante de la formation de cross-links dans les cellules ATDC5. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que dans nos conditions d'expérimentation, la minéralisation induite par un facteur exogène puissant tel que le β-Glycerophosphate, qui doit par ailleurs être ajouté en quantité non – négligeable, ne reflète probablement pas un processus physiologique.

4.2.2.5. *Le profil des MPTs du collagène de type II dans le modèle ATDC5 est similaire à celui décrit in vivo.*

De manière remarquable, de nombreux peptides identifiés par spectrométrie de masse sont trouvés sous plusieurs états chimiques distincts. Cette découverte met en évidence l'hétérogénéité des combinaisons de MPTs portées par l'ensemble des molécules de collagène de type II, compte tenu des principales maturations auxquelles sont soumis les collagènes, à savoir l'hydroxylation des prolines et des lysines, la galactosylation et la glucosyl-galactosylation des lysines. Globalement et en combinant les résultats des sécrétomes et des extraits issus de la digestion au CNBr, le recouvrement de séquence du domaine en triple hélice est de 59%.

Les MPTs identifiées ont ensuite été comparées à celles trouvées *in vivo* (Figure 69), en prenant comme référence la cartographie la plus exhaustive des modifications du collagène de type II rapportée à ce jour, obtenue à partir d'extraits pepsiques de cartilage bovin [388]. La grande majorité des maturations identifiées dans nos expérimentations est cohérente avec celles rapportées *in vivo*, notamment en ce qui concerne les hydroxylations des prolines. Il est intéressant de constater que la Pro986 est identifiée comme toujours hydroxylée dans ce modèle, en accord avec les données de la littérature qui stipulent que cette position est toujours sujette à une 3-hydroxylation, notamment dans la chaîne  $\alpha 1(\text{II})$  chez les vertébrés [101].

Certaines glycosylations de lysines n'ont en revanche pas été identifiées dans nos analyses, notamment au niveau des lysines impliquées dans la formation de cross-links (K764, K848, K956). Il est fort probable que les peptides contenant ces lysines en particulier soient intégrés à la matrice aussitôt leur modification réalisée, ce qui implique qu'ils ne sont pas identifiés dans le sécrétome. Une fois intégrés à la matrice, et ce même après digestion au CNBr, les peptides restent impliqués dans la formation de ces cross-links extrêmement peu labiles, conduisant à la génération d'espèce particulières difficilement analysable avec l'appareillage dont nous disposons aujourd'hui.

Les cellules iATDC5 sont ainsi capables de produire en quantité du collagène de type II, qui semble porter toutes les maturations essentielles à sa fonction et qui ont précédemment été identifiées *in vivo*. Les clivages protéolytiques des propeptides carboxy et amino-terminaux, ainsi que les MPTs identifiées (hydroxylation abondante des prolines, hydroxylation, glucosylation, galactosyl-glucosylation et déamination oxydative des lysines) soulignent la force de ce modèle en tant que modèle de maturation du collagène de type II.

		ADAMTS↓										
iATDC5	140	GEK <b>G</b> AG <b>P</b> PRG	<i>RDG<b>E</b>PGT<b>P</b>GN</i>	<i>PG<b>P</b>AG<b>P</b>PG<b>P</b></i>	<i>G<b>P</b>PL<b>S</b>AG<b>N</b>F</i>	<i>AAQ<b>M</b>AG<b>G</b>Y<b>D</b>E</i>	KAGGAQ <b>M</b> GV <b>M</b>	Q <b>G</b> PM <b>G</b> MP <b>G</b> PR				
bovine	141	GEK <b>G</b> AG <b>P</b> PRG	RDG <b>E</b> PGT <b>P</b> GN	PG <b>P</b> PG <b>P</b> PG <b>P</b>	G <b>P</b> PL <b>G</b> _GN <b>F</b>	AAQ <b>M</b> AG <b>G</b> F <b>D</b> E	KAGGAQ <b>M</b> GV <b>M</b>	Q <b>G</b> PM <b>G</b> MP <b>G</b> PR				
iATDC5	210	G <b>P</b> PG <b>P</b> AG <b>A</b> PG	<i>PQ<b>G</b>FQ<b>G</b>NP<b>E</b></i>	<i>P<b>E</b>PG<b>V</b>SG<b>M</b></i>	<i>G<b>P</b>RG<b>P</b>PG<b>P</b>AG</i>	<i>K<b>P</b>DD<b>D</b>GE<b>A</b>GK</i>	<i>P<b>G</b>KS<b>G</b>ER<b>G</b>LP</i>	<i>GPQ<b>G</b>AR<b>G</b>FP<b>G</b></i>				
bovine	210	G <b>P</b> PG <b>P</b> AG <b>A</b> PG	PQ <b>G</b> FQ <b>G</b> NP <b>E</b>	P <b>E</b> PG <b>V</b> SG <b>M</b>	G <b>P</b> RG <b>P</b> PG <b>P</b> AG	K <b>P</b> DD <b>D</b> GE <b>A</b> GK	P <b>G</b> KS <b>G</b> ER <b>G</b> LP	GPQ <b>G</b> AR <b>G</b> FP <b>G</b>				
iATDC5	280	TP <b>L</b> PG <b>V</b> K <b>G</b> H	<i>RGY<b>P</b>GLD<b>G</b>AK</i>	<i>GEAG<b>A</b>PG<b>V</b>K<b>G</b></i>	<i>ESGS<b>P</b>GEN<b>S</b></i>	<i>PG<b>M</b>GP<b>R</b>GL<b>P</b></i>	<i>GER<b>G</b>RT<b>G</b>PA<b>G</b></i>	<i>AAG<b>A</b>R<b>G</b>ND<b>G</b>Q</i>				
bovine	280	TP <b>L</b> PG <b>V</b> K <b>G</b> H	RGY <b>P</b> GLD <b>G</b> AK	GEAG <b>A</b> PG <b>V</b> K <b>G</b>	ESGS <b>P</b> GEN <b>S</b>	PG <b>M</b> GP <b>R</b> GL <b>P</b>	GER <b>G</b> RT <b>G</b> PA <b>G</b>	AAG <b>A</b> R <b>G</b> ND <b>G</b> Q				
iATDC5	350	PG <b>P</b> AG <b>P</b> PG <b>P</b> V	<i>GPAG<b>G</b>PG<b>F</b>PG</i>	<i>AP<b>G</b>AK<b>G</b>E<b>A</b>GP</i>	<i>TGARG<b>P</b>E<b>G</b>AQ</i>	<i>GSR<b>G</b>E<b>P</b>GN<b>P</b></i>	<i>SP<b>G</b>PA<b>G</b>AS<b>N</b></i>	<i>PGT<b>D</b>GI<b>P</b>GA<b>K</b></i>				
bovine	350	PG <b>P</b> AG <b>P</b> PG <b>P</b> V	GPAG <b>G</b> PG <b>F</b> PG	AP <b>G</b> AK <b>G</b> E <b>A</b> GP	TGARG <b>P</b> E <b>G</b> AQ	GSR <b>G</b> E <b>P</b> GN <b>P</b>	SP <b>G</b> PA <b>G</b> AS <b>N</b>	PGT <b>D</b> GI <b>P</b> GA <b>K</b>				
iATDC5	420	GSAG <b>A</b> PG <b>I</b> AG	<i>AP<b>G</b>F<b>P</b>GR<b>P</b></i>	<i>PG<b>P</b>Q<b>G</b>AT<b>G</b>PL</i>	<i>G<b>P</b>KQ<b>A</b>GE<b>P</b></i>	<i>IAG<b>F</b>K<b>D</b>Q<b>G</b>P</i>	<i>K<b>E</b>T<b>G</b>PA<b>G</b>PQ</i>	<i>GAP<b>G</b>PA<b>E</b>EE<b>G</b></i>				
bovine	420	GSAG <b>A</b> PG <b>I</b> AG	AP <b>G</b> F <b>P</b> GR <b>P</b>	PG <b>P</b> Q <b>G</b> AT <b>G</b> PL	G <b>P</b> KQ <b>T</b> GE <b>P</b>	IAG <b>F</b> K <b>E</b> Q <b>G</b> P	K <b>E</b> P <b>G</b> PA <b>G</b> PQ	GAP <b>G</b> PA <b>E</b> EE <b>G</b>				
iATDC5	490	KRGAR <b>G</b> EP <b>G</b>	<i>AG<b>P</b>IG<b>P</b>ER</i>	<i>GAP<b>G</b>NR<b>G</b>FP<b>G</b></i>	<i>QDGLAG<b>P</b>K<b>G</b>A</i>	<i>P<b>E</b>RG<b>P</b>SG<b>L</b>T</i>	<i>GP<b>K</b>ANG<b>D</b>PG</i>	<i>RP<b>E</b>P<b>L</b>PA<b>G</b>A</i>				
bovine	490	KRGAR <b>G</b> EP <b>G</b>	AG <b>P</b> AG <b>P</b> ER	GAP <b>G</b> NR <b>G</b> FP <b>G</b>	QDGLAG <b>P</b> K <b>G</b> A	P <b>E</b> RG <b>P</b> SG <b>L</b> A	GP <b>K</b> ANG <b>D</b> PG	RP <b>E</b> P <b>L</b> PA <b>G</b> A				
iATDC5	560	RGLTGR <b>P</b> GD <b>A</b>	<i>GPQ<b>K</b>V<b>G</b>PS<b>G</b></i>	<i>AP<b>G</b>ED<b>G</b>R<b>P</b></i>	<i>PG<b>P</b>Q<b>G</b>AR<b>G</b>Q<b>P</b></i>	<i>G<b>V</b>M<b>G</b>F<b>P</b>GP<b>K</b></i>	<i>AN<b>G</b>E<b>P</b>GA<b>E</b></i>	<i>K<b>G</b>L<b>A</b>GP<b>L</b>R</i>				
bovine	560	RGLTGR <b>P</b> GD <b>A</b>	GPQ <b>K</b> V <b>G</b> PS <b>G</b>	AP <b>G</b> ED <b>G</b> R <b>P</b>	PG <b>P</b> Q <b>G</b> AR <b>G</b> Q <b>P</b>	G <b>V</b> M <b>G</b> F <b>P</b> GP <b>K</b>	AN <b>G</b> E <b>P</b> GA <b>E</b>	K <b>G</b> L <b>A</b> GP <b>L</b> R				
iATDC5	630	GL <b>P</b> PK <b>D</b> GET <b>G</b>	<i>AAG<b>P</b>PG<b>P</b>SG<b>P</b></i>	<i>AGER<b>G</b>E<b>Q</b>Q<b>A</b>P</i>	<i>GP<b>S</b>GF<b>Q</b>GL<b>P</b></i>	<i>P<b>P</b>GP<b>P</b>EG<b>G</b>K</i>	<i>Q<b>G</b>D<b>Q</b>GI<b>P</b>GE<b>A</b></i>	<i>GAP<b>G</b>LV<b>G</b>PR<b>G</b></i>				
bovine	630	GL <b>P</b> PK <b>D</b> GET <b>G</b>	AAG <b>P</b> PG <b>P</b> SG <b>P</b>	AGER <b>G</b> E <b>Q</b> Q <b>A</b> P	GP <b>S</b> GF <b>Q</b> GL <b>P</b>	P <b>P</b> GP <b>P</b> EG <b>G</b> K	Q <b>G</b> D <b>Q</b> GI <b>P</b> GE <b>A</b>	GAP <b>G</b> LV <b>G</b> PR <b>G</b>				
iATDC5	700	ER <b>G</b> FP <b>G</b> ER <b>G</b> S	<i>PG<b>A</b>Q<b>G</b>L<b>Q</b>G<b>R</b></i>	<i>GL<b>P</b>GT<b>P</b>GT<b>D</b>G</i>	<i>PK<b>G</b>AA<b>G</b>PD<b>G</b>P</i>	<i>PG<b>A</b>Q<b>G</b>PP<b>G</b>L<b>Q</b></i>	<i>GM<b>P</b>GER<b>G</b>AA<b>G</b></i>	<i>IAG<b>P</b>K<b>D</b>RG<b>D</b></i>				
bovine	700	ER <b>G</b> FP <b>G</b> ER <b>G</b> S	PG <b>S</b> Q <b>G</b> L <b>Q</b> G <b>A</b> R	GL <b>P</b> GT <b>P</b> GT <b>D</b> G	PK <b>G</b> AA <b>G</b> PA <b>G</b> P	PG <b>A</b> Q <b>G</b> PP <b>G</b> L <b>Q</b>	GM <b>P</b> GER <b>G</b> AA <b>G</b>	IAG <b>P</b> K <b>D</b> RG <b>D</b>				
iATDC5	770	V <b>E</b> K <b>G</b> PE <b>G</b> AG <b>P</b>	<i>GKD<b>G</b>GR<b>G</b>LT<b>G</b></i>	<i>PI<b>G</b>PP<b>G</b>PA<b>G</b>A</i>	<i>NG<b>E</b>K<b>G</b>EV<b>G</b>PP</i>	<i>GP<b>S</b>ST<b>G</b>AR<b>G</b></i>	<i>AP<b>E</b>RG<b>E</b>T<b>G</b>P</i>	<i>PG<b>P</b>AG<b>F</b>AG<b>P</b>P</i>				
bovine	770	V <b>E</b> K <b>G</b> PE <b>G</b> AG <b>P</b>	GKD <b>G</b> GR <b>G</b> LT <b>G</b>	PI <b>G</b> PP <b>G</b> PA <b>G</b> A	NG <b>E</b> K <b>G</b> EV <b>G</b> PP	GP <b>S</b> TA <b>G</b> AR <b>G</b>	AP <b>E</b> RG <b>E</b> T <b>G</b> P	PG <b>P</b> AG <b>F</b> AG <b>P</b> P				
iATDC5	840	GAD <b>G</b> Q <b>P</b> GA <b>K</b> G	<i>DQ<b>G</b>EAG<b>Q</b>K<b>G</b>D</i>	<i>AG<b>A</b>PG<b>P</b>Q<b>G</b>PS</i>	<i>GAP<b>P</b>Q<b>G</b>PT<b>G</b></i>	<i>VT<b>G</b>PK<b>G</b>AR<b>G</b>A</i>	<i>QG<b>P</b>PA<b>T</b>GF<b>P</b></i>	<i>GAAG<b>R</b>V<b>G</b>PP<b>G</b></i>				
bovine	840	GAD <b>G</b> Q <b>P</b> GA <b>K</b> G	EQ <b>G</b> EAG <b>Q</b> K <b>G</b> D	AG <b>A</b> PG <b>P</b> Q <b>G</b> PS	GAP <b>P</b> Q <b>G</b> PT <b>G</b>	VT <b>G</b> PK <b>G</b> AR <b>G</b> A	QG <b>P</b> PA <b>T</b> GF <b>P</b>	GAAG <b>R</b> V <b>G</b> PP <b>G</b>				
iATDC5	910	ANG <b>N</b> P <b>G</b> PAG <b>P</b>	<i>PG<b>P</b>AG<b>K</b>D<b>G</b>FP</i>	<i>G<b>V</b>R<b>G</b>DS<b>G</b>PP<b>G</b></i>	<i>RAG<b>D</b>P<b>L</b>Q<b>G</b>P</i>	<i>AG<b>A</b>P<b>E</b>K<b>G</b>E<b>P</b></i>	<i>GDD<b>G</b>PS<b>G</b>LD<b>G</b></i>	<i>PP<b>G</b>Q<b>L</b>AG<b>Q</b></i>				
bovine	910	SNG <b>N</b> P <b>G</b> PP <b>G</b>	PG <b>S</b> SK <b>D</b> GF <b>K</b>	GAR <b>G</b> DS <b>G</b> PP <b>G</b>	RAG <b>D</b> P <b>L</b> Q <b>G</b> P	AG <b>P</b> P <b>E</b> K <b>G</b> E <b>P</b>	GDD <b>G</b> PS <b>G</b> PD <b>G</b>	PP <b>G</b> Q <b>L</b> AG <b>Q</b>				
iATDC5	980	RG <b>I</b> V <b>L</b> PG <b>Q</b> R	<i>GER<b>G</b>FP<b>G</b>LP<b>G</b></i>	<i>PS<b>G</b>EP<b>G</b>K<b>Q</b>GA</i>	<i>PG<b>S</b>AG<b>D</b>RG<b>P</b>P</i>	<i>GP<b>V</b>GP<b>P</b>GL<b>T</b>G</i>	<i>PA<b>E</b>PG<b>R</b>EG<b>S</b></i>	<i>PG<b>A</b>D<b>G</b>PP<b>G</b>RD</i>				
bovine	980	RG <b>I</b> V <b>L</b> PG <b>Q</b> R	GER <b>G</b> FP <b>G</b> LP <b>G</b>	PS <b>G</b> EP <b>G</b> K <b>Q</b> GA	PG <b>S</b> AG <b>D</b> RG <b>P</b> P	GP <b>V</b> GP <b>P</b> GL <b>T</b> G	PA <b>E</b> PG <b>R</b> EG <b>S</b>	PG <b>A</b> D <b>G</b> PP <b>G</b> RD				
iATDC5	1050	GAAG <b>V</b> K <b>G</b> DR <b>G</b>	<i>ET<b>G</b>AL<b>G</b>AP<b>G</b>A</i>	<i>PG<b>P</b>PG<b>S</b>PG<b>P</b>A</i>	<i>G<b>P</b>T<b>G</b>K<b>Q</b>GD<b>R</b>G</i>	<i>EAG<b>A</b>Q<b>G</b>PM<b>G</b>P</i>	<i>SG<b>P</b>AG<b>A</b>R<b>G</b>IA</i>	<i>GPQ<b>G</b>PR<b>G</b>DK<b>G</b></i>				
bovine	1050	GAAG <b>V</b> K <b>G</b> DR <b>G</b>	ET <b>G</b> AV <b>G</b> AP <b>G</b> A	PG <b>P</b> PG <b>S</b> PG <b>P</b> A	GP <b>I</b> G <b>K</b> Q <b>G</b> DR <b>G</b>	EAG <b>A</b> Q <b>G</b> PM <b>G</b> P	AG <b>P</b> AG <b>A</b> R <b>G</b> MP	GPQ <b>G</b> PR <b>G</b> DK <b>G</b>				
iATDC5	1120	ES <b>G</b> EQ <b>G</b> ER <b>L</b>	<i>K<b>G</b>HR<b>G</b>FT<b>G</b>L<b>Q</b></i>	<i>GL<b>P</b>PG<b>P</b>PG<b>S</b>G</i>	<i>DQ<b>G</b>AS<b>G</b>PA<b>G</b>P</i>	<i>SG<b>P</b>RG<b>P</b>PG<b>P</b>V</i>	<i>GP<b>S</b>G<b>K</b>D<b>G</b>SN<b>G</b></i>	<i>IP<b>G</b>PI<b>G</b>PP<b>G</b>P</i>				
bovine	1120	ET <b>G</b> EAG <b>E</b> R <b>L</b>	K <b>G</b> HR <b>G</b> FT <b>G</b> L <b>Q</b>	GL <b>P</b> PG <b>P</b> PG <b>S</b> G	DQ <b>G</b> AS <b>G</b> PA <b>G</b> P	SG <b>P</b> RG <b>P</b> PG <b>P</b> V	GP <b>S</b> G <b>K</b> D <b>G</b> AN <b>G</b>	IP <b>G</b> PI <b>G</b> PP <b>G</b> P				
iATDC5	1190	RGR <b>S</b> ET <b>G</b> PV	<i>G<b>P</b>PG<b>S</b>PG<b>P</b>P</i>	<i>PP<b>G</b>PP<b>G</b>PG<b>I</b>D</i>	<i>MS<b>A</b>F<b>A</b>GL<b>G</b>Q<b>R</b></i>	<i>E<b>K</b>GP<b>D</b>PM<b>Q</b>Y<b>M</b></i>	<i>RA<b>D</b>E<b>A</b>D<b>S</b>T<b>L</b>R</i>	<i>Q<b>H</b>D<b>V</b>E<b>V</b>D<b>A</b>T<b>L</b>K</i>				
bovine	1190	RGR <b>S</b> ET <b>G</b> PA	G <b>P</b> PG <b>N</b> PG <b>P</b> P	PP <b>G</b> PP <b>G</b> PG <b>I</b> D	MS <b>A</b> F <b>A</b> GL <b>G</b> Q <b>R</b>	E <b>K</b> GP <b>D</b> PL <b>Q</b> Y <b>M</b>	RA <b>D</b> E <b>A</b> AG <b>N</b> L <b>R</b>	Q <b>H</b> D <b>A</b> E <b>V</b> D <b>A</b> T <b>L</b> K				

Figure 69 : Modifications post-traductionnelles du collagène de type II synthétisé par les cellules iATDC5. Les résidus sont numérotés en fonction de leur position dans le précurseur de CO2A1 d'origine murine et bovine tels qu'annotés dans la base de données UniprotKB. Les MPT annotées ici pour la protéine bovine se réfèrent à la littérature [38] et servent de comparaison à celles trouvées dans nos expérimentations pour les cellules iATDC5. Les résidus annotés en gris correspondent à des peptides non identifiés. Les résidus annotés en italique correspondent à des peptides qui ont été identifiés uniquement à partir d'une analyse de sécrétome, les autres proviennent des extraits CNBr. Les résidus en gras ont été trouvés hydroxylés et ceux soulignés ont été trouvés sous les deux formes (hydroxylés ou non). Les cercles jaunes indiquent une galactosylation de la lysine et les cercles bleus, une glucosylation supplémentaire. Les flèches indiquent les sites théoriques de clivage protéolytique par ADAMTS et BMP1 [36], respectivement. Ces deux clivages ont été confirmés par l'analyse du sécrétome dans la présente étude. Les positions de résidus modifiés indiquées ici sont celles qui correspondent aux

peptides ayant les meilleurs scores Mascot selon la fragmentation MSMS. De nombreux peptides ont été identifiés sous plusieurs versions différant par le nombre de MPT. Dans certains cas, la position exacte du résidu incriminé ne pouvait pas être certifiée. La localisation de la modification est dans ces cas, celle qui est considérée comme la plus probable à une position trouvée par rapport à d'autres versions du même peptide. Les doubles flèches indiquent une situation dans laquelle la localisation exacte de la MPT ne peut pas être discriminée. Les données de sortie correspondantes sont répertoriées dans les données supplémentaires S.6 et les données supplémentaires S.7.

En outre, la présence d'au moins un des deux collagènes minoritaires des hétérofibrilles de collagène (COBA1) dans la fraction CNBr suggère l'assemblage d'un réseau lui aussi conforme aux données in vivo.

#### 4.2.3. Régulation de l'assemblage des collagènes dans la MEC des cellules iATDC5

Après l'étude exhaustive des modifications du collagène de type II, nous avons tenté de déterminer quel mécanisme régulait l'intégration des collagènes à la MEC. Nous nous sommes pour cela penchés sur le cas du collagène de type I. Ce choix s'explique premièrement par le fait que le collagène de type I reste la protéine la plus abondante dans les MECs des cellules iATDC5 et de leurs contrôles, cela nous permettant notamment des études quantitatives. Par ailleurs, étant sécrété dès J3, cela nous permettait une étude des mécanismes précocement mis en place lors de la chondrogenèse des cellules ATDC5.

##### 4.2.3.1. La synthèse du collagène de type I est régulée à de multiples niveaux dans les cellules ATDC5

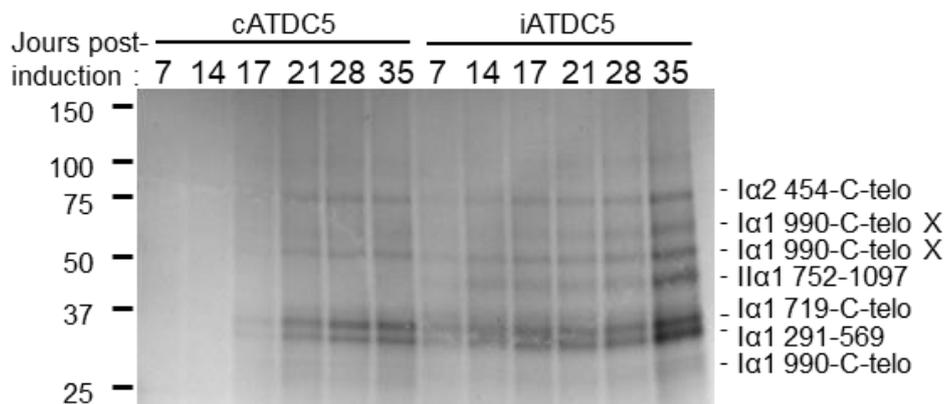


Figure 70 : Examen de la teneur en protéines de l'extrait CNBr par SDS-PAGE couplé à une coloration de Coomassie. La majorité des bandes intenses observées dans la dernière piste sont annotées avec les principaux fragments générés par CNBr identifiés lors de la recherche de leur contenu par empreinte trypsique. Les chiffres indiquent les limites des fragments se référant aux positions de méthionine sur le précurseur, plutôt qu'à la nomenclature classique des fragments générés par clivage au CNBr, en raison du peu de méthionines non conservées entre l'Homme et la souris. X indique que le fragment annoté est probablement cross-linké en raison de sa mobilité électrophorétique modifiée.

Les cellules cATDC5 n'assemblent pratiquement pas de collagènes cross-linkés jusqu'à J17, comme le montrent les extraits CNBr sur SDS-PAGE (Figure 70), tandis que les cellules iATDC5 sont capable d'accumuler une matrice dès J7.

En outre, nous avons montré par analyse par spectrométrie de masse des extraits CNBr que le collagène de type I en est le principal composant. Ainsi, les cellules iATDC5 intègrent le collagène de type I dans leur MEC (entre autres protéines) au cours des 14 premiers jours de culture, contrairement aux cATDC5. De manière frappante, lorsqu'il est examiné au niveau de l'ARNm (Figure 71), COL1A1 décroît continuellement de J3 à J21 dans les cATDC5 et encore plus fortement dans les iATDC5, en contraste total avec le dépôt de collagène de type I dans la MEC.

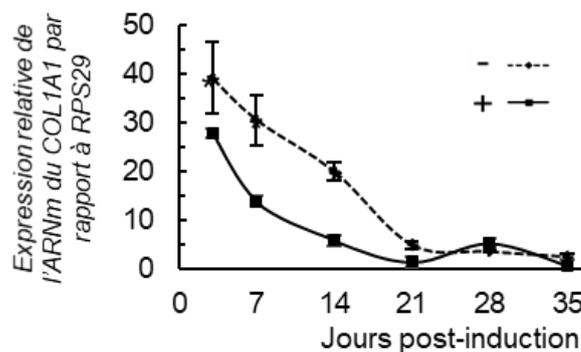


Figure 71 : Expression de l'ARNm du collagène de type I (COL1A1) au cours de la différenciation chondrogénique des cellules iATDC5 et cATDC5. + : iATDC5 ; - : cATDC5.

Nous avons par la suite étudié la néosynthèse du collagène de type I, qui, selon l'analyse globale des sécrétomes, n'est pas régulée de manière significative dans les cellules iATDC5 v. cATDC5 (données supplémentaires S. 2). Cependant, lorsque les mêmes données sont réanalysées pour la recherche d'événements de maturation tels que les clivages protéolytiques, il s'avère que le clivage du N-propeptide de CO1A1 et CO1A2 est très fortement régulé à la hausse dans les cellules en différenciation (Figure 72), tandis que le clivage des C-propeptides n'a été trouvé que modestement (et de manière non-significative) régulé à la hausse.

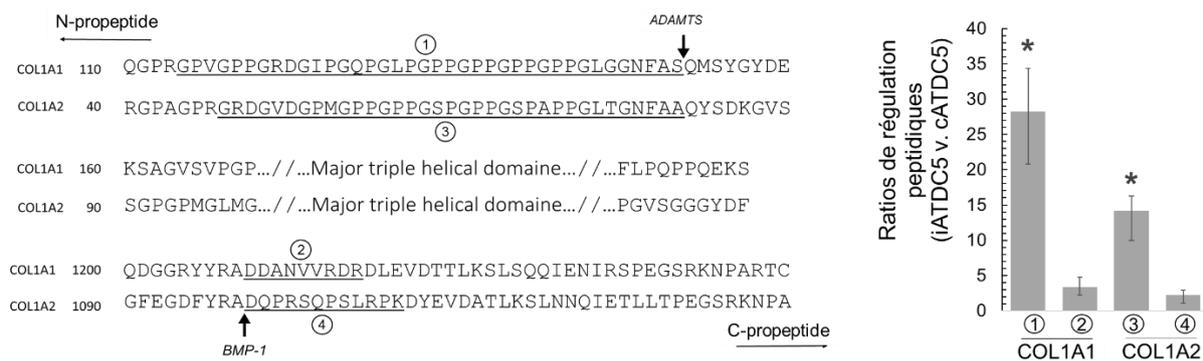


Figure 72 : Séquence primaire de régions sélectionnées des chaînes CO1A1 et CO1A2, montrant les peptides identifiés par spectrométrie de masse dans le sécrétome (soulignés et numérotés de 1 à 4) aux niveaux des sites de clivage N-terminal et C-terminal (panneau de gauche). Les ratios de régulation peptidique en condition iATDC5 v. cATDC5 ont été quantifiés (panneau de droite) à J14.

Une analyse par Western blot des sécrétomes à l'aide d'un anticorps dirigé contre le C-propeptide de CO1A1 (Figure 73) a révélé trois espèces différentes, nous permettant d'étudier le clivage des propeptides du collagène de type I : le C-propeptide clivé (CPI), ainsi que deux bandes de poids moléculaire élevé à environ 150 kDa, correspondant respectivement au procollagène complet non mûré (pro  $\alpha$  I) et au procollagène uniquement clivé à son extrémité N-terminale et conservant par conséquent l'extrémité C-terminale (pC  $\alpha$  I).

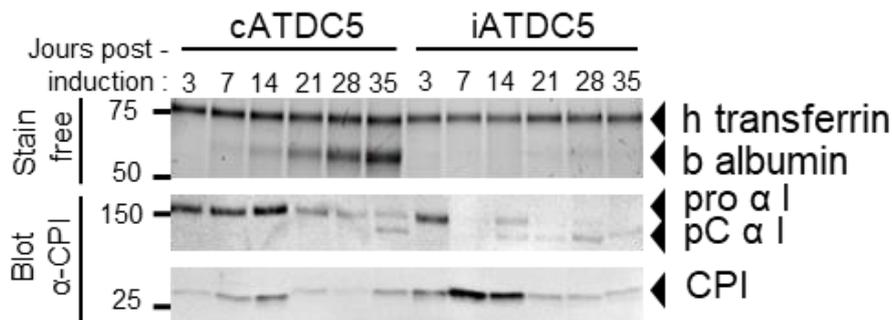


Figure 73 : Analyse de la maturation du procollagène de type I par analyse par western blot des sécrétomes avec un anticorps dirigé contre son C-propeptide. pro  $\alpha$  I: procollagène de type I ; pC  $\alpha$  I: procollagène de type I clivé au niveau du N-propeptide uniquement, conservant son extrémité C-terminale ; CPI : C-propeptide clivé

De manière consistante avec le faible niveau d'expression de l'ARNm de CO1A1 observé tardivement, peu de signal est détectable après J14, quel que soit le poids moléculaire et l'espèce

étudiée, montrant que le niveau d'ARNm de COL1A1 dans les cellules cATDC5 et iATDC5 est limitant dans la néosynthèse de collagène de type I au-delà de J14.

Le C-propeptide clivé est mis en évidence à la fois dans les cellules cATDC5 et iATDC5 tout au long de l'expérimentation mais essentiellement précocement au cours des 14 premiers jours, et de manière beaucoup moins prononcée dans les cATDC5. En effet, sur le pool total d'espèce détectée au cours des 14 premiers jours, l'essentiel du signal correspond à du procollagène non clivé (pro  $\alpha$  I) dans les cellules cATDC5, au contraire des cellules iATDC5 qui sécrètent essentiellement du CPI clivé. D'autre part, bien que cet intermédiaire de synthèse soit difficilement détectable, le procollagène clivé uniquement au niveau du N-propeptide est mis en évidence dans les cellules cATDC5 uniquement à J35 et dans les cellules iATDC5 dès J14 et jusqu'à la fin de l'expérimentation.

Prises ensemble ces données montrent que le clivage protéolytique du procollagène est plus efficace dans les cellules iATDC5 durant la première partie de la différenciation, en particulier en ce qui concerne le N-propeptide.

#### 4.2.3.2. *L'accumulation de collagènes dans les cellules ATDC5 dépend en premier lieu de l'hydroxylation de la triple hélice.*

Afin de pousser plus loin la caractérisation des maturations du collagène de type I, nous avons également étudié ses MPTs à partir de données de sécrétomes. La Figure 74 met en évidence les résultats obtenus pour un peptide représentatif de l'ensemble de la triple hélice, sachant qu'aucun contre-exemple n'a été identifié.

Ce peptide comporte jusqu'à un maximum de 5 hydroxylations (concernant indifféremment les lysines ou les prolines). De manière tout à fait impressionnante, dès J3, la version non modifiée de ce peptide est détectable dans les deux groupes (Figure 74, panel de gauche), mais largement et de manière significative diminuée dans les cellules iATDC5, tandis que 3 autres versions du même peptide, portant respectivement 2, 4 ou 5 hydroxylations, sont détectées uniquement dans les cellules iATDC5. A J14, le profil d'hydroxylations produit par les cellules iATDC5 est encore plus prononcé. En effet, la version sans aucune hydroxylation n'est plus détectée dans les cellules iATDC5 et celle avec une seule hydroxylation est régulée à la baisse par rapport aux cellules cATDC5, alors que dans le même temps, la version à quatre hydroxylations est régulée à la hausse, et celle à cinq hydroxylations reste indétectable dans les cellules cATDC5.

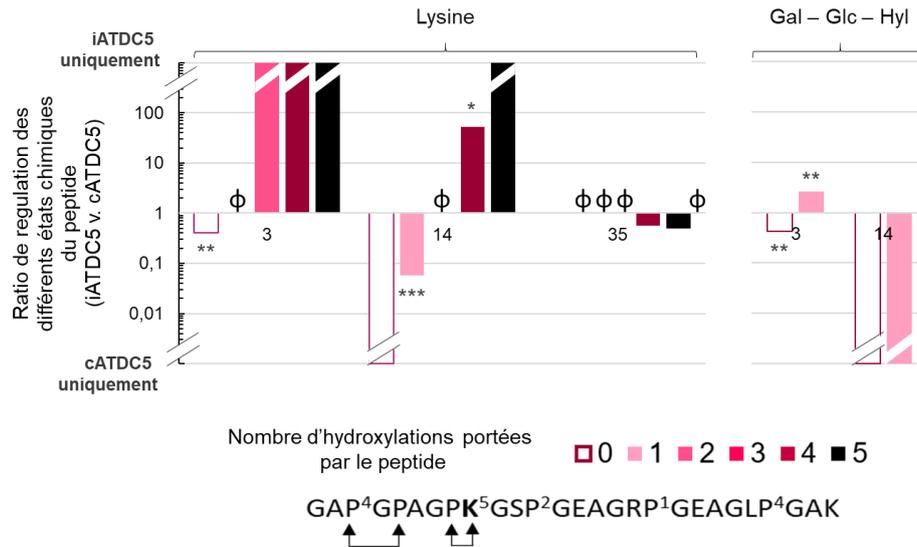


Figure 74 : Régulation de l'hydroxylation de la triple du collagène de type I dans les cellules iATDC5 comparées à leurs contrôles. Régulation des différents états chimiques d'un peptide représentatif de l'entièreté de la triple hélice, à la position 501 à 527 sur le précurseur. Les barres indiquent les ratios moyens +CV (coefficient de variation) sur le groupe iATDC5 et -CV sur le groupe cATDC5. Les astérisques indiquent une différence statistiquement significative (test t \*: valeur  $p < 0,05$  ; \*\*: valeur  $p < 0,01$  ; \*\*\*: valeur  $p < 0,001$ ).  $\Phi$  : indétectable dans les deux groupes. Les numéros dans la séquence peptidique indiquent les positions auxquelles des hydroxylations sont mises en évidence dans des versions distinctes du peptide, avec n le nombre minimal d'hydroxylations portée par le résidu correspondant dans les différentes versions du peptide. Les doubles flèches indiquent des situations dans lesquelles la position exacte de l'hydroxylation n'a pas pu être déterminée avec exactitude sur la base de la fragmentation MS / MS, mais semble plus probable à la position indiquée en fonction de sa position Y dans le triplet GXY. Les données de sortie correspondantes sont répertoriées dans les données supplémentaires S.7.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'ensemble des peptides identifiés et trouvés significativement régulés sur la triple hélice, et sur les deux chaînes sans aucun contre-exemple, mettant en évidence une régulation à la hausse robuste et progressive des hydroxylations de la triple hélice dans les cellules iATDC5 (les données brutes correspondantes sont répertoriées dans les données supplémentaires S.7). Les résultats pour l'ensemble des peptides des chaînes 1 $\alpha$ (I) et 1 $\alpha$ (II) pour le quatorzième jour est montré en Figure 75. Ainsi, durant les quatorze premiers jours de culture, les cellules en différenciation iATDC5 sont en mesure d'hydroxyler fortement le collagène de type I, au contraire des cellules contrôle cATDC5 pour lesquelles cette capacité reste très limitée.

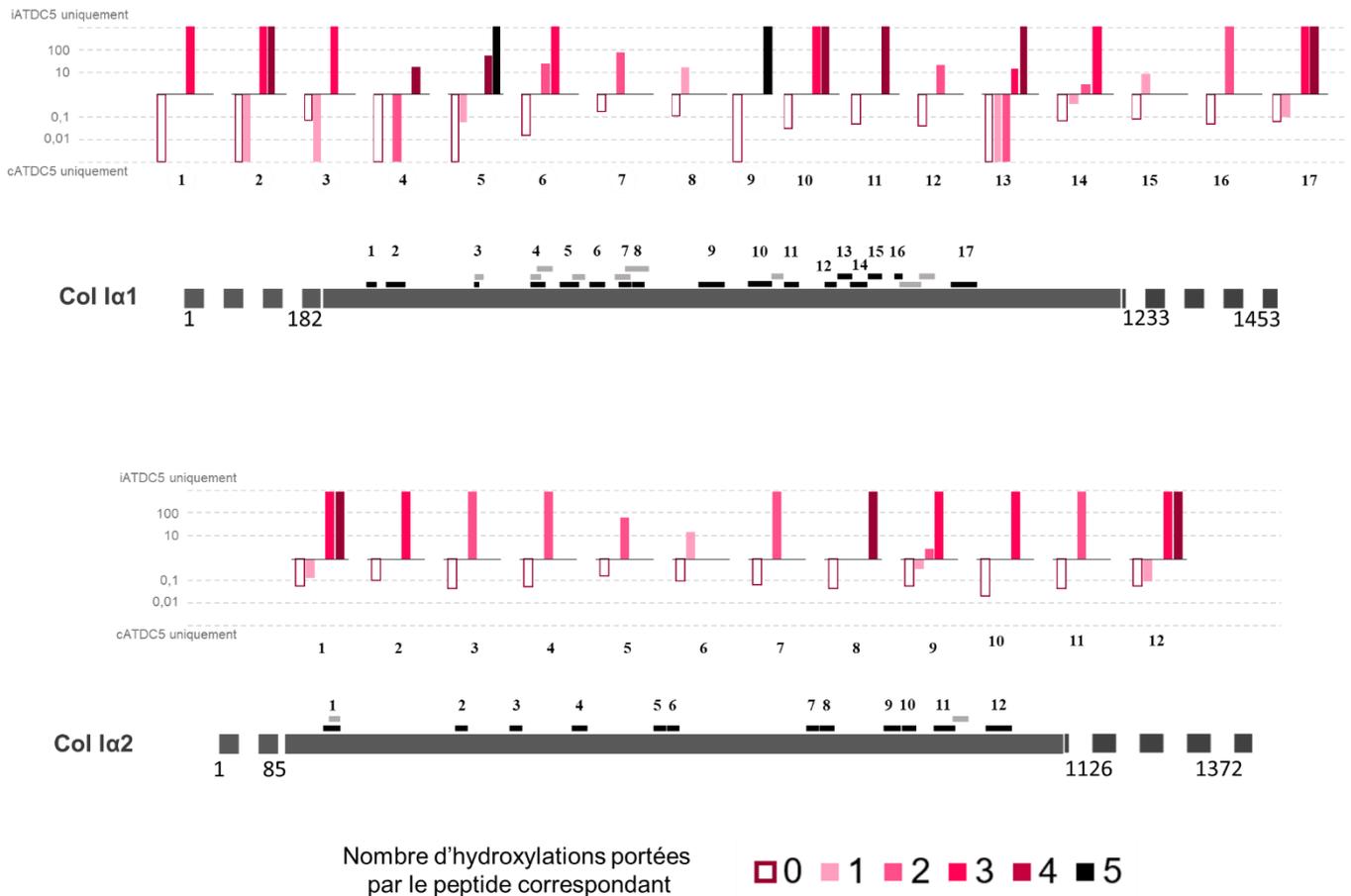


Figure 75 : Régulation de l'hydroxylation de l'ensemble de la triple du collagène de type I dans les cellules iATDC5 comparées à leurs contrôles. Les régulations des différents états chimiques des peptides des chaînes 1α(I) et 1α(II) (grands rectangles gris) sont étudiées à J14 entre les cellules iATDC5 et cATDC5. Les propeptides sont représentés également (rectangles pointillés). Les peptides significativement régulés pour chacune des deux chaînes et présentant au moins deux états chimiques différents (rectangles noirs) sont indiqués avec leur position relative sur la triple hélice. Les histogrammes représentent les ratios de régulations pour chacun des états chimiques et son indiqué en dessous ou au-dessus de leur peptide correspondant. Lorsqu'au moins deux peptides identifiés et régulés se chevauchent, seules les régulations de l'un est indiqué. La position des autres est indiquée à titre indicatif (petits rectangles gris clair). Les données de sortie correspondantes sont répertoriées dans les données supplémentaires S.7.

Le même peptide a également été trouvé alternativement galactosyl-glucosylé sur une lysine (Figure 74, panel de droite) ; cette modification régulée négativement dans les cellules iATDC5, semble principalement refléter son incompatibilité avec les hydroxylations, car elle n'est jamais détectée conjointement avec une hydroxylation massive des résidus prolines environnants.

Au-delà de J14, lors du changement de milieu de culture pour l'αMEM contenant notamment de l'ascorbate, un cofacteur jugé essentiel pour les prolyl hydroxylases [323], les cellules

cATDC5 commencent à accumuler des collagènes dans leur MEC cross-linkée, qui rapidement atteignent des niveaux comparables à ceux observés dans les iATDC5 (Figure 70), et ce jusqu'à la fin de l'expérience. Cette observation est d'autant plus remarquable, qu'à ces moments tardifs, les niveaux d'ARNm de COL1A1 (Figure 71) et les niveaux de C-propeptide sécrété (clivé ou non, Figure 73) atteignent leur minimum. Cependant, les niveaux d'hydroxylation de la triple hélice du collagène de type I aux points expérimentaux tardifs (indiqués pour le jour 35, Figure 74, panel de droite) sont à leur maximum, à la fois dans les cATDC5 et les iATDC5. En effet, à J35 et dans les deux cas, le peptide représentatif n'est trouvé que sous ses versions hyperhydroxylées (contenant 4 ou 5 hydroxylations), ce qui explique l'absence de régulation significative entre les cellules iATDC5 et cATDC5 observée. Encore une fois, aucun contre-exemple n'a été trouvé sur l'ensemble des peptides du domaine en triple hélice du collagène de type I.

Ces résultats suggèrent fortement que l'hydroxylation des prolines est le principal déterminant, par opposition à l'expression génique et à la synthèse protéique, de l'assemblage du collagène de type I dans les cellules iATDC5 et cATDC5, mais à des temps expérimentaux distincts et en fonction de l'agent inducteur (insuline ou ascorbate) (Figure 81). Nos données montrent en effet que les cATDC5 deviennent capables d'hydroxyler et d'assembler le collagène une fois supplémentée en acide ascorbique. En effet, l'ascorbate est considéré comme essentiel pour l'activité des prolyl hydroxylases [261] et il a été démontré que celui-ci favorise la chondrogenèse des cellules ATDC5 [265]. De plus, l'addition d'acide ascorbique augmente l'expression des principaux marqueurs chondrogéniques (Col II et aggrecane) et hypertrophique (ColX) et raccourcit considérablement la phase chondrogénique de 21 à 7 jours [264]. Par ailleurs, des données préliminaires (données non présentée) suggèrent que la supplémentation en ascorbate au cours des 14 premiers jours favorise à la fois l'hydroxylation de la triple hélice et la chondrogenèse des cATDC5.

### 4.3. CARACTERISATION *IN CELLULO* DU ROLE DE PCPE-1 DANS LA MATURATION DES CPs DES PRINCIPAUX COLLAGENES FIBRILLAIRES

Le modèle cellulaire ATDC5 récapitule les étapes de l'ossification endochondrale observée *in vivo*, tant dans l'aboutissement de la chondrogenèse et de la minéralisation de la matrice extracellulaire, que dans l'expression des marqueurs cartilagineux et leur maturation aboutie en termes de MPT. Parce qu'elles possèdent toute la machinerie d'assemblage et de modification des collagènes, et produisent notamment PCPE-1 soluble en quantité (11<sup>ème</sup> protéine la plus abondante du secretome – données non présentées), les cellules ATDC5 représentent le modèle d'excellence pour l'étude et la caractérisation de leurs mécanismes de maturation, notamment dans le cas du clivage des C-propeptides. Nous avons montré que les procollagènes de type I et II présentaient une différence de sensibilité à l'inhibition pharmacologique de BMP-1 (voir §4.1). Afin d'étudier plus en détail les mécanismes de maturation des CPs des principaux collagènes fibrillaires, des constructions permettant l'expression de protéines recombinantes ont été employées. Celles-ci contiennent, de l'extrémité N-ter vers l'extrémité C-ter, un tag His6, les 33 dernières répétitions du triplet d'acide aminés Gly – Xaa – Yaa du collagène fibrillaire correspondant, ainsi que son télopeptide et son C-propeptide, et sont appelées « miniprocollagènes ».

#### 4.3.1. *In cellulo*, la maturation de CPII recombinant est dépendante de BMP-1

Des données préliminaires sur mPC2 (miniprocollagène de type II) ont montré que cette construction représente un bon outil pour l'étude des mécanismes de clivage de la Chondrocalcine. En effet, l'analyse de l'immunoblot avec un anticorps dirigé contre CPII après purification de mPC2 sur billes magnétique de Nickel a montré que cette construction était capable de recruter la machinerie de maturation C-terminale du collagène de type II, puisque CPII est détectée à environ 35 kDa dans l'éluât du *pull down*. Le clivage de CPII à partir de mPC2 reste cependant modeste. La construction portant l'étiquette 6His en N-terminale, lorsque le CPII est clivé à partir de mPC2, il n'est plus étiqueté. Seul un monomère clivé au sein d'un trimère dont au moins l'un des brins est intacte et conserve son étiquette 6His, peut alors être purifié en conditions non réductrices (- DTT) et non dénaturante (- urée), comme observé dans la Figure 76. Par ailleurs, ces résultats soutiennent l'hypothèse que les différents

brins du trimère de C<sub>PII</sub> sont clivés indépendamment les uns des autres. En revanche, nous ne sommes pas en mesure de déterminer sur la base du western blot, laquelle de la forme longue ou courte est produite. En effet, l'anticorps utilisé reconnaît l'extrémité N-terminale de la Chondrocalcine, à proximité immédiate du site de clivage de BMP-1, et n'est donc pas en mesure de détecter la forme courte. L'analyse par spectrométrie de masse ne disposant pas d'une couverture de séquence suffisante, il n'a pas été possible de discriminer ces formes.

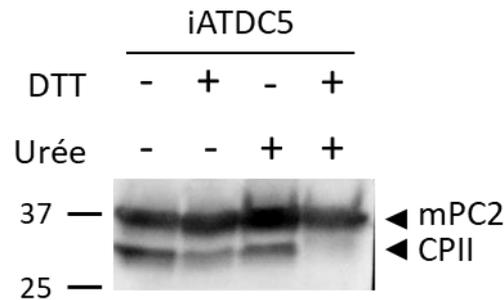


Figure 76 : In cellulo, C<sub>PII</sub> est maturée à partir de la construction miniprocollagène II. Une purification de mPC2 a été réalisée sur billes magnétique de Nickel en présence ou non de DTT et d'urée, à partir du surnageant de culture de cellules ATDC5 exprimant stablement la construction taguée 6His, à 3 jours de culture en condition d'induction de la différenciation chondrogénique (iATDC5 : induite par l'insuline). Les protéines ont été fractionnées sur gel SDS-PAGE en condition dénaturante (+DTT), et révélées avec un anticorps anti-C<sub>PII</sub>.

Puisque C<sub>PII</sub> est efficacement clivé à partir de mPC2, nous avons cherché à voir si le clivage impliquait les mêmes mécanismes que pour la maturation du Col II, et donc en quelle mesure la construction recombinante était sensible à l'inhibition de BMP-1 par l'UK 383367 (qui ici a été utilisé à la dose nécessaire à l'inhibition totale du clivage de CPI dans des chondrocytes humains en culture, soit 10 µM, qui correspond également dans nos conditions de culture à la dose maximale sans toxicité cellulaire) (Figure 77). Lorsque les cellules ATDC5 sont cultivées en présence de l'inhibiteur de BMP-1, une chute drastique du signal spécifique de C<sub>PII</sub> est observée, en présence ou non de DTT lors de la migration. Ainsi, le clivage de C<sub>PII</sub> à partir de la construction mPC2, bien que faible, semble être grandement dépendant de l'activité de BMP-1. Ces résultats montrent pour la première fois l'implication de BMP-1 / mTLD1 dans les ATDC5.

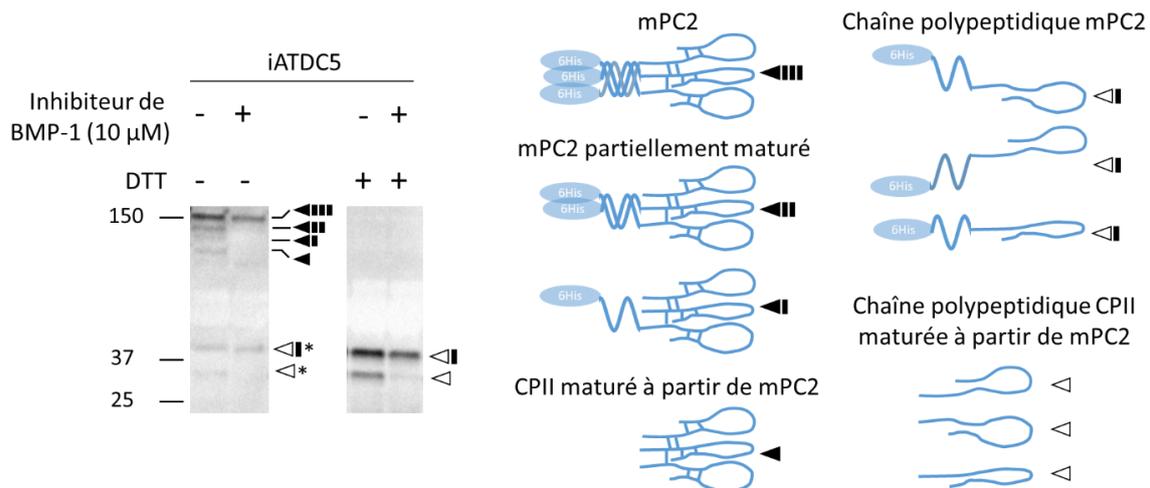


Figure 77 : In cellulo, le clivage de CII à partir du mPC2 est dépendant de la BMP-1. Analyse sur surnageant de culture de cellules ATDC5 exprimant stablement la construction mPC2 taguée 6His, à 3 jours de culture en condition d'induction de la différenciation chondrogénique (iATDC5 : induite par l'insuline), et en présence ou non de l'UK 383367, inhibiteur de BMP-1. Le panel de droite montre les représentations schématiques de chacune des espèces identifiées sur la membrane du panel de gauche après révélation du western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre CII. L'astérisque indique que les ponts disulfures des espèces concernées ne sont pas réduits, contrairement aux espèces équivalentes en présence de DTT. La migration a été réalisée en présence ou en absence de DTT. mPC2 : miniprocollagène de type II. CII : C-propeptide du collagène de type II.

Par ailleurs, une explication serait que mPC2 ne disposant que d'une courte portion de la triple hélice ne recruterait pas l'ensemble des acteurs impliqués dans le clivage de son extrémité C-terminale, notamment ceux responsables du clivage alternatif qui n'est pas dépendant de BMP-1. La maturation de CII modeste à partir de mPC2 conforte dans cette idée.

En outre, la grande sensibilité à l'inhibition du clivage de mPC2 par l'UK383367 est similaire à ce qui est observé *ex vivo* avec CPI sur les chondrocytes humains « répondeurs » en cultures, ou avec CII sur les chondrocytes humains « non – répondeurs ».

#### 4.3.2. In cellulo, CII recombinant ne recrute pas PCPE-1

Afin d'élucider les partenaires protéiques des C-propeptides des principaux collagènes fibrillaires, les cellules ATDC5 ont été transfectées avec les constructions permettant l'expression des différents CPs des collagènes fibrillaires de type I, II et III, ainsi que des constructions mini-procollagène de type I, II, et III (respectivement mPC1, mPC2 et mPC3), le tout étiqueté 6His pour permettre leur purification et l'étude de leurs interactants par *pull down*.

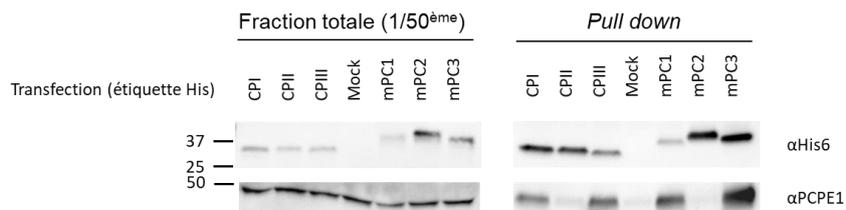


Figure 78 : la Chondrocalcine, contrairement aux autres C-propeptides des collagènes fibrillaires, ne fixe pas PCPE-1. Des cellules ATDC5 transfectées transitoirement en milieu de différenciation (avec insuline) soit avec un plasmide codant l'un des C-propeptides (*pcDNA3.1\_HisCPI* ; *pcDNA3.1\_HisCPII* ; *pcDNA3.1\_HisCPIII*) ou codant l'une des construction miniprocollagène (*pHLsec\_HismPC1* ; *pHLsec\_HismPC2* ; *pHLsec\_HismPC3*). Mock : transfection avec un plasmide vide. Les fractions totales et les éluas de chaque pull down sont fractionnés sur gel SDS-PAGE. Les immunoblot sont réalisés avec un anticorps dirigé contre l'étiquette His ou contre PCPE1 murine.

L'analyse des western blot de la fraction retenue sur les billes de Nickel montre que CPI et CPIII, ainsi que leurs versions miniprocollagènes respectives, mPC1 et mPC3 retiennent PCPE-1. Nos résultats confirment les données de la littérature sur l'interaction décrite entre CPI et PCPE-1 [164] et CPIII et PCPE-1 [163,164]. En revanche, et de manière surprenante, ni CPII, ni sa forme miniprocollagène correspondante ne montrent la capacité de fixer PCPE-1, ce qui, ici encore, est décrit pour la première fois. L'absence d'interaction entre CPII et PCPE-1 semble expliquer en partie et pourrait être la clef de la différence de sensibilité des procollagènes de type I et II à l'inhibition pharmacologique de BMP-1. Par ailleurs, mPC2 a déjà montré sa capacité à recruter la machinerie de clivage de la Chondrocalcine. Le clivage de CPII semble ainsi être, *a minima*, moins dépendant de l'activité de PCPE-1 que les autres CP.

#### 4.3.3. Mise en place d'une lignée invalidée pour PCPE-1

Afin de clarifier le rôle de PCPE-1 dans un système plus intégré que purement *in vitro*, les cellules ATDC5 ont été choisies pour réaliser une invalidation du gène *PCOLCE*, par la technologie CRISPR – Cas9. Les clones obtenus ont d'abord été validés génétiquement par séquençage, et les résultats sont présentés dans la Figure 79.

```

70                                                                 150
PCOLCE – exon 2  GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG
Clone 1D7 – allèle 1 GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG

PCOLCE – exon 2  GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG
Clone 1D7 – allèle 2 GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG

PCOLCE – exon 2  GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG
Clone 2F8 – allèle 1 GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG

PCOLCE – exon 2  GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG
Clone K4 – allèle 1 GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG

PCOLCE – exon 2  GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG
Clone K4 – allèle 2 GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG

PCOLCE – exon 2  GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG
Clone K4 – allèle 3 GGGGAAACCCCTCACTTGCCACGTAACCTGACTCCCCGGTACAGTCCCCTCCGCACAGGAACACAGGTCTGGAGGACAGAG

```

Figure 79 : Séquences de la région ciblée par le sgRNA dans l'exon 2 du gène *PCOLCE*, codant *PCPE-1*. Pour chaque clone ATDC5 (1D7, 2F8 et K4), l'ADN a été extrait, et la portion de l'exon 2 du gène *PCOLCE* contenant la séquence cible a été amplifiée par PCR en point final. L'amplikon a ensuite été cloné dans un vecteur TOPO-Blunt, amplifié en bactérie Top10. 6 clones bactériens ont été amplifiés et des miniprep plasmidiques ont été réalisées pour séquençage. Ainsi, pour chaque clone ATDC5, 6 séquençages indépendants ont été réalisés.

Etonnamment, pour le clone ATDC5 K4, trois mutations différentes ont été identifiées : deux délétions de deux acides aminés à des positions différentes, et une délétion de cinq acides aminés. L'identification de trois mutations suggère que le gène *PCOLCE*, dans les cellules ATDC5, est présent au moins au nombre de trois copies. Le caryotype de cellules ATDC5 n'a, à ce jour, jamais été réalisé. Il est vraisemblable qu'en tant que lignée cancéreuse et donc intrinsèquement anormale, leur caryotype le soit aussi. En ce qui concerne le 2F8, un seul allèle semble avoir été séquençé. Il est assez peu probable que les différentes copies du gène aient toutes subies la même et unique mutation.

Une expérimentation pilote, visant à caractériser les capacités de différenciation des différents clones obtenus, a été réalisée. Des cellules sauvages, les trois clones KO précédemment décrits, ainsi que deux clones ayant subi la même sélection mais ayant conservé l'expression de *PCPE1* ont été mis en culture. La différenciation a été induite (ou non) à l'insuline.

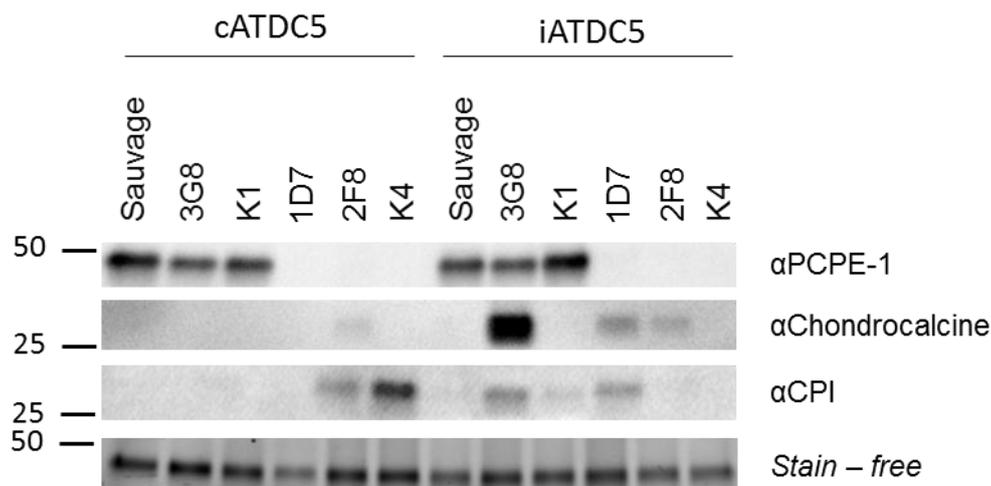


Figure 80 : Les différents clones obtenus à l'issue de la sélection clonale présentent une grande hétérogénéité. A 14 jours de culture, les surnageants des cellules sauvages, des clones contrôles 3G8 et K1, et des clones KO PCPE-1 1D7, 2F8 et K4 ont été fractionnés sur gel SDS-PAGE et analysés par western blot pour l'expression et la sécrétion de PCPE-1, de la Chondrocalcine – CPII et de CPI. La révélation du profil électrophorétique par la technologie Stain-free est utilisée comme contrôle de charge.

L'analyse des western blot pour CPI et CPII (Figure 80) montre une très grande hétérogénéité dans les signaux observés : aucun schéma d'expression et/ou de sécrétion ne se dessine. En effet, du signal spécifique de CPI et CPII est observable, mais d'une manière qui semble aléatoire. En outre, aucun signal la Chondrocalcine ou CPI n'est observable dans le surnageant des cellules ATDC5 sauvages, alors qu'à 14 jours de cultures, elles sont décrites pour sécréter ces deux C-propeptides en quantité, suggérant que la différenciation chondrogénique est anormale, y compris dans les cellules sauvages. Par ailleurs, afin que les cellules sauvages soient aux plus proches des conditions de culture des clones, l'expérimentation a été réalisée à nombre de passage égal (donc élevé). Bien que les ATDC5 soit une lignée établie, l'expérience nous a montré qu'elles semblent encore être largement dépendante du nombre de passage, notamment pour la qualité de la chondrogenèse observée lors de l'induction de la différenciation.

A ce stade, les clones KO PCPE-1 ne représentent pas un outil exploitable.

## 5. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Les propeptides carboxy-terminaux des collagènes sont des domaines multifonctionnels et leur implication dans l'assemblage des matrices extracellulaires va bien au-delà de leur rôle dans la reconnaissance et l'assemblage des chaînes polypeptidiques  $\alpha$  des collagènes [105,389]. Véritables plateformes d'interaction, ils permettent notamment le recrutement de protéines matricielles [390] ou de protéines impliquées dans la modification et la maturation des collagènes fibrillaires telles que PCPE-1 [159] ou la lysyl oxydase LOX ([390] et données non-publiées de laboratoire). Dans le cas du collagène de type II, le propeptide, ou CPII, a été également décrit comme une matrikine importante pour la régulation de l'homéostasie du cartilage [49,50], et est notamment retrouvé associé à la matrice extracellulaire dans le cartilage de croissance [267], et en particulier dans les zones calcifiées [268]. Cette implication suggérée dans le processus de minéralisation en tant que nucléateur [268,269] lui a d'ailleurs valu le nom de la Chondrocalcine. En outre, CPII est également décrit dans le cartilage articulaire, qui en dehors de cas pathologiques, ne minéralise pas [271]. Les rôles multiples de CPII – la Chondrocalcine dans la mise en place de la matrice extracellulaire du cartilage, dans son homéostasie et sa minéralisation semblent profondément liés. Afin d'élucider son rôle précis dans le processus de calcification ainsi que la différence de comportement entre les différents types de cartilage nous avons choisi d'étudier son clivage par des approches *in vivo*, *in cellulo*, et *in vitro* complémentaires. Nos données prises ensemble ont tout d'abord permis de récapituler les connaissances acquises sur les propriétés biochimiques de la Chondrocalcine : ce trimère d'environ 100 kDa est un composant majoritaire des cartilages de croissance et articulaire, et les chaînes qui le composent présentent deux sites de clivages distincts. Nos résultats montrent en revanche pour la première fois que la Chondrocalcine issue du cartilage articulaire possède une affinité comparable à la protéine issue du cartilage de croissance pour l'hydroxyapatite.

Les chaînes polypeptidiques  $\alpha$  composants la Chondrocalcine ont été décrites sous deux formes : une forme longue issue du clivage conventionnel par BMP-1 que nous sommes en mesure d'identifier par western blot [49], et une forme plus courte de 10 acides aminés [272]. Nos données montrent pour la première fois que ces deux formes peuvent coexister au sein d'un même trimère, suggérant un mécanisme de clivage séquentiel, dans lequel chacune des chaînes

polypeptidiques serait prise en charge indépendamment. Cette idée supporte notamment la récente mise en évidence du mécanisme d'activation de BMP-1 par PCPE-1 [164]. En outre, la présence de deux sites de clivages peut suggérer plusieurs choses. Premièrement, il existerait une protéase encore non – décrite dont le site spécifique serait le site de clivage distal de la Chondrocalcine. Dans de nombreux cas, les protéases agissent de manière très spécifique et leur activité est ajustée avec précision en fonction du temps et du tissu. De multiples cas de redondance fonctionnelle entre différentes enzymes sont décrits, et la maturation des collagènes en est un très bel exemple. Ainsi, une deuxième hypothèse serait que, à l'image de BMP-1 [346], ou des méprines [150] une enzyme déjà décrite mais non – identifiée dans ce contexte reconnaîtrait un site dégénéré et cliverait une gamme de substrats plus étendue, et notamment le site de clivage distal de la Chondrocalcine. Enfin, BMP – 1 elle-même cliverait au site distal de manière indépendante de son activité décrite au site proximal et qui ne serait pas inhibé par des agents pharmacologiques type hydroxamate (comme l'UK 383367 utilisé dans nos études). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'UK ne pénétrerait pas dans la cellule, ne permettant l'inhibition de BMP-1 qu'en extracellulaire, suggérant que le procollagène de type I, contrairement au procollagène de type II, ne serait clivé qu'en extracellulaire uniquement. Cette hypothèse a d'autant plus de sens que nous avons montré que CPI, contrairement à CPII, permet de recruter PCPE-1, une protéine extracellulaire.

Par ailleurs, des sites de clivage alternatifs n'ont jamais été décrits pour les C-propeptides des collagènes de type I et III, ce qui semble cohérent avec (i) le fait que la maturation du procollagène de type I puisse être totalement bloquée par l'inhibition de BMP-1 et (ii) que les CPI et CPIII, contrairement à CPII, fixent PCPE-1. Cela suggère l'existence d'un système de régulation fin spécifique du tissu cartilagineux contrôlant les types de C-protéinases et la chronologie (si elle existe) par laquelle elles interviennent selon les besoins du cartilage. Un argument en la faveur de cette régulation tissu-spécifique réside dans les souris *Bmp1*<sup>-/-</sup>. Les mutants homozygotes ne présentent pas d'anomalies évidentes du squelette hormis des défauts de développement des os du crâne [157], qui se forment par ossification membranaire. Par ailleurs, bien que la Chondrocalcine soit impliquée dans le processus de minéralisation du cartilage de croissance au cours de l'ossification endochondrale, elle ne l'est pas dans le processus d'ossification membranaire [269]. Au contraire de l'ossification endochondrale, l'ossification membranaire ne fait pas intervenir de patron cartilagineux et résulte directement de la transdifférenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes. Il semblerait alors que

la maturation du procollagène de type II et le clivage de la Chondrocalcine puisse ne pas être dépendant de BMP-1.

La maturation des principaux collagènes fibrillaires est souvent, et peut être à tort, récapitulée et extrapolée à partir des données obtenues sur le collagène de type I, le plus abondant des collagènes fibrillaires chez les vertébrés. Nos résultats, ainsi que de récents travaux [390] montrent au contraire que les collagènes, et notamment leur C-propeptide, ne recrutent pas les mêmes partenaires. Plus globalement, la maturation des collagènes est régulée à de nombreux niveaux, de manière directement dépendante du type de collagène, probablement de manière à satisfaire au mieux les sollicitations de chaque tissu à la fois en conditions physiologiques et pathologiques.

Nos données *in cellulo* ne permettent pas d'affirmer ce qu'il advient de la forme courte de CPII (ni même si elle existe dans le contexte des ATDC5 en différenciation). En effet, puisque l'anticorps utilisé pour détecter la Chondrocalcine est dirigé contre la partie N-terminale de la protéine [50], il ne permet de détecter que la forme plus longue de 10 acides aminés. Par ailleurs, alors que la Chondrocalcine reste indétectable en western blot dans l'extrait guanidine, les analyses par spectrométrie de masse suggèrent son intégration progressive dans la MEC non cross-linkée. Pris ensemble, cela laisse à supposer que la forme intégrée à la MEC serait la forme courte. Ici encore, les données de spectrométrie de masse ne permettent pas de trancher, car le recouvrement de séquence est trop faible. En revanche, cela serait cohérent avec les données de la littérature suggérant que la forme courte est la forme majoritairement retrouvée dans le cartilage de croissance [274].

Afin de disséquer au mieux les mécanismes de maturation des collagènes, et notamment concernant le clivage des C-propeptides, nous avons fait le choix de nous orienter sur l'utilisation du modèle cellulaire ATDC5. Depuis sa première description en 1990 [321], le modèle ATDC5 est devenu vraiment populaire dans le domaine de la chondrogenèse et s'est répandu dans les laboratoires du monde entier, permettant une caractérisation fonctionnelle pertinente de multiples acteurs de la chondrogenèse, tout en permettant de s'affranchir de la complexité liée aux expériences *in vivo* [322,328,329,391,392]. Afin d'appréhender véritablement la portée de la retranscription des résultats obtenus sur cette lignée au contexte *in vivo*, et peut-être d'identifier de nouveaux acteurs importants dans la chondrogenèse, plusieurs groupes ont entrepris la caractérisation exhaustive du modèle. De manière surprenante, bien que les profils de transcription global et temporel des cellules ATDC5 soient

dorénavant assez bien compris [340,341,364], le protéome des cellules ATDC5 restait, jusqu'alors largement mal défini, même du point de vue des protéines essentielles de la chondrogenèse et des marqueurs de la différenciation (notamment Col II et agrécane). De sorte à combler cette lacune importante pour la compréhension des mécanismes de régulation de l'assemblage des MEC, nous avons réalisé la description poussée du sécrétome et du matrisome des cellules ATDC5 avec une attention particulière donnée au profil d'expression et de modification des collagènes, en combinant une méthode de fractionnement cellulaire dédiée et la quantification relative *label-free* par LC-MS/MS (LC – TOF/TOF).

Nous avons ainsi décrit la régulation significative de plus de 100 protéines différentes, prenant en compte tous les extraits, entre les cellules ATDC5 soumises à différenciation, et les cellules contrôles. Parmi elles, 62 protéines ont été décrites précédemment (littérature sélectionnée [310,363,364]) dans des études protéomiques de chondrogénèse, *in vivo* ou *ex vivo*, consolidant ainsi la signification biologique du modèle. De façon remarquable, les collagènes de type II et X ainsi que l'aggrécane, les marqueurs les plus courants de la chondrogénèse précoce et tardive et principaux composants des MEC du cartilage ne sont détectés qu'à l'état de trace, voir totalement absents des cellules contrôles à tous les stades de la différenciation. Dans les cellules ATDC5 induites en revanche, ces protéines s'accumulent dans la MEC et arborent la majorité de leurs modifications post-traductionnelles décrites *in vivo*, en particulier une quantité impressionnante (relativement à la couverture de séquence) d'hydroxylation des prolines et le clivage des propeptides amino et carboxyterminaux efficace. Un comportement remarquable de ces cellules car les quelques lignées cellulaires qui se sont révélées capables de synthétiser du collagène de type II assemblé, à notre connaissance, ne semble pas le faire de façon optimale [318,393]. Les processus de maturation des collagènes et de l'aggrécane, qui a été montré comme essentiel dans ce modèle pour la différenciation chondrogénique [228], impliquent des étapes multiples et coordonnées, qui restent largement non caractérisées, précisément parce que les modèles cellulaires établis qui les récapitulent font défaut. Dans cette perspective, les cellules ATDC5 devraient être très utiles.

Nos résultats ont par ailleurs permis de mettre en évidence plusieurs protéines qui n'ont à ce jour pas encore été caractérisées dans les cellules ATDC5, ni plus globalement dans un contexte ostéo-articulaire. Les cellules ATDC5, qui ont déjà montré leur force dans l'identification de nouveaux type de collagènes [342] et de nouveaux acteurs de la chondrogenèse [339] peuvent donc être considérées comme un bon modèle pour évaluer leurs fonctions dans le futur.

La minéralisation inappropriée des tissus peut avoir des conséquences graves et entraîner des conditions telles que l'athérosclérose et l'arthrose entre autres [386]. Une connaissance plus complète des événements cellulaires et moléculaires menant à la minéralisation aiderait sans aucun doute à comprendre non seulement les mécanismes impliqués dans les troubles du métabolisme osseux, mais aussi la calcification pathologique de tissus mous. En ce sens, les cellules ATDC5 ont largement été décrite comme un modèle propice à l'étude de la minéralisation [334,335], notamment pour l'étude des mécanismes de l'ossification endochondrale [338,339]. Nos résultats montrent que les cellules ATDC5 expriment certains des marqueurs de l'hypertrophie, notamment le collagène de type X qui, en accord avec la littérature, précède le dépôt de minéraux [263], ainsi que des protéines de régulation de la minéralisation telle que la protéine Matrix  $\gamma$ -carboxy-glutamate (Gla), ou MGP, et la périostine (POSTN), toutes deux décrites comme des inhibiteurs de la calcification [394,395] et retrouvée régulée à la baisse dans nos expérimentations, en phase avec l'apparition de la minéralisation. Par ailleurs, CPII s'accumule dans la MEC de manière concomitante avec la minéralisation (Tableau 13). Ces données confortent l'idée que l'élément initiateur serait l'apparition d'une calcification [270], même modeste, permettant l'accumulation de CPII dans la MEC. Sa grande affinité pour l'hydroxyapatite conduirait *in fine* à l'accrétion de minéraux. Cependant, les cellules ATDC5 restent un modèle. Et comme tout modèle, il est imparfait. Un premier argument en faveur d'une chondrogenèse imparfaite des cellules ATDC5 dans nos conditions d'expérimentation, est l'absence de certaines protéines qui étaient attendues. C'est notamment le cas de COMP (Cartilage oligomeric matrix protein), qui est parmi les protéines les plus abondamment sécrétées dans les chondrocytes primaires [282,396] et dans les cellules souches mésenchymateuses soumises à chondrogenèse [353,360], du collagène de type IX [312,397] qui est en revanche retrouvé dans d'autres modèles cellulaires [318] et les matrilines [281]. Par ailleurs, l'établissement de l'hypertrophie et de la calcification de la MEC restent discutables. Ainsi, le collagène de type X qui est identifié uniquement dans l'extrait guanidine, est en quantité si faible qu'il reste proche du seuil minimum de détection. Là encore, d'autres protéines n'ont quant à elles jamais été observées. C'est le cas notamment de l'essentielle TNAP [386]. Sur le même registre, la minéralisation observée est, de manière étonnante, totalement indépendante de la formation des cross-links des collagènes. Il semblerait alors que, dans nos conditions expérimentales du moins, la calcification observée de la MEC ne soit que très peu représentative d'une calcification physiologique et ne reflète pas les capacités réelles du modèle.

Une deuxième raison de considérer que la chondrogenèse serait imparfaite réside dans l'abondance relative des différents composants de la MEC, et notamment en termes de collagènes fibrillaires. Bien que les extraits CNBr contiennent des quantités substantielles de collagène de type II, le type I qui est normalement absent du tissu cartilagineux reste ici le composant principal. Néanmoins, le collagène de type I a déjà été décrit dans des analyses protéomique du cartilage [398] et est exprimé par des chondrocytes différenciés [289]. Ce qui semblerait être une faiblesse du modèle s'est avérée particulièrement utile pour révéler la régulation critique de l'assemblage de collagène par l'hydroxylation de la triple hélice. En effet, les cellules contrôles ne sécrétant du collagène de type II qu'en quantité infime et seulement à partir du 17<sup>ème</sup> jour, quantifier les régulations des modifications post-traductionnelles n'était pas envisageable. En revanche, nous avons pu tirer parti du fait que les cellules induites et les cellules contrôles sécrètent des niveaux comparables et considérables de procollagène de type I soluble, pour comparer leurs MPTs et mettre en évidence que c'est l'hydroxylation de la triple hélice qui semble être le facteur déterminant le dépôt de collagène dans la MEC, par opposition notamment avec l'expression génique.

De manière concomitante avec la régulation des hydroxylations des prolines, nous avons pu observer une régulation à la hausse du clivage du propeptide amino-terminal, mais pas carboxy-terminal. Il a été montré que des mutations qui perturbent le repliement correct de la région N-terminale de la triple hélice du collagène de type I altère le clivage du N-propeptide chez des patients atteints d'OI [145,399]. Par ailleurs, l'étude de l'hydroxylation des prolines a montré son importance pour la formation de la triple hélice de collagène de type III et a suggéré qu'elle était nécessaire notamment pour la stabilisation du N-propeptide par des ponts di-sulfures [400]. Enfin, *in vitro*, du procollagène en partie mal replié est toujours sensible à la C-protéinase, mais pas à la N-protéinase [401]. Par conséquent, le clivage amélioré du N-propeptide observé dans les cellules iATDC5 (Figure 72 et Figure 73) peut ne pas refléter une véritable amélioration des activités enzymatiques correspondantes, mais plutôt une amélioration de la conformation du N-propeptide, qui serait une conséquence directe de la formation efficace de la triple hélice, en lien avec une augmentation spectaculaire de l'hydroxylation (Figure 81). A notre connaissance, il s'agit de l'observation la plus robuste sur une lignée cellulaire établie de la conséquence décisive de l'hydroxylation de la triple hélice de collagène de type I, et notamment des prolines, sur le dépôt matriciel.

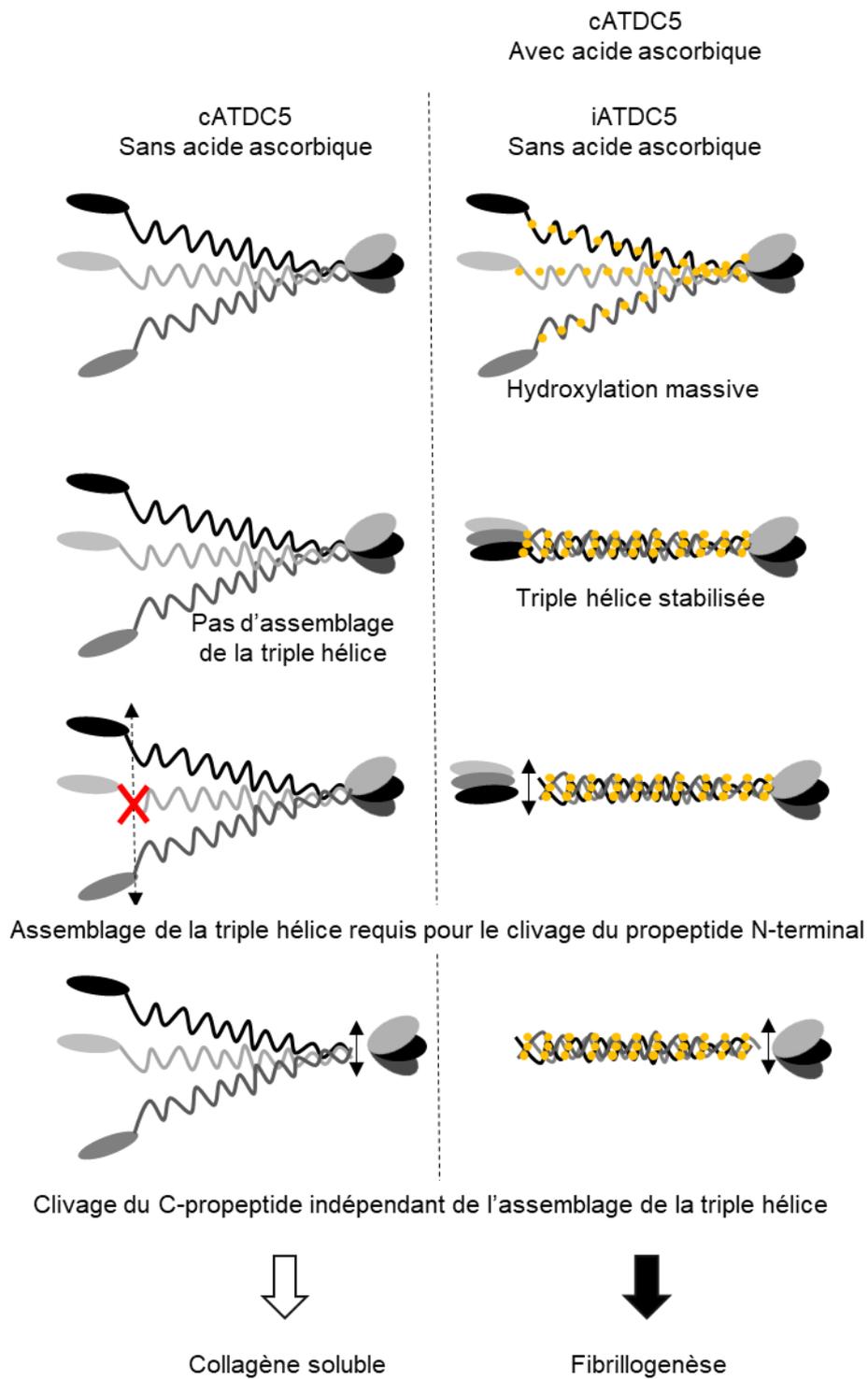


Figure 81 : L'hydroxylation de la triple hélice est le principal déterminant de l'assemblage du collagène de type I dans la matrice extracellulaire des cellules ATDC5.

Le modèle cellulaire ATDC5 est totalement dépendant d'un facteur exogène, à savoir l'insuline, pour sa différenciation chondrogénique. En revanche, comment l'insuline conduit à cette différenciation reste incertain dans les détails [329,340,402]. Il est remarquable de constater que les cellules ATDC5 sous l'influence de l'insuline, en l'absence totale de supplémentation en acide ascorbique et durant les 14 premiers jours de culture, soient en mesure d'hydroxyler leurs collagènes. Cela pourrait en partie s'expliquer par le fait que le métabolisme murin, contrairement aux humains, a conservé la capacité de produire la vitamine C [403]. En revanche, puisque les cellules cATDC5 ne présentent pas la capacité d'hydroxyler la triple hélice de collagène, il semblerait que ce mécanisme soit totalement dépendant de l'insuline. Par ailleurs, il a été montré que les souris étaient également en mesure de synthétiser et modifier les collagènes de manière ascorbate – indépendante [404], et il reste donc à éclaircir, dans le modèle ATDC5, laquelle de ces deux voies est induite lors de la supplémentation en insuline.

Parmi les protéines retrouvées régulées à la hausse dans les sécrétomes, immédiatement après la stimulation à l'insuline, de manière concomitante avec l'hydroxylation globale de la triple hélice des collagènes et avant la synthèse détectable du procollagène de type II, il y a notamment les protéines du terme GO processus énergétique. Ces résultats peuvent évoquer dans un premier temps une adaptation métabolique des cellules ATDC5 afin de répondre à une demande accrue en énergie. Par ailleurs, des voies métaboliques énergétiques spécifiques ont été très récemment démontrées pour favoriser l'accumulation de collagène en augmentant l'hydroxylation de la triple hélice dans le cartilage [405] et dans les cellules cancéreuses [406]. En accord avec nos résultats, l'augmentation de l'hydroxylation est du même ordre que celle que nous observons dans les cellules ATDC5 induites à l'insuline. En revanche, l'ensemble des expérimentations décrites [406,407], contrairement aux iATDC5 sur les 14 premiers jours, ont été réalisées en présence d'acide ascorbique. *In fine*, la voie par laquelle l'insuline déclenche la synthèse de protéines spécifique de la chondrogenèse et leur intégration dans une MEC solide, est susceptible d'imiter, dans un environnement simplifié, le contrôle métabolique exercé sur la production de collagène *in vivo*.

Le modèle cellulaire ATDC5 semble être, à ce jour, le meilleur modèle établi *in cellulo* pour l'étude de la synthèse des collagènes et de leurs MPTs. Nous avons ainsi souhaité l'utiliser pour développer un modèle invalidé pour PCPE-1. Bien que nos résultats préliminaires ne soient que peu convaincants, des enseignements indispensables sont à tirer de l'expérience de culture de ces cellules. Les cellules ATDC5 sont décrites comme une population hétérogène, qui forme en cours de différenciation des nodules cartilagineux [322], suggérant que toutes les cellules ne

se différencient pas au même degré, au même moment. Il est par ailleurs possible d'en isoler différentes sous-populations [408]. L'induction de la différenciation des ATDC5 est également possible par ajout de BMP-4 [329,340], conduisant à une différenciation de l'ensemble des cellules tout en évitant la formation de nodule, et réduisant potentiellement la forte hétérogénéité au sein de la population. Le gain d'homogénéité se fait cependant au détriment d'une reproduction plus fidèle du processus observé *in vivo* au cours de l'ossification endochondrale : la condensation mésenchymateuse en phase précoce qui donne lieu à une prolifération de chondrocytes. En ce sens, la sélection clonale, qui a pour but d'obtenir une lignée parfaitement homogène en termes de génotype, s'éloigne grandement des conditions physiologiques dans lesquelles une communication s'établit entre de nombreux types cellulaires au sein d'un même tissu. Le génotypage des clones ATDC5 invalidés pour PCPE-1 et l'expression presque aléatoire des différents CPs, soulève notamment ce problème : alors qu'un clone possède trois copies modifiées du gène *PCOLCE*, suggérant une triploïdie, une seule version modifiée est détectable dans un autre. Le caractère aléatoire de la mutation induite par le système CRIPR-Cas9, en l'absence de système de mutagenèse dirigée, laisse assez peu de probabilité à la création d'homozygotes. Il semblerait alors que ce clone ne dispose que d'une unique copie du gène *PCOLCE*. Dans l'ensemble, cela suggère que les cellules ATDC5 sont une population dont le caryotype varie probablement d'une cellule à l'autre. Finalement, au cours de nos expérimentations les cellules ayant subi une sélection clonale semblent avoir dérivé, conduisant à un phénotype anormal indépendant de la mutation induite dans le gène *PCOLCE*. Une solution pourrait alors être de travailler sur une population sélectionnée pour la perte d'expression de PCPE-1, et non sur un clone.

Pour conclure, ce travail de thèse a été l'occasion de réaffirmer et approfondir la caractérisation du clivage du propeptide carboxy terminal du procollagène de type II, ou la Chondrocalcine, et de certains des mécanismes impliqués dans la maturation des collagènes, en particulier l'implication de l'hydroxylation des prolines pour la stabilisation de la triple hélice et le contrôle du clivage subséquent du propeptide amino-terminal. Cette étude, en grande partie réalisée à l'aide du modèle cellulaire ATDC5, a permis de mettre en évidence les forces majeures de ce modèle ainsi que ses faiblesses, qui pour l'une d'entre elles, s'est révélée être un atout considérable pour l'évaluation quantitative des niveaux de régulation des modifications post-traductionnelles. La maniabilité du modèle, qui réside dans sa nature cellulaire simple et son induction par un seul facteur exogène, pourrait faciliter la caractérisation plus poussée des

mécanismes impliqués dans la maturation des protéines impliquées dans la chondrogenèse, et plus largement, de l'assemblage des collagènes dans les matrices extracellulaires.

Par ailleurs, la caractérisation de la Chondrocalcine et son implication dans les mécanismes de minéralisation n'a, malgré nos efforts, pas pu être poussée aussi loin que nous l'aurions voulu, et des études supplémentaires sont nécessaires. Notamment, il serait intéressant de déterminer si la présence de l'une ou l'autre des formes de la Chondrocalcine (courte ou longue) impacte davantage la minéralisation, et surtout quel est le mécanisme impliqué dans la génération de la forme alternative. Les deux stratégies principales utilisées au cours de ce travail de thèse ont eu pour objectif principal d'inhiber le clivage de CPII de manière plus ou moins sélective, afin d'étudier son intégration à la MEC et en quelle mesure la minéralisation pouvait en être impactée. Ces approches en revanche ne sont soit pas suffisamment spécifiques (dans le cas de l'inhibition pharmacologique de BMP-1), soit pourraient ne pas représenter la meilleure alternative (dans le cas du *knock out* de PCPE-1), puisque nos résultats suggèrent que les procollagènes fibrillaires présentent des différences dans leur maturation, notamment en termes de recrutement de partenaires et de susceptibilité à l'inhibition de C-protéinases. Une stratégie plus spécifique pourrait résider dans le ciblage exclusivement du site de clivage de BMP-1 dans le Col II. Le développement de la technologie CRISPR permet aujourd'hui de réaliser de la mutagenèse dirigée et ainsi de créer de nouvelles lignées présentant spécifiquement une mutation désirée. Il serait ainsi possible d'étudier l'implication uniquement de la forme courte de la Chondrocalcine issue du clivage distal alternatif, à la fois dans la fibrillogenèse et dans la minéralisation. A ce jour, aucune mutation n'est décrite chez l'Homme pour affecter le site de clivage de la Chondrocalcine par BMP-1 (*Leiden Open Variation Database – Variome COL2A1* - [409]) traduisant peut-être son incompatibilité physiologique (c'est-à-dire que la présence de cette mutation engendrerait *ipso facto* la mort *in utero*). Au plus proche, une mutation p.Y1238X affectant un résidu trois positions en amont du site de clivage, a été montrée comme responsable d'une forme de syndrome de Stickler, caractérisé par une perte auditive, une arthrose prématurée, et un phénotype cornéal varié, allant d'une myopie congénitale élevée à la cécité par décollement de la rétine [410]. En revanche, aucune caractérisation moléculaire n'a été réalisée. *In fine*, la stratégie de travail qui pourrait être employée par le laboratoire afin d'approfondir à la fois la caractérisation des rôles des deux sites de clivage de la Chondrocalcine ainsi que dans quelle mesure PCPE-1 est impliquée dans la maturation du collagène de type II, pourrait passer par l'obtention d'une lignée ATDC5 modifiée au niveau des sites de clivage de la Chondrocalcine (proximal ou distal ou les deux). A la lumière des résultats obtenus au cours

de ce travail de thèse, cela semble indissociable de la maîtrise du processus d'obtention des clones / population clonale dans ce modèle cellulaire. La question de la compatibilité de la conservation du CP avec la fibrillogenèse du collagène de type II dans les cellules ATDC5 se pose néanmoins. Des données *in vivo* issues de souris déficientes en BMP-1 qui conservent le CP sur au moins une partie des molécules de Col I suggèrent que ce serait possible, bien que le phénotype soit pathologique [157].

# 6. REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Solazzo, C., Courel, B., Connan, J., van Dongen, B.E., Barden, H., Penkman, K., Taylor, S., Demarchi, B., Adam, P., Schaeffer, P., Nissenbaum, A., Bar-Yosef, O., et Buckley, M. (2016) Identification of the earliest collagen- and plant-based coatings from Neolithic artefacts (Nahal Hemar cave, Israel). *Scientific Reports*, **6** (1).
2. van der Rest, M., et Garrone, R. (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J.*, **5** (13), 2814-2823.
3. Exposito, J.-Y., Cluzel, C., Garrone, R., et Lethias, C. (2002) Evolution of collagens. *Anat. Rec.*, **268** (3), 302-316.
4. Garrone, R., Exposito, J.Y., Franc, J.M., Franc, S., Humbert-David, N., Qin, L., et Tillet, E. (1993) [Phylogenesis of the extracellular matrix]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, **187** (2), 114-123.
5. Morris, P.J. (1993) THE DEVELOPMENTAL ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX SUGGESTS A MONOPHYLETIC ORIGIN OF THE KINGDOM ANIMALIA. *Evolution*, **47** (1), 152-165.
6. Fidler, A.L., Boudko, S.P., Rokas, A., et Hudson, B.G. (2018) The triple helix of collagens – an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *Journal of Cell Science*, **131** (7), jcs203950.
7. Celerin, M., Ray, J.M., Schisler, N.J., Day, A.W., Stetler-Stevenson, W.G., et Laudenbach, D.E. (1996) Fungal fimbriae are composed of collagen. *EMBO J.*, **15** (17), 4445-4453.
8. Tarazona, O.A., Slota, L.A., Lopez, D.H., Zhang, G., et Cohn, M.J. (2016) The genetic program for cartilage development has deep homology within Bilateria. *Nature*, **533** (7601), 86-89.
9. Gould, S.J., et Vrba, E.S. (1982) Exaptation—a Missing Term in the Science of Form. *Paleobiology*, **8** (01), 4-15.
10. Letunic, I., et Bork, P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.*, **44** (W1), W242-245.
11. Brunet, T., et Arendt, D. (2016) Animal Evolution: The Hard Problem of Cartilage Origins. *Current Biology*, **26** (14), R685-R688.
12. Gould, S.J. (2002) *The structure of evolutionary theory*, Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Mass.
13. Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., et de Crombrughe, B. (2014) Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice. *PLoS Genet*, **10** (12).
14. Yang, L., Tsang, K.Y., Tang, H.C., Chan, D., et Cheah, K.S.E. (2014) Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111** (33), 12097-12102.
15. Jing, Y., Jing, J., Ye, L., Liu, X., Harris, S.E., Hinton, R.J., et Feng, J.Q. (2017) Chondrogenesis and osteogenesis are one continuous developmental and lineage defined biological process. *Scientific Reports*, **7** (1), 10020.

16. Cervantes-Diaz, F., Contreras, P., et Marcellini, S. (2017) Evolutionary origin of endochondral ossification: the transdifferentiation hypothesis. *Dev. Genes Evol.*, **227** (2), 121-127.
17. Volkmann, D., et Baluska, F. (2006) Gravity: one of the driving forces for evolution. *Protoplasma*, **229** (2-4), 143-148.
18. Gómez-Picos, P., et Eames, B.F. (2015) On the evolutionary relationship between chondrocytes and osteoblasts. *Front Genet*, **6**, 297.
19. Yamada, Y., Avvedimento, V.E., Mudryj, M., Ohkubo, H., Vogeli, G., Irani, M., Pastan, I., et de Crombrughe, B. (1980) The collagen gene: evidence for its evolutionary assembly by amplification of a DNA segment containing an exon of 54 bp. *Cell*, **22** (3), 887-892.
20. Exposito, J.Y., van der Rest, M., et Garrone, R. (1993) The complete intron/exon structure of Ephydatia mülleri fibrillar collagen gene suggests a mechanism for the evolution of an ancestral gene module. *J. Mol. Evol.*, **37** (3), 254-259.
21. Exposito, J.-Y., Valcourt, U., Cluzel, C., et Lethias, C. (2010) The Fibrillar Collagen Family. *IJMS*, **11** (2), 407-426.
22. Boot-Handford, R.P., et Tuckwell, D.S. (2003) Fibrillar collagen: The key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *BioEssays*, **25** (2), 142-151.
23. Lecointre, G., et Le Guyader, H. (2001) *Classification phylogénétique du vivant*, Belin.
24. Johnstone, I.L. (2000) Cuticle collagen genes. *Trends in Genetics*, **16** (1), 21-27.
25. Hulmes, D.J.S. (2008) Collagen Diversity, Synthesis and Assembly, in *Collagen* (éd.Fratzl, P.), Springer US, Boston, MA, p. 15-47.
26. Hynes, R.O., et Zhao, Q. (2000) The Evolution of Cell Adhesion. *The Journal of Cell Biology*, **150** (2), F89-F96.
27. Frantz, C., Stewart, K.M., et Weaver, V.M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, **123** (24), 4195-4200.
28. Hynes, R.O., et Naba, A. (2012) Overview of the Matrisome—An Inventory of Extracellular Matrix Constituents and Functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4** (1).
29. Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajerowski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.-W., Tewari, M., Rehfeldt, F., Speicher, D.W., et Discher, D.E. (2013) Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation. *Science*, **341** (6149), 1240104.
30. Craig, A.S., et Parry, D.A. (1981) Growth and development of collagen fibrils in immature tissues from rat and sheep. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, **212** (1186), 85-92.
31. Fertala, A., Sieron, A.L., Hojima, Y., Ganguly, A., et Prockop, D.J. (1994) Self-assembly into fibrils of collagen II by enzymic cleavage of recombinant procollagen II. Lag period, critical concentration, and morphology of fibrils differ from collagen I. *J. Biol. Chem.*, **269** (15), 11584-11589.
32. Harburger, D.S., et Calderwood, D.A. Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science*, **6**.
33. Leitinger, B., et Hohenester, E. (2007) Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology*, **26** (3), 146-155.
34. Xian, X., Gopal, S., et Couchman, J.R. (2010) Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*, **339** (1), 31-46.
35. Schmidt, S., et Friedl, P. (2010) Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res*, **339** (1), 83-92.
36. Harvey, S.J., et Miner, J.H. (2008) Revisiting the glomerular charge barrier in the molecular era: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, **17** (4), 393-398.

37. Iozzo, R.V., et Murdoch, A.D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.*, **10** (5), 598-614.
38. Schaefer, L., et Schaefer, R.M. (2010) Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.*, **339** (1), 237-246.
39. George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., et Hynes, R.O. (1993) Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*, **119** (4), 1079-1091.
40. Pankov, R., et Yamada, K.M. (2002) Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, **115** (20), 3861-3863.
41. Leiss, M., Beckmann, K., Girós, A., Costell, M., et Fässler, R. (2008) The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20** (5), 502-507.
42. Smith, M.L., Gourdon, D., Little, W.C., Kubow, K.E., Eguiluz, R.A., Luna-Morris, S., et Vogel, V. (2007) Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells. *PLoS Biol.*, **5** (10), e268.
43. Behmoaras, J., Slove, S., Seve, S., Vranckx, R., Sommer, P., et Jacob, M.-P. (2008) Differential expression of lysyl oxidases LOXL1 and LOX during growth and aging suggests specific roles in elastin and collagen fiber remodeling in rat aorta. *Rejuvenation Res*, **11** (5), 883-889.
44. Bailey, A.J., Paul, R.G., et Knott, L. (1998) Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, **106** (1), 1-56.
45. Wagenseil, J.E., et Mecham, R.P. (2007) New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, **81** (4), 229-240.
46. Bornstein, P., et Sage, E.H. (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14** (5), 608-616.
47. Wells, J.M., Gaggari, A., et Blalock, J.E. (2015) MMP generated matrikines. *Matrix Biology*, **44-46**, 122-129.
48. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., et Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, **88** (2), 277-285.
49. Bantsimba-Malanda, C., Cottet, J., Netter, P., Dumas, D., Mainard, D., Magdalou, J., et Vincourt, J.-B. (2013) Chondrocalcin is internalized by chondrocytes and triggers cartilage destruction via an interleukin-1 $\beta$ -dependent pathway. *Matrix Biol.*, **32** (7-8), 443-451.
50. Vincourt, J.-B., Etienne, S., Cottet, J., Delaunay, C., Malanda, C.B., Malanda, B., Lionneton, F., Sirveaux, F., Netter, P., Plénat, F., Mainard, D., Vignaud, J.-M., et Magdalou, J. (2010) C-propeptides of procollagens I alpha 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer Res.*, **70** (11), 4739-4748.
51. Davis, G.E., Bayless, K.J., Davis, M.J., et Meininger, G.A. (2000) Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am. J. Pathol.*, **156** (5), 1489-1498.
52. Ricard-Blum, S., et Salza, R. (2014) Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp. Dermatol.*, **23** (7), 457-463.
53. Kalson, N.S., Lu, Y., Taylor, S.H., Starborg, T., Holmes, D.F., et Kadler, K.E. (2015) A structure-based extracellular matrix expansion mechanism of fibrous tissue growth. *eLife*, **4**, e05958.
54. Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., Baynes, J.W., et TeKoppele, J.M. (2000) Effect of Collagen

- Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *J. Biol. Chem.*, **275** (50), 39027-39031.
55. Sivan, S.-S., Wachtel, E., Tsitron, E., Sakkee, N., van der Ham, F., DeGroot, J., Roberts, S., et Maroudas, A. (2008) Collagen Turnover in Normal and Degenerate Human Intervertebral Discs as Determined by the Racemization of Aspartic Acid. *J. Biol. Chem.*, **283** (14), 8796-8801.
  56. Sivan, S.S., Tsitron, E., Wachtel, E., Roughley, P.J., Sakkee, N., Ham, F. van der, DeGroot, J., Roberts, S., et Maroudas, A. (2006) Aggrecan Turnover in Human Intervertebral Disc as Determined by the Racemization of Aspartic Acid. *J. Biol. Chem.*, **281** (19), 13009-13014.
  57. Chang, J., Garva, R., Pickard, A., Yeung, C.-Y.C., Mallikarjun, V., Swift, J., Holmes, D.F., Calverley, B., Yin-hui, L., Adamson, A., Raymond-Hayling, H., Jensen, O., Shearer, T., Meng, Q.J., et Kadler, K.E. (2019) Circadian control of the secretory pathway is a central mechanism in tissue homeostasis | bioRxiv.
  58. Yeung, C.-Y.C., et Kadler, K.E. (2019) Importance of the circadian clock in tendon development, in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 133, Elsevier, p. 309-342.
  59. Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N., et Penttinen, R. (2009) Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, **61** (2), 198-223.
  60. Clark, R.A.F. (2006) Fibrin and Wound Healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **936** (1), 355-367.
  61. Schultz, G.S., et Wysocki, A. (2009) Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, **17** (2), 153-162.
  62. Meng, X.-M., Nikolic-Paterson, D.J., et Lan, H.Y. (2016) TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, **12** (6), 325-338.
  63. Nie, Y., Hu, Y., Yu, K., Zhang, D., Shi, Y., Li, Y., Sun, L., et Qian, F. (2019) Akt1 regulates pulmonary fibrosis via modulating IL-13 expression in macrophages. *Innate Immun*, 1753425919861774.
  64. Verrecchia, F., Chu, M.L., et Mauviel, A. (2001) Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J. Biol. Chem.*, **276** (20), 17058-17062.
  65. Rockey, D.C., Bell, P.D., et Hill, J.A. (2015) Fibrosis — A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med*, **372** (12), 1138-1149.
  66. Kauppila, S., Stenbäck, F., Risteli, J., Jukkola, A., et Risteli, L. (1998) Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J. Pathol.*, **186** (3), 262-268.
  67. Ikeda, K., Iyama, K., Ishikawa, N., Egami, H., Nakao, M., Sado, Y., Ninomiya, Y., et Baba, H. (2006) Loss of expression of type IV collagen alpha5 and alpha6 chains in colorectal cancer associated with the hypermethylation of their promoter region. *Am. J. Pathol.*, **168** (3), 856-865.
  68. Tanjore, H., et Kalluri, R. (2006) The Role of Type IV Collagen and Basement Membranes in Cancer Progression and Metastasis. *Am J Pathol*, **168** (3), 715-717.
  69. Ramaswamy, S., Ross, K.N., Lander, E.S., et Golub, T.R. (2003) A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.*, **33** (1), 49-54.
  70. Bissell, M.J., et Radisky, D. (2001) PUTTING TUMOURS IN CONTEXT. *Nat Rev Cancer*, **1** (1), 46-54.
  71. Butcher, D.T., Alliston, T., et Weaver, V.M. (2009) A tense situation: forcing tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*, **9** (2), 108-122.
  72. Erler, J.T., et Weaver, V.M. (2009) Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, **26** (1), 35-49.

73. Peyrol, S., Raccurt, M., Gerard, F., Gleyzal, C., Grimaud, J.A., et Sommer, P. (1997) Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *Am J Pathol*, **150** (2), 497-507.
74. Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., et Giaccia, A.J. (2009) Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell*, **15** (1), 35-44.
75. Cox, T.R., Rumney, R.M.H., Schoof, E.M., Perryman, L., Høye, A.M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N.A., Forrest, H., Evans, H.R., Huggins, I.D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., et Erler, J.T. (2015) The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature*, **522** (7554), 106-110.
76. Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., et Weaver, V.M. (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, **139** (5), 891-906.
77. Gilkes, D.M., Chaturvedi, P., Bajpai, S., Wong, C.C.-L., Wei, H., Pitcairn, S., Hubbi, M.E., Wirtz, D., et Semenza, G.L. (2013) Collagen Prolyl Hydroxylases are Essential for Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res*, **73** (11), 3285-3296.
78. Gilkes, D., Bajpai, S., Wong, C.C.-L., Chaturvedi, P., Hubbi, M.E., Wirtz, D., et Semenza, G.L. (2013) Procollagen Lysyl Hydroxylase 2 is Essential for Hypoxia-Induced Breast Cancer Metastasis. *Mol Cancer Res*, **11** (5), 456-466.
79. Morgan, E.F., Unnikrisnan, G.U., et Hussein, A.I. (2018) Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu Rev Biomed Eng*, **20**, 119-143.
80. Callaghan, T.M., et Wilhelm, K.-P. (2008) A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. *International Journal of Cosmetic Science*, **30** (5), 313-322.
81. Escoffier, C., de Rigal, J., Rochefort, A., Vasselet, R., Lévêque, J.L., et Agache, P.G. (1989) Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J. Invest. Dermatol.*, **93** (3), 353-357.
82. Lai-Fook, S.J., et Hyatt, R.E. (2000) Effects of age on elastic moduli of human lungs. *J. Appl. Physiol.*, **89** (1), 163-168.
83. Mitchell, G.F. (2008) Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage. *J. Appl. Physiol.*, **105** (5), 1652-1660.
84. Reddy, G.K. (2004) AGE-related cross-linking of collagen is associated with aortic wall matrix stiffness in the pathogenesis of drug-induced diabetes in rats. *Microvasc. Res.*, **68** (2), 132-142.
85. Thorpe, C.T., Streeter, I., Pinchbeck, G.L., Goodship, A.E., Clegg, P.D., et Birch, H.L. (2010) Aspartic acid racemization and collagen degradation markers reveal an accumulation of damage in tendon collagen that is enhanced with aging. *J. Biol. Chem.*, **285** (21), 15674-15681.
86. Callaghan, T.M., et Wilhelm, K.-P. (2008) A review of ageing and an examination of clinical methods in the assessment of ageing skin. Part I: Cellular and molecular perspectives of skin ageing. *Int J Cosmet Sci*, **30** (5), 313-322.
87. Saito, M., et Marumo, K. (2010) Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, **21** (2), 195-214.
88. Robins, S.P. (2007) Biochemistry and functional significance of collagen cross-linking: Figure 1. *Biochim. Soc. Trans.*, **35** (5), 849-852.

89. Saito, M., Fujii, K., Soshi, S., et Tanaka, T. (2006) Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation-induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int*, **17** (7), 986-995.
90. Rasmussen, M., Jacobsson, M., et Björck, L. (2003) Genome-based identification and analysis of collagen-related structural motifs in bacterial and viral proteins. *J. Biol. Chem.*, **278** (34), 32313-32316.
91. Ringli, C., Keller, B., et Ryser, U. (2001) Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, **58** (10), 1430-1441.
92. Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., et Boot-Handford, R.P. (2007) Collagens at a glance. *Journal of Cell Science*, **120** (12), 1955-1958.
93. Brodsky, B., et Persikov, A.V. (2005) Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv. Protein Chem.*, **70**, 301-339.
94. Henriksen, K., et Karsdal, M.A. (2016) Type I Collagen, in *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*, Elsevier, p. 1-11.
95. Eyre, D.R., Weis, M.A., et Wu, J.-J. (2006) Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework? *Eur Cell Mater*, **12**, 57-63.
96. Phillip, J.M., Aifuwa, I., Walston, J., et Wirtz, D. (2015) The Mechanobiology of Aging. *Annu Rev Biomed Eng*, **17**, 113-141.
97. Chopra, R.K., et Ananthanarayanan, V.S. (1982) Conformational implications of enzymatic proline hydroxylation in collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79** (23), 7180-7184.
98. Berg, R.A., et Prockop, D.J. (1973) 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** (1), 115-120.
99. Santana, A., Franzone, J.M., McGreal, C.M., Kruse, R.W., et Bober, M.B. (2018) A moderate form of osteogenesis imperfecta caused by compound heterozygous LEPRE1 mutations. *Bone Rep*, **9**, 132-135.
100. Cabral, W.A., Chang, W., Barnes, A.M., Weis, M., Scott, M.A., Leikin, S., Makareeva, E., Kuznetsova, N.V., Rosenbaum, K.N., Tifft, C.J., Bulas, D.I., Kozma, C., Smith, P.A., Eyre, D.R., et Marini, J.C. (2007) Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nat. Genet.*, **39** (3), 359-365.
101. Eyre, D.R., Weis, M., Hudson, D.M., Wu, J.-J., et Kim, L. (2011) A Novel 3-Hydroxyproline (3Hyp)-rich Motif Marks the Triple-helical C Terminus of Tendon Type I Collagen. *J. Biol. Chem.*, **286** (10), 7732-7736.
102. Weis, M.A., Hudson, D.M., Kim, L., Scott, M., Wu, J.-J., et Eyre, D.R. (2010) Location of 3-Hydroxyproline Residues in Collagen Types I, II, III, and V/XI Implies a Role in Fibril Supramolecular Assembly. *J. Biol. Chem.*, **285** (4), 2580-2590.
103. Magiorkinis, E., Beloukas, A., et Diamantis, A. (2011) Scurvy: Past, present and future. *European Journal of Internal Medicine*, **22** (2), 147-152.
104. Rappu, P., Salo, A.M., Myllyharju, J., et Heino, J. (2019) Role of prolyl hydroxylation in the molecular interactions of collagens. *Essays Biochem.*, **63** (3), 325-335.
105. Engel, J., et Prockop, D.J. (1991) The Zipper-Like Folding of Collagen Triple Helices and the Effects of Mutations that Disrupt the Zipper. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **20** (1), 137-152.
106. Canty, E.G., et Kadler, K.E. (2002) Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*, **133** (4), 979-985.

107. Lees, J.F., Tasab, M., et Bulleid, N.J. (1997) Identification of the molecular recognition sequence which determines the type-specific assembly of procollagen. *EMBO J.*, **16** (5), 908-916.
108. Bourhis, J.-M., Mariano, N., Zhao, Y., Harlos, K., Exposito, J.-Y., Jones, E.Y., Moali, C., Aghajari, N., et Hulmes, D.J.S. (2012) Structural Basis of Fibrillar Collagen Trimerization and Related Genetic Disorders. *Nat Struct Mol Biol*, **19** (10), 1031-1036.
109. Uitto, J. (1979) Collagen polymorphism: isolation and partial characterization of alpha 1(I)-trimer molecules in normal human skin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **192** (2), 371-379.
110. Jimenez, S.A., Bashey, R.I., Benditt, M., et Yankowski, R. (1977) Identification of collagen alpha1(I) trimer in embryonic chick tendons and calvaria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78** (4), 1354-1361.
111. Makareeva, E., Han, S., Vera, J.C., Sackett, D.L., Holmbeck, K., Phillips, C.L., Visse, R., Nagase, H., et Leikin, S. (2010) Carcinomas contain a matrix metalloproteinase-resistant isoform of type I collagen exerting selective support to invasion. *Cancer Res.*, **70** (11), 4366-4374.
112. Moro, L., et Smith, B.D. (1977) Identification of collagen alpha1(I) trimer and normal type I collagen in a polyoma virus-induced mouse tumor. *Arch. Biochem. Biophys.*, **182** (1), 33-41.
113. Roberts-Pilgrim, A.M., Makareeva, E., Myles, M.H., Besch-Williford, C.L., Brodeur, A.C., Walker, A.L., Leikin, S., Franklin, C.L., et Phillips, C.L. (2011) Deficient degradation of homotrimeric type I collagen,  $\alpha 1(I)3$  glomerulopathy in oim mice. *Mol. Genet. Metab.*, **104** (3), 373-382.
114. Bailey, A.J., Sims, T.J., et Knott, L. (2002) Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **34** (2), 176-182.
115. Malfait, F., Symoens, S., Coucke, P., Nunes, L., De Almeida, S., et De Paepe, A. (2006) Total absence of the alpha2(I) chain of collagen type I causes a rare form of Ehlers-Danlos syndrome with hypermobility and propensity to cardiac valvular problems. *J. Med. Genet.*, **43** (7), e36.
116. McBride, D.J., Kadler, K.E., Hojima, Y., et Prockop, D.J. (1992) Self-assembly into fibrils of a homotrimer of type I collagen. *Matrix*, **12** (4), 256-263.
117. Ferreira, L.R., Norris, K., Smith, T., Hebert, C., et Sauk, J.J. (1994) Association of Hsp47, Grp78, and Grp94 with procollagen supports the successive or coupled action of molecular chaperones. *J. Cell. Biochem.*, **56** (4), 518-526.
118. Makareeva, E., Aviles, N.A., et Leikin, S. (2011) Chaperoning osteogenesis: new protein-folding disease paradigms. *Trends in Cell Biology*, **21** (3), 168-176.
119. Bächinger, H.P., Engel, J., Bruckner, P., et Timpl, R. (1978) The Role of Cis-Trans Isomerization of Peptide Bonds in the Coil  $\rightleftharpoons$  Triple Helix Conversion of Collagen. *European Journal of Biochemistry*, **90** (3), 605-613.
120. Nakai, A., Satoh, M., Hirayoshi, K., et Nagata, K. (1992) Involvement of the stress protein HSP47 in procollagen processing in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **117** (4), 903-914.
121. Makareeva, E., et Leikin, S. (2007) Procollagen Triple Helix Assembly: An Unconventional Chaperone-Assisted Folding Paradigm. *PLoS One*, **2** (10).
122. Ishida, Y., Kubota, H., Yamamoto, A., Kitamura, A., Bächinger, H.P., et Nagata, K. (2006) Type I collagen in Hsp47-null cells is aggregated in endoplasmic reticulum and deficient in N-propeptide processing and fibrillogenesis. *Mol. Biol. Cell*, **17** (5), 2346-2355.
123. Ito, S., et Nagata, K. (2017) Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **62**, 142-151.

124. Ishida, Y., et Nagata, K. (2011) Chapter nine - Hsp47 as a Collagen-Specific Molecular Chaperone, in *Methods in Enzymology*, vol. 499, Academic Press, p. 167-182.
125. Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., et Nagata, K. (1996) Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell Biol.*, **133** (2), 469-483.
126. Sricholpech, M., Perdivara, I., Yokoyama, M., Nagaoka, H., Terajima, M., Tomer, K.B., et Yamauchi, M. (2012) Lysyl Hydroxylase 3-mediated Glucosylation in Type I Collagen: MOLECULAR LOCI AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE. *J. Biol. Chem.*, **287** (27), 22998-23009.
127. Heikkinen, J., Risteli, M., Wang, C., Latvala, J., Rossi, M., Valtavaara, M., et Myllylä, R. (2000) Lysyl hydroxylase 3 is a multifunctional protein possessing collagen glucosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, **275** (46), 36158-36163.
128. Yamauchi, M., et Sricholpech, M. (2012) Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem.*, **52**, 113-133.
129. Eyre, D.R., Weis, M.A., et Wu, J.-J. (2008) Advances in collagen cross-link analysis. *Methods*, **45** (1), 65-74.
130. Kadler, K.E., Hill, A., et Canty-Laird, E.G. (2008) Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol*, **20** (5-24), 495-501.
131. Royce, P.M., et J. Barnes, M. (1977) Comparative studies on collagen glycosylation in chick skin and bone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **498** (1), 132-142.
132. Sricholpech, M., Perdivara, I., Nagaoka, H., Yokoyama, M., Tomer, K.B., et Yamauchi, M. (2011) Lysyl Hydroxylase 3 Glucosylates Galactosylhydroxylysine Residues in Type I Collagen in Osteoblast Culture. *J Biol Chem*, **286** (11), 8846-8856.
133. Salo, A.M., Cox, H., Farndon, P., Moss, C., Grindulis, H., Risteli, M., Robins, S.P., et Myllylä, R. (2008) A connective tissue disorder caused by mutations of the lysyl hydroxylase 3 gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **83** (4), 495-503.
134. Risteli, M., Ruotsalainen, H., Salo, A.M., Sormunen, R., Sipilä, L., Baker, N.L., Lamandé, S.R., Vimpri-Kauppinen, L., et Myllylä, R. (2009) Reduction of lysyl hydroxylase 3 causes deleterious changes in the deposition and organization of extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **284** (41), 28204-28211.
135. Qi, Y., et Xu, R. (2018) Roles of PLODs in Collagen Synthesis and Cancer Progression. *Front Cell Dev Biol*, **6**.
136. Zahed-Cheikh, M., Tosello, B., Coze, S., et Gire, C. (2017) Kyphoscoliotic Type of Ehlers-Danlos Syndrome with Prenatal Stroke. *Indian Pediatr*, **54** (6), 495-497.
137. Watt, S.A., Dayal, J.H.S., Wright, S., Riddle, M., Pourreynon, C., McMillan, J.R., Kimble, R.M., Prisco, M., Gartner, U., Warbrick, E., McLean, W.H.I., Leigh, I.M., McGrath, J.A., Salas-Alanis, J.C., Tolar, J., et South, A.P. (2015) Lysyl Hydroxylase 3 Localizes to Epidermal Basement Membrane and Is Reduced in Patients with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *PLoS ONE*, **10** (9), e0137639.
138. Scietti, L., Campioni, M., et Forneris, F. (2019) SiMPLoD, a Structure-Integrated Database of Collagen Lysyl Hydroxylase (LH/PLOD) Enzyme Variants. *J. Bone Miner. Res.*
139. Stephens, D.J., et Pepperkok, R. (2002) Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells. *J. Cell. Sci.*, **115** (Pt 6), 1149-1160.
140. Bonfanti, L., et Mironov, A.A. Procollagen Traverses the Golgi Stack without Leaving the Lumen of Cisternae: Evidence for Cisternal Maturation. 11.

141. Malhotra, V., et Erlmann, P. (2011) Protein export at the ER: loading big collagens into COPII carriers. *EMBO J.*, **30** (17), 3475-3480.
142. McCaughey, J., Stevenson, N.L., Cross, S., et Stephens, D.J. (2019) ER-to-Golgi trafficking of procollagen in the absence of large carriers. *J. Cell Biol.*, **218** (3), 929-948.
143. Wilson, D.G., Phamluong, K., Li, L., Sun, M., Cao, T.C., Liu, P.S., Modrusan, Z., Sandoval, W.N., Rangell, L., Carano, R.A.D., Peterson, A.S., et Solloway, M.J. (2011) Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. *J. Cell Biol.*, **193** (5), 935-951.
144. Kadler, K.E., Hojima, Y., et Prockop, D.J. (1987) Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen C-proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *J. Biol. Chem.*, **262** (32), 15696-15701.
145. Cabral, W.A., Makareeva, E., Colige, A., Letocha, A.D., Ty, J.M., Yeowell, H.N., Pals, G., Leikin, S., et Marini, J.C. (2005) Mutations near amino end of alpha1(I) collagen cause combined osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome by interference with N-propeptide processing. *J. Biol. Chem.*, **280** (19), 19259-19269.
146. Malfait, F., Symoens, S., Goemans, N., Gyftodimou, Y., Holmberg, E., López-González, V., Mortier, G., Nampoothiri, S., Petersen, M.B., et De Paepe, A. (2013) Helical mutations in type I collagen that affect the processing of the amino-propeptide result in an Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos Syndrome overlap syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, **8**, 78.
147. Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M., et Greenspan, D.S. (1996) Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science*, **271** (5247), 360-362.
148. Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapière, C.M., et Nusgens, B. (2005) Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminopropeptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *J. Biol. Chem.*, **280** (41), 34397-34408.
149. Hopkins, D.R., Keles, S., et Greenspan, D.S. (2007) The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biology*, **26** (7), 508-523.
150. Kronenberg, D., Bruns, B.C., Moali, C., Vadon-Le Goff, S., Sterchi, E.E., Traupe, H., Böhm, M., Hulmes, D.J.S., Stöcker, W., et Becker-Pauly, C. (2010) Processing of Procollagen III by Meprins: New Players in Extracellular Matrix Assembly? *Journal of Investigative Dermatology*, **130** (12), 2727-2735.
151. Canty-Laird, E.G., Lu, Y., et Kadler, K.E. (2012) Stepwise proteolytic activation of type I procollagen to collagen within the secretory pathway of tendon fibroblasts in situ. *Biochem J*, **441** (Pt 2), 707-717.
152. Canty, E.G., Lu, Y., Meadows, R.S., Shaw, M.K., Holmes, D.F., et Kadler, K.E. (2004) Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *J. Cell Biol.*, **165** (4), 553-563.
153. Humphries, S.M., Lu, Y., Canty, E.G., et Kadler, K.E. (2008) Active Negative Control of Collagen Fibrillogenesis in Vivo INTRACELLULAR CLEAVAGE OF THE TYPE I PROCOLLAGEN PROPEPTIDES IN TENDON FIBROBLASTS WITHOUT INTRACELLULAR FIBRILS. *J. Biol. Chem.*, **283** (18), 12129-12135.
154. Colige, A., Sieron, A.L., Li, S.W., Schwarze, U., Petty, E., Wertelecki, W., Wilcox, W., Krakow, D., Cohn, D.H., Reardon, W., Byers, P.H., Lapière, C.M., Prockop, D.J., et Nusgens, B.V. (1999) Human Ehlers-Danlos syndrome type VII C and bovine dermatosparaxis are caused by mutations in the procollagen I N-proteinase gene. *Am J Hum Genet*, **65** (2), 308-317.

155. Syx, D., Guillemyn, B., Symoens, S., Sousa, A.B., Medeira, A., Whiteford, M., Hermanns-Lê, T., Coucke, P.J., Paepe, A.D., et Malfait, F. (2015) Defective Proteolytic Processing of Fibrillar Procollagens and Prodecorin Due to Biallelic BMP1 Mutations Results in a Severe, Progressive Form of Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Bone and Mineral Research*, **30** (8), 1445-1456.
156. Watson, R.B., Wallis, G.A., Holmes, D.F., Viljoen, D., Byers, P.H., et Kadler, K.E. (1992) Ehlers Danlos syndrome type VIIB. Incomplete cleavage of abnormal type I procollagen by N-proteinase in vitro results in the formation of copolymers of collagen and partially cleaved pNcollagen that are near circular in cross-section. *J. Biol. Chem.*, **267** (13), 9093-9100.
157. Suzuki, N., Labosky, P.A., Furuta, Y., Hargett, L., Dunn, R., Fogo, A.B., Takahara, K., Peters, D.M., Greenspan, D.S., et Hogan, B.L. (1996) Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by Bmp1, a mammalian gene related to Drosophila tolloid. *Development*, **122** (11), 3587-3595.
158. Pappano, W.N., Steiglitz, B.M., Scott, I.C., Keene, D.R., et Greenspan, D.S. (2003) Use of Bmp1/Tll1 Doubly Homozygous Null Mice and Proteomics To Identify and Validate In Vivo Substrates of Bone Morphogenetic Protein 1/Tolloid-Like Metalloproteinases. *Mol Cell Biol*, **23** (13), 4428-4438.
159. Kronenberg, D., Vadon-Le Goff, S., Bourhis, J.-M., Font, B., Eichenberger, D., Hulmes, D.J.S., et Moali, C. (2009) Strong cooperativity and loose geometry between CUB domains are the basis for procollagen c-proteinase enhancer activity. *J. Biol. Chem.*, **284** (48), 33437-33446.
160. Takahara, K., Kessler, E., Biniaminov, L., Brusel, M., Eddy, R.L., Jani-Sait, S., Shows, T.B., et Greenspan, D.S. (1994) Type I procollagen COOH-terminal proteinase enhancer protein: identification, primary structure, and chromosomal localization of the cognate human gene (PCOLCE). *J. Biol. Chem.*, **269** (42), 26280-26285.
161. Vadon-Le Goff, S., Kronenberg, D., Bourhis, J.-M., Bijakowski, C., Raynal, N., Ruggiero, F., Farndale, R.W., Stöcker, W., Hulmes, D.J.S., et Moali, C. (2011) Procollagen C-proteinase enhancer stimulates procollagen processing by binding to the C-propeptide region only. *J. Biol. Chem.*, **286** (45), 38932-38938.
162. Moali, C., Font, B., Ruggiero, F., Eichenberger, D., Rousselle, P., François, V., Oldberg, A., Bruckner-Tuderman, L., et Hulmes, D.J.S. (2005) Substrate-specific modulation of a multisubstrate proteinase. C-terminal processing of fibrillar procollagens is the only BMP-1-dependent activity to be enhanced by PCPE-1. *J. Biol. Chem.*, **280** (25), 24188-24194.
163. Bourhis, J.-M., Vadon-Le Goff, S., Afrache, H., Mariano, N., Kronenberg, D., Thielens, N., Moali, C., et Hulmes, D.J.S. (2013) Procollagen C-proteinase enhancer grasps the stalk of the C-propeptide trimer to boost collagen precursor maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110** (16), 6394-6399.
164. Pulido, D., Sharma, U., Vadon-Le Goff, S., Hussain, S.-A., Cordes, S., Mariano, N., Bettler, E., Moali, C., Aghajari, N., Hohenester, E., et Hulmes, D.J.S. (2018) Structural Basis for the Acceleration of Procollagen Processing by Procollagen C-Proteinase Enhancer-1. *Structure*, **26** (10), 1384-1392.e3.
165. Weiss, T., Ricard-Blum, S., Moschovich, L., Wineman, E., Mesilaty, S., et Kessler, E. (2010) Binding of procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1) to heparin/heparan sulfate: properties and role in PCPE-1 interaction with cells. *J. Biol. Chem.*, **285** (44), 33867-33874.
166. Weiss, T., Brusel, M., Rousselle, P., et Kessler, E. (2014) The NTR domain of procollagen C-proteinase enhancer-1 (PCPE-1) mediates PCPE-1 binding to syndecans-1, -2 and -4 as well as fibronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **57**, 45-53.

167. Gohar, O., Weiss, T., Wineman, E., et Kessler, E. (2019) Ascorbic Acid Promotes Procollagen C-Proteinase Enhancer 1 Expression, Secretion, and Cell Membrane Localization. *Anat Rec (Hoboken)*.
168. Bekhouche, M., Kronenberg, D., Vadon-Le Goff, S., Bijakowski, C., Lim, N.H., Font, B., Kessler, E., Colige, A., Nagase, H., Murphy, G., Hulmes, D.J.S., et Moali, C. (2010) Role of the netrin-like domain of procollagen C-proteinase enhancer-1 in the control of metalloproteinase activity. *J. Biol. Chem.*, **285** (21), 15950-15959.
169. Steiglitz, B.M., Keene, D.R., et Greenspan, D.S. (2002) PCOLCE2 encodes a functional procollagen C-proteinase enhancer (PCPE2) that is a collagen-binding protein differing in distribution of expression and post-translational modification from the previously described PCPE1. *J. Biol. Chem.*, **277** (51), 49820-49830.
170. Malecaze, F., Massoudi, D., Fournié, P., Tricoire, C., Cassagne, M., Malbouyres, M., Hulmes, D.J.S., Moali, C., et Galiacy, S.D. (2014) Upregulation of bone morphogenetic protein-1/mammalian tolloid and procollagen C-proteinase enhancer-1 in corneal scarring. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **55** (10), 6712-6721.
171. Steiglitz, B.M., Kreider, J.M., Frankenburg, E.P., Pappano, W.N., Hoffman, G.G., Meganck, J.A., Liang, X., Höök, M., Birk, D.E., Goldstein, S.A., et Greenspan, D.S. (2006) Procollagen C proteinase enhancer 1 genes are important determinants of the mechanical properties and geometry of bone and the ultrastructure of connective tissues. *Mol. Cell. Biol.*, **26** (1), 238-249.
172. Kagan, H.M., et Li, W. (2003) Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J. Cell. Biochem.*, **88** (4), 660-672.
173. Johnston, K.A., et Lopez, K.M. (2018) Lysyl oxidase in cancer inhibition and metastasis. *Cancer Letters*, **417**, 174-181.
174. Siegel, R.C., et Fu, J.C. (1976) Collagen cross-linking. Purification and substrate specificity of lysyl oxidase. *J. Biol. Chem.*, **251** (18), 5779-5785.
175. Eyre, D.R., Paz, M.A., et Gallop, P.M. (1984) Cross-Linking in Collagen and Elastin. *Annu. Rev. Biochem.*, **53** (1), 717-748.
176. Kim, J.-H., Lee, G., Won, Y., Lee, M., Kwak, J.-S., Chun, C.-H., et Chun, J.-S. (2015) Matrix cross-linking-mediated mechanotransduction promotes posttraumatic osteoarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112** (30), 9424-9429.
177. Remst, D.F.G., Blaney Davidson, E.N., Vitters, E.L., Bank, R.A., van den Berg, W.B., et van der Kraan, P.M. (2014) TGF- $\beta$  induces Lysyl hydroxylase 2b in human synovial osteoarthritic fibroblasts through ALK5 signaling. *Cell Tissue Res.*, **355** (1), 163-171.
178. Cox, T.R., Bird, D., Baker, A.-M., Barker, H.E., Ho, M.W.-Y., Lang, G., et Erler, J.T. (2013) LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res*, **73** (6), 1721-1732.
179. Trackman, P.C., Bedell-Hogan, D., Tang, J., et Kagan, H.M. (1992) Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J. Biol. Chem.*, **267** (12), 8666-8671.
180. Uzel, M.I., Scott, I.C., Babakhanlou-Chase, H., Palamakumbura, A.H., Pappano, W.N., Hong, H.H., Greenspan, D.S., et Trackman, P.C. (2001) Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.*, **276** (25), 22537-22543.
181. Eyre, D.R., Weis, M., et Rai, J. (2019) Analyses of lysine aldehyde cross-linking in collagen reveal that the mature cross-link histidinohydroxylysinonorleucine is an artifact. *J. Biol. Chem.*, **294** (16), 6578-6590.
182. Bornstein, P., Kang, A.H., et Piez, K.A. (1966) The nature and location of intramolecular cross-links in collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55** (2), 417-424.

183. Kalamajski, S., Liu, C., Tillgren, V., Rubin, K., Oldberg, Å., Rai, J., Weis, M., et Eyre, D.R. (2014) Increased C-telopeptide Cross-linking of Tendon Type I Collagen in Fibromodulin-deficient Mice. *J Biol Chem*, **289** (27), 18873-18879.
184. Terajima, M., Perdivara, I., Sricholpech, M., Deguchi, Y., Pleshko, N., Tomer, K.B., et Yamauchi, M. (2014) Glycosylation and cross-linking in bone type I collagen. *J. Biol. Chem.*, **289** (33), 22636-22647.
185. Canty, E.G., Starborg, T., Lu, Y., Humphries, S.M., Holmes, D.F., Meadows, R.S., Huffman, A., O'Toole, E.T., et Kadler, K.E. (2006) Actin filaments are required for fibropositor-mediated collagen fibril alignment in tendon. *J. Biol. Chem.*, **281** (50), 38592-38598.
186. Chapman, J.A. (1974) The Staining Pattern of Collagen Fibrils: I. an Analysis of Electron Micrographs. *Connective Tissue Research*, **2** (2), 137-150.
187. Meek, K.M., Chapman, J.A., et Hardcastle, R.A. (1979) The staining pattern of collagen fibrils. Improved correlation with sequence data. *J. Biol. Chem.*, **254** (21), 10710-10714.
188. Wood, G.C., et Keech, M.K. (1960) The formation of fibrils from collagen solutions 1. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. *Biochem J*, **75** (3), 588-598.
189. Chapman, J.A., Tzaphlidou, M., Meek, K.M., et Kadler, K.E. (1990) The collagen fibril--a model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc. Rev.*, **3** (1), 143-182.
190. Bos, K.J., Holmes, D.F., Kadler, K.E., McLeod, D., Morris, N.P., et Bishop, P.N. (2001) Axial structure of the heterotypic collagen fibrils of vitreous humour and cartilage1 Edited by W. Baumeister. *Journal of Molecular Biology*, **306** (5), 1011-1022.
191. Kadler, K.E. (2017) Fell Muir Lecture: Collagen fibril formation in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol*, **98** (1), 4-16.
192. Hulmes, D.J., et Miller, A. (1979) Quasi-hexagonal molecular packing in collagen fibrils. *Nature*, **282** (5741), 878-880.
193. Orgel, J.P.R.O., Irving, T.C., Miller, A., et Wess, T.J. (2006) Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *PNAS*, **103** (24), 9001-9005.
194. Capaldi, M.J., et Chapman, J.A. (1982) The C-terminal extrahelical peptide of type I collagen and its role in fibrillogenesis in vitro. *Biopolymers*, **21** (11), 2291-2313.
195. Holmes, D.F., Lowe, M.P., et Chapman, J.A. (1994) Vertebrate (chick) collagen fibrils formed in Vivo can exhibit a reversal in molecular polarity. *Journal of Molecular Biology*, **235** (1), 80-83.
196. Graham, H.K., Holmes, D.F., Watson, R.B., et Kadler, K.E. (2000) Identification of collagen fibril fusion during vertebrate tendon morphogenesis. The process relies on unipolar fibrils and is regulated by collagen-proteoglycan interaction1 Edited by M. F. Moody. *Journal of Molecular Biology*, **295** (4), 891-902.
197. Holmes, D.F., Lu, Y., Starborg, T., et Kadler, K.E. (2018) Collagen Fibril Assembly and Function, in *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 130, Elsevier, p. 107-142.
198. Trotter, J.A., Chapman, J.A., Kadler, K.E., et Holmes, D.F. (1998) Growth of sea cucumber collagen fibrils occurs at the tips and centers in a coordinated manner. *J. Mol. Biol.*, **284** (5), 1417-1424.
199. Hulmes, D.J., Miller, A., Parry, D.A., Piez, K.A., et Woodhead-Galloway, J. (1973) Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Mol. Biol.*, **79** (1), 137-148.
200. Young, B.B., Zhang, G., Koch, M., et Birk, D.E. (2002) The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea. *J. Cell. Biochem.*, **87** (2), 208-220.

201. Blaschke, U.K., Eikenberry, E.F., Hulmes, D.J., Galla, H.J., et Bruckner, P. (2000) Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.*, **275** (14), 10370-10378.
202. Li, Y., Lacerda, D.A., Warman, M.L., Beier, D.R., Yoshioka, H., Ninomiya, Y., Oxford, J.T., Morris, N.P., Andrikopoulos, K., et Ramirez, F. (1995) A fibrillar collagen gene, Col11a1, is essential for skeletal morphogenesis. *Cell*, **80** (3), 423-430.
203. Seegmiller, R. (1971) A NEW CHONDRODYSTROPHIC MUTANT IN MICE: Electron Microscopy of Normal and Abnormal Chondrogenesis. *The Journal of Cell Biology*, **48** (3), 580-593.
204. Wenstrup, R.J., Florer, J.B., Brunskill, E.W., Bell, S.M., Chervoneva, I., et Birk, D.E. (2004) Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J. Biol. Chem.*, **279** (51), 53331-53337.
205. Birk, D.E., Fitch, J.M., Babiarz, J.P., Doane, K.J., et Linsenmayer, T.F. (1990) Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J. Cell. Sci.*, **95** ( Pt 4), 649-657.
206. Kalamajski, S., Aspberg, A., et Oldberg, A. (2007) The decorin sequence SYRIADTNIT binds collagen type I. *J. Biol. Chem.*, **282** (22), 16062-16067.
207. Keene, D.R., San Antonio, J.D., Mayne, R., McQuillan, D.J., Sarris, G., Santoro, S.A., et Iozzo, R.V. (2000) Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J. Biol. Chem.*, **275** (29), 21801-21804.
208. Kalamajski, S., et Oldberg, A. (2009) Homologous sequence in lumican and fibromodulin leucine-rich repeat 5-7 competes for collagen binding. *J. Biol. Chem.*, **284** (1), 534-539.
209. Kalamajski, S., et Oldberg, A. (2007) Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. *J. Biol. Chem.*, **282** (37), 26740-26745.
210. Kalamajski, S., Bihan, D., Bonna, A., Rubin, K., et Farndale, R.W. (2016) Fibromodulin Interacts with Collagen Cross-linking Sites and Activates Lysyl Oxidase. *J. Biol. Chem.*, **291** (15), 7951-7960.
211. Kalamajski, S., Aspberg, A., Lindblom, K., Heinegård, D., et Oldberg, A. (2009) Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium and promotes osteoblast collagen mineralization. *Biochem. J.*, **423** (1), 53-59.
212. Kalamajski, S., et Oldberg, A. (2010) The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.*, **29** (4), 248-253.
213. Rada, J.A., Cornuet, P.K., et Hassell, J.R. (1993) Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp. Eye Res.*, **56** (6), 635-648.
214. Maccarana, M., Kalamajski, S., Kongsgaard, M., Magnusson, S.P., Oldberg, A., et Malmström, A. (2009) Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and an altered collagen structure in skin. *Mol. Cell. Biol.*, **29** (20), 5517-5528.
215. Kuc, I.M., et Scott, P.G. (1997) Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect. Tissue Res.*, **36** (4), 287-296.
216. Nareyeck, G., Seidler, D.G., Troyer, D., Rauterberg, J., Kresse, H., et Schönherr, E. (2004) Differential interactions of decorin and decorin mutants with type I and type VI collagens. *Eur. J. Biochem.*, **271** (16), 3389-3398.
217. Wiberg, C., Klatt, A.R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J.F., Heinegård, D., et Mörgelin, M. (2003) Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J. Biol. Chem.*, **278** (39), 37698-37704.

218. Zvackova, I., Matalova, E., et Lesot, H. (2017) Regulators of Collagen Fibrillogenesis during Molar Development in the Mouse. *Front Physiol*, **8**, 554.
219. Zofkova, I. (2015) Bone Tissue as a Systemic Endocrine Regulator. **64**, 7.
220. Bonucci, E. (2012) Bone mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **17**, 100-128.
221. Thorogood, P.V., et Hinchliffe, J.R. (1975) An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb. *J Embryol Exp Morphol*, **33** (3), 581-606.
222. Dessau, W., von der Mark, H., von der Mark, K., et Fischer, S. (1980) Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis. *J Embryol Exp Morphol*, **57**, 51-60.
223. Kosher, R.A., Kulyk, W.M., et Gay, S.W. (1986) Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol*, **102** (4), 1151-1156.
224. Linsenmayer, T.F. (1974) Temporal and spatial transitions in collagen types during embryonic chick limb development. II. Comparison of the embryonic cartilage collagen molecule with that from adult cartilage. *Dev. Biol.*, **40** (2), 372-377.
225. Linsenmayer, T.F., Trelstad, R.L., Toole, B.P., et Gross, J. (1973) The collagen of osteogenic cartilage in the embryonic chick. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52** (3), 870-876.
226. Swiderski, R.E., et Solursh, M. (1992) Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton. *Dev. Dyn.*, **194** (2), 118-127.
227. Mundlos, S., Meyer, R., Yamada, Y., et Zabel, B. (1991) Distribution of cartilage proteoglycan (aggrecan) core protein and link protein gene expression during human skeletal development. *Matrix*, **11** (5), 339-346.
228. Hodax, J.K., Quintos, J.B., Gruppuso, P.A., Chen, Q., Desai, S., et Jayasuriya, C.T. (2019) Aggrecan is required for chondrocyte differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells. *PLoS ONE*, **14** (6), e0218399.
229. DeLise, A.M., Fischer, L., et Tuan, R.S. (2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthr. Cartil.*, **8** (5), 309-334.
230. Tai, K., Dao, M., Suresh, S., Palazoglu, A., et Ortiz, C. (2007) Nanoscale heterogeneity promotes energy dissipation in bone. *Nature Mater*, **6** (6), 454-462.
231. Fleisch, H., Russell, R.G.G., et Straumann, F. (1966) Effect of Pyrophosphate on Hydroxyapatite and Its Implications in Calcium Homeostasis. *Nature*, **212** (5065), 901-903.
232. Buchet, R., Pikula, S., Magne, D., et Mebarek, S. (2013) Isolation and Characteristics of Matrix Vesicles, in *Phosphatase Modulators*, vol. 1053, Humana Press, Totowa, NJ, p. 115-124.
233. Golub, E.E. (2011) Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol*, **33** (5), 409-417.
234. Golub, E.E., et Boesze-Battaglia, K. (2007) The role of alkaline phosphatase in mineralization: *Current Opinion in Orthopaedics*, **18** (5), 444-448.
235. Beck, G.R. (2003) Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.*, **90** (2), 234-243.
236. Weiss, M.J., Cole, D.E., Ray, K., Whyte, M.P., Lafferty, M.A., Mulivor, R., et Harris, H. (1989) First identification of a gene defect for hypophosphatasia: evidence that alkaline phosphatase acts in skeletal mineralization. *Connect. Tissue Res.*, **21** (1-4), 99-104; discussion 104-106.
237. Fedde, K.N., Blair, L., Silverstein, J., Coburn, S.P., Ryan, L.M., Weinstein, R.S., Waymire, K., Narisawa, S., Millán, J.L., Macgregor, G.R., et Whyte, M.P. (1999)

- Alkaline Phosphatase Knock-Out Mice Recapitulate the Metabolic and Skeletal Defects of Infantile Hypophosphatasia. *J Bone Miner Res*, **14** (12), 2015-2026.
238. Zhou, X., Cui, Y., Zhou, X., et Han, J. (2012) Phosphate/pyrophosphate and MV-related proteins in mineralisation: discoveries from mouse models. *Int. J. Biol. Sci.*, **8** (6), 778-790.
239. Magne, D., Bluteau, G., Faucheux, C., Palmer, G., Vignes-Colombeix, C., Pilet, P., Rouillon, T., Caverzasio, J., Weiss, P., Daculsi, G., et Guicheux, J. (2003) Phosphate Is a Specific Signal for ATDC5 Chondrocyte Maturation and Apoptosis-Associated Mineralization: Possible Implication of Apoptosis in the Regulation of Endochondral Ossification. *Journal of Bone and Mineral Research*, **18** (8), 1430-1442.
240. Fujita, T., Meguro, T., Izumo, N., Yasutomi, C., Fukuyama, R., Nakamuta, H., et Koida, M. (2001) Phosphate Stimulates Differentiation and Mineralization of the Chondroprogenitor Clone ATDC5. *The Japanese Journal of Pharmacology*, **85** (3), 278-281.
241. Fujita, T., Izumo, N., Fukuyama, R., Meguro, T., Nakamuta, H., Kohno, T., et Koida, M. (2001) Phosphate Provides an Extracellular Signal That Drives Nuclear Export of Runx2/Cbfa1 in Bone Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **280** (1), 348-352.
242. George R. Beck, J. (2000) Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97** (15), 8352.
243. Bingham, P.J., et Raisz, L.G. (1974) Bone growth in organ culture: Effects of phosphate and other nutrients on bone and cartilage. *Calc. Tiss Res.*, **14** (1), 31-48.
244. Addison, W.N., Azari, F., Sørensen, E.S., Kaartinen, M.T., et McKee, M.D. (2007) Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *J. Biol. Chem.*, **282** (21), 15872-15883.
245. Azpiazu, D., Gonzalo, S., González-Parra, E., Egado, J., et Villa-Bellosta, R. (2018) Role of pyrophosphate in vascular calcification in chronic kidney disease. *Nefrología*, **38** (3), 250-257.
246. Jin, H., Hilaire, C.St., Huang, Y., Yang, D., Dmitrieva, N.I., Negro, A., Schwartzbeck, R., Liu, Y., Yu, Z., Walts, A., Davaine, J.-M., Lee, D.-Y., Donahue, D., Hsu, K.S., Chen, J., Cheng, T., Gahl, W., Chen, G., et Boehm, M. (2016) Increased activity of TNAP compensates for reduced adenosine production and promotes ectopic calcification in the genetic disease ACDC. *Sci Signal*, **9** (458), ra121.
247. Graff, R.D., Picher, M., et Lee, G.M. (2003) Extracellular nucleotides, cartilage stress, and calcium crystal formation: *Current Opinion in Rheumatology*, **15** (3), 315-320.
248. Lohmander, S., et Hjerpe, A. (1975) Proteoglycans of mineralizing rib and epiphyseal cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **404** (1), 93-109.
249. Mochida, Y., Duarte, W.R., Tanzawa, H., Paschalis, E.P., et Yamauchi, M. (2003) Decorin modulates matrix mineralization in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305** (1), 6-9.
250. Mochida, Y., Parisuthiman, D., Pornprasertsuk-Damrongsri, S., Atsawasuwon, P., Sricholpech, M., Boskey, A.L., et Yamauchi, M. (2009) Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization. *Matrix Biology*, **28** (1), 44-52.
251. Corsi, A., Xu, T., Chen, X.-D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R.V., Eichstetter, I., Robey, P.G., Bianco, P., et Young, M.F. (2002) 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*, **17** (7), 1180-1189.

252. Parisuthiman, D., Mochida, Y., Duarte, W.R., et Yamauchi, M. (2005) Biglycan Modulates Osteoblast Differentiation and Matrix Mineralization. *J Bone Miner Res*, **20** (10), 1878-1886.
253. Boskey, A.L., Spevak, L., Doty, S.B., et Rosenberg, L. (1997) Effects of bone CS-proteoglycans, DS-decorin, and DS-biglycan on hydroxyapatite formation in a gelatin gel. *Calcif. Tissue Int.*, **61** (4), 298-305.
254. Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W.T., Sørensen, E.S., et Boskey, A.L. (2005) Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif. Tissue Int.*, **77** (1), 45-54.
255. Hauschka, P.V., et Wians, F.H. (1989) Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat. Rec.*, **224** (2), 180-188.
256. Wen, L., Chen, J., Duan, L., et Li, S. (2018) Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health. *Mol Med Rep*, **18** (1), 3-15.
257. Wallin, R., Schurgers, L.J., et Loeser, R.F. (2010) Biosynthesis of the vitamin K-dependent matrix Gla protein (MGP) in chondrocytes: a fetuin-MGP protein complex is assembled in vesicles shed from normal but not from osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.*, **18** (8), 1096-1103.
258. Poundarik, A.A., Boskey, A., Gundberg, C., et Vashishth, D. (2018) Biomolecular regulation, composition and nanoarchitecture of bone mineral. *Sci Rep*, **8**.
259. Bailey, S., Karsenty, G., Gundberg, C., et Vashishth, D. (2017) Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1409** (1), 79-84.
260. Yamauchi, M., et Katz, E.P. (1993) The post-translational chemistry and molecular packing of mineralizing tendon collagens. *Connect. Tissue Res.*, **29** (2), 81-98.
261. Landis, W.J., et Jacquet, R. (2013) Association of Calcium and Phosphate Ions with Collagen in the Mineralization of Vertebrate Tissues. *Calcif Tissue Int*, **93** (4), 329-337.
262. McNally, E.A., Schwarcz, H.P., Botton, G.A., et Arsenaault, A.L. (2012) A Model for the Ultrastructure of Bone Based on Electron Microscopy of Ion-Milled Sections. *PLoS ONE*, **7** (1), e29258.
263. Alini, M., Carey, D., Hirata, S., Grynblas, M.D., Pidoux, I., et Poole, A.R. (1994) Cellular and matrix changes before and at the time of calcification in the growth plate studied in vitro: arrest of type X collagen synthesis and net loss of collagen when calcification is initiated. *J. Bone Miner. Res.*, **9** (7), 1077-1087.
264. Uzawa, K., Grzesik, W.J., Nishiura, T., Kuznetsov, S.A., Robey, P.G., Brenner, D.A., et Yamauchi, M. (1999) Differential Expression of Human Lysyl Hydroxylase Genes, Lysine Hydroxylation, and Cross-Linking of Type I Collagen During Osteoblastic Differentiation In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, **14** (8), 1272-1280.
265. Pornprasertsuk, S., Duarte, W.R., Mochida, Y., et Yamauchi, M. (2005) Overexpression of lysyl hydroxylase-2b leads to defective collagen fibrillogenesis and matrix mineralization. *J. Bone Miner. Res.*, **20** (1), 81-87.
266. Choi, H.U., Tang, L.H., Johnson, T.L., Pal, S., Rosenberg, L.C., Reiner, A., et Poole, A.R. (1983) Isolation and characterization of a 35,000 molecular weight subunit fetal cartilage matrix protein. *J. Biol. Chem.*, **258** (1), 655-661.
267. Poole, A.R., Pidoux, I., Reiner, A., Choi, H., et Rosenberg, L.C. (1984) The association of a newly discovered protein, called chondrocalcin, with cartilage calcification. *Acta. Biol. Hung.*, **35** (2-4), 143-149.
268. Poole, A.R., Pidoux, I., Reiner, A., Choi, H., et Rosenberg, L.C. (1984) Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. *J. Cell Biol.*, **98** (1), 54-65.

269. Hinek, A., Reiner, A., et Poole, A.R. (1987) The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). *J. Cell Biol.*, **104** (5), 1435-1441.
270. Robin Poole, A., Matsui, Y., Hinek, A., et Lee, E.R. (1989) Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat. Rec.*, **224** (2), 167-179.
271. Livne, E., Oliver, C., Leapman, R.D., Rosenberg, L.C., Poole, A.R., et Silbermann, M. (1987) Age-related changes in the role of matrix vesicles in the mandibular condylar cartilage. *J. Anat.*, **150**, 61-74.
272. Niyibizi, C., Wu, J.-J., et Eyre, D.R. (1987) The carboxypropeptide trimer of type II collagen is a prominent component of immature cartilages and intervertebral-disc tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **916** (3), 493-499.
273. Kirsch, T., et Pfäffle, M. (1992) Selective binding of anchorin CII (annexin V) to type II and X collagen and to chondrocalcin (C-propeptide of type II collagen). Implications for anchoring function between matrix vesicles and matrix proteins. *FEBS Lett.*, **310** (2), 143-147.
274. Van der Rest, M., Rosenberg, L.C., Olsen, B.R., et Poole, A.R. (1986) Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. *Biochem J*, **237** (3), 923-925.
275. Conrozier, T., Poole, A.R., Ferrand, F., Mathieu, P., Vincent, F., Piperno, M., Verret, C., Ionescu, M., et Vignon, E. (2008) Serum concentrations of type II collagen biomarkers (C2C, C1, 2C and CPII) suggest different pathophysiologies in patients with hip osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **26** (3), 430-435.
276. Sophia Fox, A.J., Bedi, A., et Rodeo, S.A. (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*, **1** (6), 461-468.
277. Hubert, J., Hawellek, T., Moe, M., Hischke, S., Krause, M., Rolvien, T., Schmidt, T., Rütther, W., et Niemeier, A. (2018) Labral calcification in end-stage osteoarthritis of the hip correlates with pain and clinical function. *J. Orthop. Res.*, **36** (4), 1248-1255.
278. WHO | Chronic rheumatic conditions. *WHO*.
279. Yoshimi, M., Miyaishi, O., Nakamura, S., Shirasawa, S.-I., Kamochi, H., Miyatani, S., Ikawa, Y., et Shinomura, T. (2005) Identification of genes preferentially expressed in articular cartilage by suppression subtractive hybridization. *J. Med. Dent. Sci.*, **52** (4), 203-211.
280. Wilson, R., Diseberg, A.F., Gordon, L., Zivkovic, S., Tatarczuch, L., Mackie, E.J., Gorman, J.J., et Bateman, J.F. (2010) Comprehensive profiling of cartilage extracellular matrix formation and maturation using sequential extraction and label-free quantitative proteomics. *Mol. Cell Proteomics*, **9** (6), 1296-1313.
281. Brachvogel, B., Zaucke, F., Dave, K., Norris, E.L., Stermann, J., Dayakli, M., Koch, M., Gorman, J.J., Bateman, J.F., et Wilson, R. (2013) Comparative proteomic analysis of normal and collagen IX null mouse cartilage reveals altered extracellular matrix composition and novel components of the collagen IX interactome. *J. Biol. Chem.*, **288** (19), 13481-13492.
282. Riffault, M., Moulin, D., Grossin, L., Mainard, D., Magdalou, J., et Vincourt, J.-B. (2015) Label-free relative quantification applied to LC-MALDI acquisition for rapid analysis of chondrocyte secretion modulation. *J Proteomics*, **114**, 263-273.
283. Tillgren, V., Ho, J.C.S., Önnarfjord, P., et Kalamajski, S. (2015) The novel small leucine-rich protein chondroadherin-like (CHADL) is expressed in cartilage and modulates chondrocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, **290** (2), 918-925.
284. Schwarz, M.L., Witt, S.H., Schneider-Wald, B., Buettner, A., Witt, C.C., Stoeve, J., Scharf, H.-P., Labeit, S., et Milz, S. (2008) Titin expression in human articular cartilage

- and cultured chondrocytes: a novel component in articular cartilage biomechanical sensing? *Biomed. Pharmacother.*, **62** (5), 339-347.
285. Wu, H.-C., Wang, T.-W., Sun, J.-S., Lee, Y.-H., Shen, M.-H., Tsai, Z.-R., Chen, C.-Y., et Hsu, H.-C. (2016) Development and Characterization of a Bioinspired Bone Matrix with Aligned Nanocrystalline Hydroxyapatite on Collagen Nanofibers. *Materials (Basel)*, **9** (3).
286. Mithieux, S.M., Rasko, J.E.J., et Weiss, A.S. (2004) Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers. *Biomaterials*, **25** (20), 4921-4927.
287. Hoshiba, T., Chen, G., Endo, C., Maruyama, H., Wakui, M., Nemoto, E., Kawazoe, N., et Tanaka, M. (2016) Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation. *Stem Cells Int*, **2016**, 6397820.
288. Schnabel, M., Marlovits, S., Eckhoff, G., Fichtel, I., Gotzen, L., Vécsei, V., et Schlegel, J. (2002) Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthr. Cartil.*, **10** (1), 62-70.
289. Stokes, D.G., Liu, G., Coimbra, I.B., Piera-Velazquez, S., Crawl, R.M., et Jiménez, S.A. (2002) Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum.*, **46** (2), 404-419.
290. von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H., et Müller, P. (1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, **267** (5611), 531-532.
291. Baker, B.M., et Chen, C.S. (2012) Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci*, **125** (13), 3015-3024.
292. Smeriglio, P., Lai, J.H., Yang, F., et Bhutani, N. (2015) 3D Hydrogel Scaffolds for Articular Chondrocyte Culture and Cartilage Generation. *J Vis Exp*, (104).
293. Kolettas, E., Buluwela, L., Bayliss, M.T., et Muir, H.I. (1995) Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *J. Cell. Sci.*, **108 ( Pt 5)**, 1991-1999.
294. Häuselmann, H.J., Masuda, K., Hunziker, E.B., Neidhart, M., Mok, S.S., Michel, B.A., et Thonar, E.J. (1996) Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am. J. Physiol.*, **271** (3 Pt 1), C742-752.
295. El-Serafi, A.T., Wilson, D.I., Roach, H.I., et Oreffo, R.O. (2011) Developmental plasticity of human foetal femur-derived cells in pellet culture: self assembly of an osteoid shell around a cartilaginous core. *Eur Cell Mater*, **21**, 558-567.
296. Schaller, S., Henriksen, K., Hoegh-Andersen, P., Søndergaard, B.C., Sumer, E.U., Tanko, L.B., Qvist, P., et Karsdal, M.A. (2005) *In Vitro*, *Ex Vivo*, and *In Vivo* Methodological Approaches for Studying Therapeutic Targets of Osteoporosis and Degenerative Joint Diseases: How Biomarkers Can Assist? *ASSAY and Drug Development Technologies*, **3** (5), 553-580.
297. Schutze, N., Noth, U., Schneidereit, J., Hendrich, C., et Jakob, F. (2005) Differential expression of CCN-family members in primary human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. *Cell Commun. Signal*, **3** (1), 5.
298. Finger, F., Schörle, C., Soder, S., Zien, A., Goldring, M.B., et Aigner, T. (2004) Phenotypic characterization of human chondrocyte cell line C-20/A4: a comparison between monolayer and alginate suspension culture. *Cells Tissues Organs (Print)*, **178** (2), 65-77.

299. Finger, F., Schörle, C., Zien, A., Gebhard, P., Goldring, M.B., et Aigner, T. (2003) Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/12. *Arthritis Rheum.*, **48** (12), 3395-3403.
300. Czekanska, E.M., Stoddart, M.J., Richards, R.G., et Hayes, J.S. (2012) In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater*, **24**, 1-17.
301. Reynolds, J.J. (1967) The synthesis of collagen by chick bone rudiments in vitro. *Exp. Cell Res.*, **47** (1), 42-48.
302. Garrett, I.R. (2003) Assessing Bone Formation Using Mouse Calvarial Organ Cultures, in *Bone Research Protocols*, vol. 80, Humana Press, New Jersey, p. 183-198.
303. Billingham, R.C., Wu, W., Ionescu, M., Reiner, A., Dahlberg, L., Chen, J., van Wart, H., et Poole, A.R. (2000) Comparison of the degradation of type II collagen and proteoglycan in nasal and articular cartilages induced by interleukin-1 and the selective inhibition of type II collagen cleavage by collagenase. *Arthritis Rheum.*, **43** (3), 664-672.
304. Kobayashi, M., Squires, G.R., Mousa, A., Tanzer, M., Zukor, D.J., Antoniou, J., Feige, U., et Poole, A.R. (2005) Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.*, **52** (1), 128-135.
305. Chevalier, X., et Tyler, J.A. (1996) Production of binding proteins and role of the insulin-like growth factor I binding protein 3 in human articular cartilage explants. *Br. J. Rheumatol.*, **35** (6), 515-522.
306. Tickle, C. (2004) The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mechanisms of Development*, **121** (9), 1019-1029.
307. Belluoccio, D., Wilson, R., Thornton, D.J., Wallis, T.P., Gorman, J.J., et Bateman, J.F. (2006) Proteomic analysis of mouse growth plate cartilage. *Proteomics*, **6** (24), 6549-6553.
308. Guo, D., Tan, W., Wang, F., Lv, Z., Hu, J., Lv, T., Chen, Q., Gu, X., Wan, B., et Zhang, Z. (2008) Proteomic analysis of human articular cartilage: identification of differentially expressed proteins in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, **75** (4), 439-444.
309. Kuyinu, E.L., Narayanan, G., Nair, L.S., et Laurencin, C.T. (2016) Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res*, **11**, 19.
310. Kudelko, M., Chan, C.W.L., Sharma, R., Yao, Q., Lau, E., Chu, I.K., Cheah, K.S.E., Tanner, J.A., et Chan, D. (2016) Label-Free Quantitative Proteomics Reveals Survival Mechanisms Developed by Hypertrophic Chondrocytes under ER Stress. *Journal of Proteome Research*, **15** (1), 86-99.
311. Terajima, M., Taga, Y., Cabral, W.A., Liu, Y., Nagasawa, M., Sumida, N., Kayashima, Y., Chandrasekaran, P., Han, L., Maeda, N., Perdivara, I., Hattori, S., Marini, J.C., et Yamauchi, M. (2019) Cyclophilin B control of lysine post-translational modifications of skin type I collagen. *PLoS Genet.*, **15** (6), e1008196.
312. Ichimura, S., Wu, J.J., et Eyre, D.R. (2000) Two-dimensional peptide mapping of cross-linked type IX collagen in human cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **378** (1), 33-39.
313. Dreisewerd, K., Rohlfing, A., Spottke, B., Urbanke, C., et Henkel, W. (2004) Characterization of whole fibril-forming collagen proteins of types I, III, and V from fetal calf skin by infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **76** (13), 3482-3491.
314. Mazzorana, M., Snellman, A., Kivirikko, K.I., van der Rest, M., et Pihlajaniemi, T. (1996) Involvement of prolyl 4-hydroxylase in the assembly of trimeric minicollagen XII. Study in a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.*, **271** (46), 29003-29008.
315. Lamberg, A., Helaakoski, T., Myllyharju, J., Peltonen, S., Notbohm, H., Pihlajaniemi, T., et Kivirikko, K.I. (1996) Characterization of human type III collagen expressed in a

- baculovirus system. Production of a protein with a stable triple helix requires coexpression with the two types of recombinant prolyl 4-hydroxylase subunit. *J. Biol. Chem.*, **271** (20), 11988-11995.
316. Fichard, A., Tillet, E., Delacoux, F., Garrone, R., et Ruggiero, F. (1997) Human recombinant alpha1(V) collagen chain. Homotrimeric assembly and subsequent processing. *J. Biol. Chem.*, **272** (48), 30083-30087.
317. Steiglitiz, B.M., Kreider, J.M., Frankenburg, E.P., Pappano, W.N., Hoffman, G.G., Meganck, J.A., Liang, X., Höök, M., Birk, D.E., Goldstein, S.A., et Greenspan, D.S. (2006) Procollagen C proteinase enhancer 1 genes are important determinants of the mechanical properties and geometry of bone and the ultrastructure of connective tissues. *Mol. Cell. Biol.*, **26** (1), 238-249.
318. Fernandes, R.J., Schmid, T.M., et Eyre, D.R. (2003) Assembly of collagen types II, IX and XI into nascent hetero-fibrils by a rat chondrocyte cell line. *Eur. J. Biochem.*, **270** (15), 3243-3250.
319. Fernandes, R.J., Schmid, T.M., Harkey, M.A., et Eyre, D.R. (1997) Incomplete processing of type II procollagen by a rat chondrosarcoma cell line. *Eur. J. Biochem.*, **247** (2), 620-624.
320. Fernandes, R.J., Weis, M., Scott, M.A., Seegmiller, R.E., et Eyre, D.R. (2007) Collagen XI chain misassembly in cartilage of the chondrodysplasia (cho) mouse. *Matrix Biol.*, **26** (8), 597-603.
321. Atsumi, T., Miwa, Y., Kimata, K., et Ikawa, Y. (1990) A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ. Dev.*, **30** (2), 109-116.
322. Shukunami, C., Shigeno, C., Atsumi, T., Ishizeki, K., Suzuki, F., et Hiraki, Y. (1996) Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J. Cell Biol.*, **133** (2), 457-468.
323. Barnes, M.J. (1975) Function of ascorbic acid in collagen metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **258**, 264-277.
324. Hering, T.M., Kollar, J., Huynh, T.D., Varelas, J.B., et Sandell, L.J. (1994) Modulation of extracellular matrix gene expression in bovine high-density chondrocyte cultures by ascorbic acid and enzymatic resuspension. *Arch. Biochem. Biophys.*, **314** (1), 90-98.
325. Sullivan, T.A., Uschmann, B., Hough, R., et Leboy, P.S. (1994) Ascorbate modulation of chondrocyte gene expression is independent of its role in collagen secretion. *J. Biol. Chem.*, **269** (36), 22500-22506.
326. Altaf, F.M., Hering, T.M., Kazmi, N.H., Yoo, J.U., et Johnstone, B. (2006) Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater*, **12**, 64-69; discussion 69-70.
327. Temu, T.M., Wu, K.-Y., Gruppuso, P.A., et Phornphutkul, C. (2010) The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **299** (2), E325-334.
328. Akiyama, H., Shigeno, C., Hiraki, Y., Shukunami, C., Kohno, H., Akagi, M., Konishi, J., et Nakamura, T. (1997) Cloning of a mouse smoothed cDNA and expression patterns of hedgehog signalling molecules during chondrogenesis and cartilage differentiation in clonal mouse EC cells, ATDC5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235** (1), 142-147.
329. Shukunami, C., Akiyama, H., Nakamura, T., et Hiraki, Y. (2000) Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *FEBS Lett.*, **469** (1), 83-87.

330. Yao, Y., et Wang, Y. (2013) ATDC5: an excellent in vitro model cell line for skeletal development. *J. Cell. Biochem.*, **114** (6), 1223-1229.
331. Tare, R.S., Howard, D., Pound, J.C., Roach, H.I., et Oreffo, R.O.C. (2005) Tissue engineering strategies for cartilage generation—Micromass and three dimensional cultures using human chondrocytes and a continuous cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **333** (2), 609-621.
332. Chen, L., Fink, T., Ebbesen, P., et Zachar, V. (2006) Optimized chondrogenesis of ATDC5 cells through sequential regulation of oxygen conditions. *Tissue Eng.*, **12** (3), 559-567.
333. Newton, P.T., Staines, K.A., Spevak, L., Boskey, A.L., Teixeira, C.C., Macrae, V.E., Canfield, A.E., et Farquharson, C. (2012) Chondrogenic ATDC5 cells: an optimised model for rapid and physiological matrix mineralisation. *Int. J. Mol. Med.*, **30** (5), 1187-1193.
334. Denison, T.A., Koch, C.F., Shapiro, I.M., Schwartz, Z., et Boyan, B.D. (2009) Inorganic phosphate modulates responsiveness to 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in chondrogenic ATDC5 cells. *J. Cell. Biochem.*, **107** (1), 155-162.
335. Guicheux, J., Palmer, G., Shukunami, C., Hiraki, Y., Bonjour, J.P., et Caverzasio, J. (2000) A novel in vitro culture system for analysis of functional role of phosphate transport in endochondral ossification. *Bone*, **27** (1), 69-74.
336. Wu, B., Durisin, E.K., Decker, J.T., Ural, E.E., Shea, L.D., et Coleman, R.M. (2017) Phosphate Regulates Chondrogenesis in a Biphasic and Maturation-Dependent Manner. *Differentiation*, **95**, 54-62.
337. Julien, M., Magne, D., Masson, M., Rolli-Derkinderen, M., Chassande, O., Cario-Toumaniantz, C., Cherel, Y., Weiss, P., et Guicheux, J. (2007) Phosphate stimulates matrix Gla protein expression in chondrocytes through the extracellular signal regulated kinase signaling pathway. *Endocrinology*, **148** (2), 530-537.
338. Palmer, G., Guicheux, J., Bonjour, J.-P., et Caverzasio, J. (2000) Transforming Growth Factor- $\beta$  Stimulates Inorganic Phosphate Transport and Expression of the Type III Phosphate Transporter Glvr-1 in Chondrogenic ATDC5 Cells. *Endocrinology*, **141** (6), 2236-2243.
339. Omoteyama, K., et Takagi, M. (2010) The effects of Sp7/Osterix gene silencing in the chondroprogenitor cell line, ATDC5. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **403** (2), 242-246.
340. Wahl, M., Shukunami, C., Heinzmann, U., Hamajima, K., Hiraki, Y., et Imai, K. (2004) Transcriptome analysis of early chondrogenesis in ATDC5 cells induced by bone morphogenetic protein 4. *Genomics*, **83** (1), 45-58.
341. Chen, L., Fink, T., Zhang, X.-Y., Ebbesen, P., et Zachar, V. (2005) Quantitative transcriptional profiling of ATDC5 mouse progenitor cells during chondrogenesis. *Differentiation*, **73** (7), 350-363.
342. Boot-Handford, R.P., Tuckwell, D.S., Plumb, D.A., Rock, C.F., et Poulosom, R. (2003) A novel and highly conserved collagen (pro( $\alpha$ 1)(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J. Biol. Chem.*, **278** (33), 31067-31077.
343. Scott, I.C., Imamura, Y., Pappano, W.N., Troedel, J.M., Recklies, A.D., Roughley, P.J., et Greenspan, D.S. (2000) Bone morphogenetic protein-1 processes probiglycan. *J. Biol. Chem.*, **275** (39), 30504-30511.
344. Amano, S., Scott, I.C., Takahara, K., Koch, M., Champlaud, M.F., Gerecke, D.R., Keene, D.R., Hudson, D.L., Nishiyama, T., Lee, S., Greenspan, D.S., et Burgeson, R.E. (2000) Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma 2 chain. *J. Biol. Chem.*, **275** (30), 22728-22735.

345. Rattenholl, A., Pappano, W.N., Koch, M., Keene, D.R., Kadler, K.E., Sasaki, T., Timpl, R., Burgeson, R.E., Greenspan, D.S., et Bruckner-Tuderman, L. (2002) Proteinases of the bone morphogenetic protein-1 family convert procollagen VII to mature anchoring fibril collagen. *J. Biol. Chem.*, **277** (29), 26372-26378.
346. Imamura, Y., Steiglitz, B.M., et Greenspan, D.S. (1998) Bone morphogenetic protein-1 processes the NH<sub>2</sub>-terminal propeptide, and a furin-like proprotein convertase processes the COOH-terminal propeptide of pro- $\alpha$ 1(V) collagen. *J. Biol. Chem.*, **273** (42), 27511-27517.
347. Aricescu, A.R., Lu, W., et Jones, E.Y. (2006) A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62** (Pt 10), 1243-1250.
348. Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A., et Prockop, D.J. (2004) An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.*, **329** (1), 77-84.
349. Guibert, M., Gasser, A., Kempf, H., et Bianchi, A. (2017) Fibroblast-growth factor 23 promotes terminal differentiation of ATDC5 cells. *PLoS ONE*, **12** (4), e0174969.
350. Riffault, M., Moulin, D., Grossin, L., Mainard, D., Magdalou, J., et Vincourt, J.-B. (2015) Label-free relative quantification applied to LC-MALDI acquisition for rapid analysis of chondrocyte secretion modulation. *J Proteomics*, **114**, 263-273.
351. Deutsch, E.W., Csordas, A., Sun, Z., Jarnuczak, A., Perez-Riverol, Y., Ternent, T., Campbell, D.S., Bernal-Llinares, M., Okuda, S., Kawano, S., Moritz, R.L., Carver, J.J., Wang, M., Ishihama, Y., Bandeira, N., Hermjakob, H., et Vizcaíno, J.A. (2017) The ProteomeXchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition. *Nucleic Acids Res.*, **45** (D1), D1100-D1106.
352. Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D.J., Inuganti, A., Griss, J., Mayer, G., Eisenacher, M., Pérez, E., Uszkoreit, J., Pfeuffer, J., Sachsenberg, T., Yilmaz, S., Tiwary, S., Cox, J., Audain, E., Walzer, M., Jarnuczak, A.F., Ternent, T., Brazma, A., et Vizcaíno, J.A. (2019) The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.*, **47** (D1), D442-D450.
353. Henrionnet, C., Gillet, P., Mainard, D., Vincourt, J.-B., et Pinzano, A. (2018) Label-free relative quantification of secreted proteins as a non-invasive method for the quality control of chondrogenesis in bioengineered substitutes for cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med*, **12** (3), e1757-e1766.
354. Huang, D.W., Sherman, B.T., et Lempicki, R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, **4** (1), 44-57.
355. Vincourt, J.-B., Lionneton, F., Kratassiouk, G., Guillemin, F., Netter, P., Mainard, D., et Magdalou, J. (2006) Establishment of a reliable method for direct proteome characterization of human articular cartilage. *Mol. Cell Proteomics*, **5** (10), 1984-1995.
356. Farndale, R.W., Buttle, D.J., et Barrett, A.J. (1986) Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim. Biophys. Acta*, **883** (2), 173-177.
357. Wiederschain, D., Wee, S., Chen, L., Loo, A., Yang, G., Huang, A., Chen, Y., Caponigro, G., Yao, Y.-M., Lengauer, C., Sellers, W.R., et Benson, J.D. (2009) Single-vector inducible lentiviral RNAi system for oncology target validation. *Cell Cycle*, **8** (3), 498-504.
358. Talantikite, M., Lécorché, P., Beau, F., Damour, O., Becker-Pauly, C., Ho, W.-B., Dive, V., Vadon-Le Goff, S., et Moali, C. (2018) Inhibitors of BMP-1/tolloid-like proteinases: efficacy, selectivity and cellular toxicity. *FEBS Open Bio*, **8** (12), 2011-2021.

359. Sasano, Y., Zhu, J.-X., Tsubota, M., Takahashi, I., Onodera, K., Mizoguchi, I., et Kagayama, M. (2002) Gene Expression of MMP8 and MMP13 During Embryonic Development of Bone and Cartilage in the Rat Mandible and Hind Limb. *J Histochem Cytochem.*, **50** (3), 325-332.
360. Rocha, B., Calamia, V., Casas, V., Carrascal, M., Blanco, F.J., et Ruiz-Romero, C. (2014) Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. *J. Proteome Res.*, **13** (2), 1045-1054.
361. Gene Ontology Resource. *Gene Ontology Resource*.
362. The Gene Ontology Consortium (2017) Expansion of the Gene Ontology knowledgebase and resources. *Nucleic Acids Res.*, **45** (D1), D331-D338.
363. Wilson, R., Norris, E.L., Brachvogel, B., Angelucci, C., Zivkovic, S., Gordon, L., Bernardo, B.C., Stermann, J., Sekiguchi, K., Gorman, J.J., et Bateman, J.F. (2012) Changes in the Chondrocyte and Extracellular Matrix Proteome during Post-natal Mouse Cartilage Development. *Molecular & Cellular Proteomics*, **11** (1), M111.014159.
364. Chen, L., Fink, T., Ebbesen, P., et Zachar, V. (2006) Temporal transcriptome of mouse ATDC5 chondroprogenitors differentiating under hypoxic conditions. *Exp. Cell Res.*, **312** (10), 1727-1744.
365. McAlinden, A., Traeger, G., Hansen, U., Weis, M.A., Ravindran, S., Wirthlin, L., Eyre, D.R., et Fernandes, R.J. (2014) Molecular properties and fibril ultrastructure of types II and XI collagens in cartilage of mice expressing exclusively the  $\alpha 1$ (IIA) collagen isoform. *Matrix Biol.*, **34**, 105-113.
366. Murakami, K., Kikugawa, S., Kobayashi, Y., Uehara, S., Suzuki, T., Kato, H., Udagawa, N., et Nakamura, Y. (2018) Olfactomedin-like protein OLFML1 inhibits Hippo signaling and mineralization in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **505** (2), 419-425.
367. Vogt, L., Schrimpf, S.P., Meskenaite, V., Frischknecht, R., Kinter, J., Leone, D.P., Ziegler, U., et Sonderegger, P. (2001) Calsynenin-1, a proteolytically processed postsynaptic membrane protein with a cytoplasmic calcium-binding domain. *Mol. Cell. Neurosci.*, **17** (1), 151-166.
368. Zhang, L., Huang, H., Zhou, F., Schimmel, J., Pardo, C.G., Zhang, T., Barakat, T.S., Sheppard, K.-A., Mickanin, C., Porter, J.A., Vertegaal, A.C.O., van Dam, H., Gribnau, J., Lu, C.X., et ten Dijke, P. (2012) RNF12 controls embryonic stem cell fate and morphogenesis in zebrafish embryos by targeting Smad7 for degradation. *Mol. Cell*, **46** (5), 650-661.
369. Gontan, C., Mira-Bontenbal, H., Magaraki, A., Dupont, C., Barakat, T.S., Rentmeester, E., Demmers, J., et Gribnau, J. (2018) REX1 is the critical target of RNF12 in imprinted X chromosome inactivation in mice. *Nat Commun*, **9** (1), 4752.
370. Rodríguez-Sánchez, I.P., Garza-Rodríguez, M.L., Mohamed-Noriega, K., Voruganti, V.S., Tejero, M.E., Delgado-Enciso, I., Pérez-Ibave, D.C., Schlabritz-Loutsevitch, N.E., Mohamed-Noriega, J., Martínez-Fierro, M.L., Reséndez-Pérez, D., Cole, S.A., Cavazos-Adame, H., Comuzzie, A.G., Mohamed-Hamsho, J., et Barrera-Saldaña, H.A. (2013) Olfactomedin-like 3 (OLFML3) gene expression in baboon and human ocular tissues: cornea, lens, uvea, and retina. *J. Med. Primatol.*, **42** (3), 105-111.
371. Mende, L.M., Waterborg, J.H., Mueller, R.D., et Matthews, H.R. (1983) Isolation, identification, and characterization of histones from plasmodia of the true slime mold *Physarum polycephalum* using extraction with guanidine hydrochloride. *Biochemistry*, **22** (1), 38-51.
372. Starenki, D., Sosonkina, N., Hong, S.-K., Lloyd, R.V., et Park, J.-I. (2019) Mortalin (GRP75/HSPA9) Promotes Survival and Proliferation of Thyroid Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci*, **20** (9).

373. Bauden, M., Kristl, T., Sasor, A., Andersson, B., Marko-Varga, G., Andersson, R., et Ansari, D. (2017) Histone profiling reveals the H1.3 histone variant as a prognostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer*, **17** (1), 810.
374. Han, J.A., Kim, J.-Y., et Kim, J.-I. (2014) Analysis of gene expression in cyclooxygenase-2-overexpressed human osteosarcoma cell lines. *Genomics Inform*, **12** (4), 247-253.
375. Rosenzweig, R., Bronner, V., Zhang, D., Fushman, D., et Glickman, M.H. (2012) Rpn1 and Rpn2 coordinate ubiquitin processing factors at proteasome. *J. Biol. Chem.*, **287** (18), 14659-14671.
376. Shan, Y., et Cortopassi, G. (2016) Mitochondrial Hspa9/Mortalin regulates erythroid differentiation via iron-sulfur cluster assembly. *Mitochondrion*, **26**, 94-103.
377. Atp5f1b - ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor - Mus musculus (Mouse) - Atp5f1b gene & protein.
378. Dhx9 - ATP-dependent RNA helicase A - Mus musculus (Mouse) - Dhx9 gene & protein.
379. Hnrnp1 - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H - Mus musculus (Mouse) - Hnrnp1 gene & protein.
380. Blackburn, P.R., Xu, Z., Tumelty, K.E., Zhao, R.W., Monis, W.J., Harris, K.G., Gass, J.M., Cousin, M.A., Boczek, N.J., Mitkov, M.V., Cappel, M.A., Francomano, C.A., Parisi, J.E., Klee, E.W., Fageih, E., Alkuraya, F.S., Layne, M.D., McDonnell, N.B., et Atwal, P.S. (2018) Bi-allelic Alterations in AEBP1 Lead to Defective Collagen Assembly and Connective Tissue Structure Resulting in a Variant of Ehlers-Danlos Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **102** (4), 696-705.
381. Ith, B., Wei, J., Yet, S.-F., Perrella, M.A., et Layne, M.D. (2005) Aortic carboxypeptidase-like protein is expressed in collagen-rich tissues during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns*, **5** (4), 533-537.
382. Knudson, C.B., et Knudson, W. (2001) Cartilage proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **12** (2), 69-78.
383. Davies, N.P., Roubin, R.H., et Whitelock, J.M. (2008) Characterization and purification of glycosaminoglycans from crude biological samples. *J. Agric. Food Chem.*, **56** (2), 343-348.
384. Miyahara, M., Njieha, F.K., et Prockop, D.J. (1982) Formation of collagen fibrils in vitro by cleavage of procollagen with procollagen proteinases. *J. Biol. Chem.*, **257** (14), 8442-8448.
385. Hajdú, I., Kardos, J., Major, B., Fabó, G., Lőrincz, Z., Cseh, S., et Dormán, G. (2018) Inhibition of the LOX enzyme family members with old and new ligands. Selectivity analysis revisited. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **28** (18), 3113-3118.
386. Orimo, H. (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, **77** (1), 4-12.
387. Shukunami, C., Ishizeki, K., Atsumi, T., Ohta, Y., Suzuki, F., et Hiraki, Y. (1997) Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, **12** (8), 1174-1188.
388. Song, E., et Mechref, Y. (2013) LC-MS/MS identification of the O-glycosylation and hydroxylation of amino acid residues of collagen  $\alpha$ -1 (II) chain from bovine cartilage. *J. Proteome Res.*, **12** (8), 3599-3609.
389. Hulmes, D.J.S. (2019) Roles of the procollagen C-propeptides in health and disease. *Essays in Biochemistry*, **63** (3), 313-323.
390. Rosini, S., Pugh, N., Bonna, A.M., Hulmes, D.J.S., Farndale, R.W., et Adams, J.C. (2018) Thrombospondin-1 promotes matrix homeostasis by interacting with collagen and lysyl oxidase precursors and collagen cross-linking sites. *Sci Signal*, **11** (532).

391. Zhang, Y., Yang, T.-L., Li, X., et Guo, Y. (2015) Functional analyses reveal the essential role of SOX6 and RUNX2 in the communication of chondrocyte and osteoblast. *Osteoporos Int*, **26** (2), 553-561.
392. Lodewyckx, L., Cailotto, F., Thysen, S., Luyten, F.P., et Lories, R.J. (2012) Tight regulation of wingless-type signaling in the articular cartilage - subchondral bone biomechanical unit: transcriptomics in Frzb-knockout mice. *Arthritis Res. Ther.*, **14** (1), R16.
393. Kerwar, S.S., Cardinale, G.J., Kohn, L.D., Spears, C.L., et Stassen, F.L. (1973) Cell-free synthesis of procollagen: L-929 fibroblasts as a cellular model for dermatosparaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70** (5), 1378-1382.
394. Luo, G., Ducy, P., McKee, M.D., Pinero, G.J., Loyer, E., Behringer, R.R., et Karsenty, G. (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, **386** (6620), 78-81.
395. Zhou, M., Kawashima, N., Suzuk, N., Yamamoto, M., Ohnishi, K., Katsube, K., Tanabe, H., Kudo, A., Saito, M., et Suda, H. (2015) Periostin is a negative regulator of mineralization in the dental pulp tissue. *Odontology*, **103** (2), 152-159.
396. Taylor, D.W., Ahmed, N., Parreno, J., Lunstrum, G.P., Gross, A.E., Diamandis, E.P., et Kandel, R.A. (2015) Collagen type XII and versican are present in the early stages of cartilage tissue formation by both redifferentating passaged and primary chondrocytes. *Tissue Eng Part A*, **21** (3-4), 683-693.
397. Eyre, D.R., Apon, S., Wu, J.J., Ericsson, L.H., et Walsh, K.A. (1987) Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett.*, **220** (2), 337-341.
398. Hsueh, M.-F., Khabut, A., Kjellström, S., Önnerfjord, P., et Kraus, V.B. (2016) Elucidating the Molecular Composition of Cartilage by Proteomics. *J. Proteome Res.*, **15** (2), 374-388.
399. Malfait, F., Symoens, S., Goemans, N., Gyftodimou, Y., Holmberg, E., López-González, V., Mortier, G., Nampoothiri, S., Petersen, M.B., et De Paepe, A. (2013) Helical mutations in type I collagen that affect the processing of the amino-propeptide result in an Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos Syndrome overlap syndrome. *Orphanet J Rare Dis*, **8**, 78.
400. Bulleid, N.J., Wilson, R., et Lees, J.F. (1996) Type-III procollagen assembly in semi-intact cells: chain association, nucleation and triple-helix folding do not require formation of inter-chain disulphide bonds but triple-helix nucleation does require hydroxylation. *Biochem. J.*, **317** ( Pt 1), 195-202.
401. Prockop, D.J., Sieron, A.L., et Li, S.W. (1998) Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol.*, **16** (7), 399-408.
402. Fujita, T., Fukuyama, R., Enomoto, H., et Komori, T. (2004) Dexamethasone inhibits insulin-induced chondrogenesis of ATDC5 cells by preventing PI3K-Akt signaling and DNA binding of Runx2. *J. Cell. Biochem.*, **93** (2), 374-383.
403. Maeda, N., Hagihara, H., Nakata, Y., Hiller, S., Wilder, J., et Reddick, R. (2000) Aortic wall damage in mice unable to synthesize ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97** (2), 841-846.
404. Parsons, K.K., Maeda, N., Yamauchi, M., Banes, A.J., et Koller, B.H. (2006) Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **290** (6), E1131-1139.
405. Stegen, S., Laperre, K., Eelen, G., Rinaldi, G., Fraisl, P., Torrekens, S., Van Looveren, R., Loopmans, S., Bultynck, G., Vinckier, S., Meersman, F., Maxwell, P.H., Rai, J., Weis,

- M., Eyre, D.R., Ghesquière, B., Fendt, S.-M., Carmeliet, P., et Carmeliet, G. (2019) HIF-1 $\alpha$  metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. *Nature*, **565** (7740), 511-515.
406. Elia, I., Rossi, M., Stegen, S., Broekaert, D., Doglioni, G., van Gersel, M., Boon, R., Escalona-Noguero, C., Torrekens, S., Verfaillie, C., Verbeken, E., Carmeliet, G., et Fendt, S.-M. (2019) Breast cancer cells rely on environmental pyruvate to shape the metastatic niche. *Nature*, **568** (7750), 117-121.
407. Stegen, S., Laperre, K., Eelen, G., Rinaldi, G., Fraisl, P., Torrekens, S., Van Looveren, R., Loopmans, S., Bultynck, G., Vinckier, S., Meersman, F., Maxwell, P.H., Rai, J., Weis, M., Eyre, D.R., Ghesquière, B., Fendt, S.-M., Carmeliet, P., et Carmeliet, G. (2019) HIF-1 $\alpha$  metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. *Nature*, **565** (7740), 511-515.
408. Kishimoto, K.N., Oxford, C.L., et Reddi, A.H. (2009) Stimulation of the side population fraction of ATDC5 chondroprogenitors by hypoxia. *Cell Biol. Int.*, **33** (12), 1222-1229.
409. COL2A1 gene homepage - Global Variome shared LOVD.
410. Richards, A.J., McNinch, A., Martin, H., Oakhill, K., Rai, H., Waller, S., Treacy, B., Whittaker, J., Meredith, S., Poulson, A., et Snead, M.P. (2010) Stickler syndrome and the vitreous phenotype: mutations in COL2A1 and COL11A1. *Human Mutation*, **31** (6), E1461-E1471.

## 7. ANNEXE

---

Ces travaux de thèse ont fait l'objet de plusieurs communications affichées et a abouti à la soumission d'un article dans le journal à comité de lecture *Journal of Proteomics*.

L'article dans son format de soumission est disponible ci-après.

Manuscript Number:

Title: The ATDC5 model of chondrogenesis exhibits major proteome hallmarks of hyaline cartilage and triggers collagen build up via triple helix hydroxylation

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Original Article

Keywords: hydroxylation; post-translational modifications; procollagen; proteoglycan; crosslink; extracellular matrix.

Corresponding Author: Dr. Jean-Baptiste Vincourt,  
Corresponding Author's Institution: UMR7365 CNRS UL

First Author: Dafné Wilhelm

Order of Authors: Dafné Wilhelm; Hervé Kempf; Arnaud Bianchi; Jean-Baptiste Vincourt

Abstract: Fibrillar collagens and proteoglycans (PGs) are quantitatively the major constituents of extracellular matrices (ECM). They carry numerous crucial post-translational modifications (PTMs) that tune the resulting biomechanical properties of the corresponding tissues. The mechanisms determining these PTMs remain largely unknown, notably because available established cell lines do not recapitulate much of the complexity of the machineries involved. ATDC5 cells are a model of chondrogenesis widely used for decades, but it remains described mostly at histological and transcriptional levels. Here, we have inspected the proteome of the ATDC5 model, focusing on its ECM. Insulin-stimulated ATDC5 cells substantially synthesize cartilage-relevant components, which they incorporate into their ECM. Aggrecan, the major cartilage PG, bears most of its naturally occurring maturation hallmarks (glycosylations and sulfations) in cartilage. Type II collagen carrying many of its PTMs found in vivo (proline hydroxylations, lysine hydroxylations and glycosylations), is crosslinked via LOX (lysyl oxidase)-dependent mechanisms. Finally, collagen accumulation in the ECM is determined by triple helix hydroxylations, which profoundly increase immediately upon insulin stimulation, without ascorbate supplementation. In conclusion, the ATDC5 model recapitulates critical aspects of the cartilage ECM processing machinery and should be useful to decipher the regulatory mechanisms involved.

Proteomics data are available via ProteomeXchange with identifier PXD014121.

Suggested Reviewers: Yingjun Wang South  
China University of Technology  
imwangyj@163.com  
massive user of ATDC5 model

David Hudson  
University of Washington, Seattle dmhudson@uw.edu  
major contributor to the mass spectrometric inspection of collagen  
posttranslational modifications

Ali Mobasher University  
of Surrey  
ali.mobasher@imcentras.lt  
recurrent contributor to proteomics of cartilage and joints

Andreas Klatt University  
of Cologne  
andreas.klatt@uk-koeln.de  
has done a lot of work on non collagenic and collagenic proteins in  
cartilage. should have an expert view on the pitfalls of the model that we  
point.

Geert Carmeliet University  
of Leuven  
geert.carmeliet@kuleuven.be  
Expert of the links between collagen and energetic metabolism. not sure  
she will have time for this.

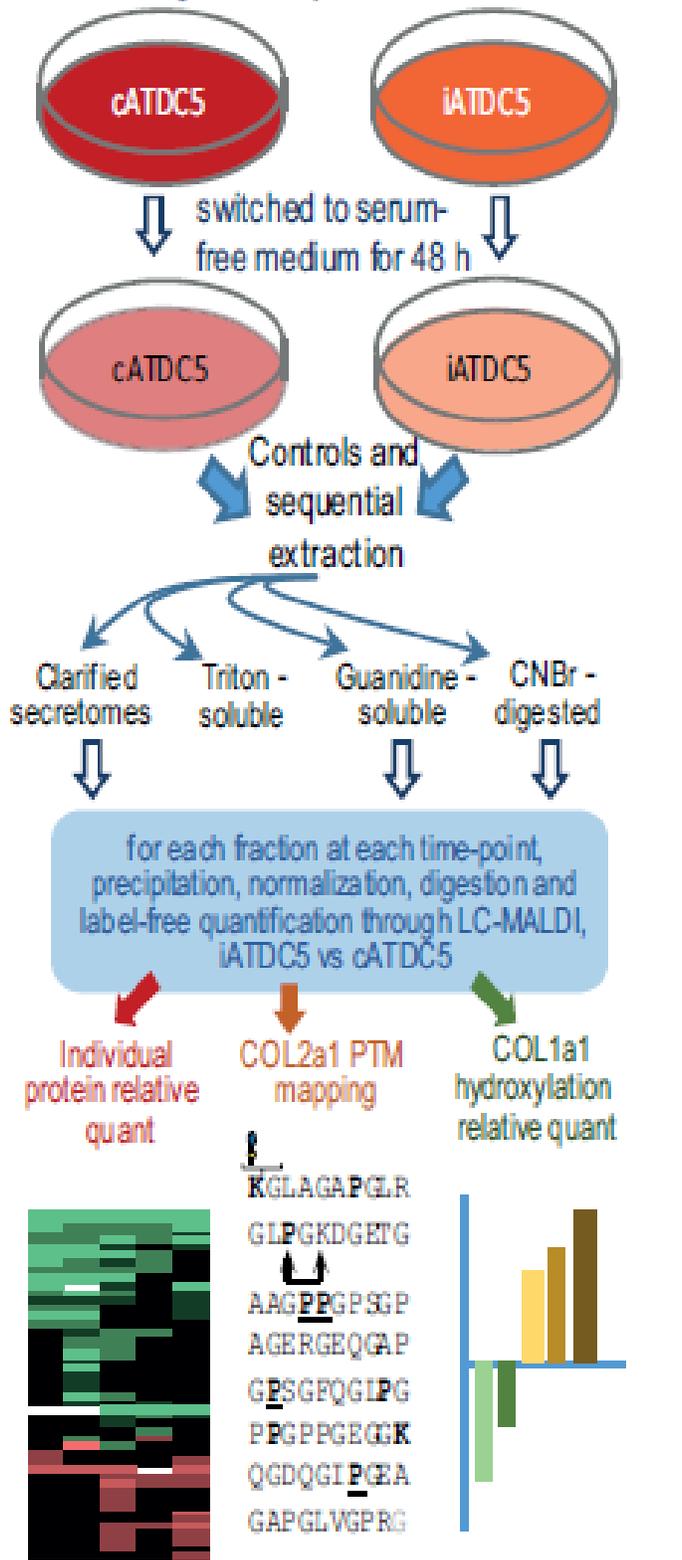
Opposed Reviewers:

Research Data Related to this Submission

-----  
There are no linked research data sets for this submission. The following  
reason is given:  
Proteomics data are available via ProteomeXchange with identifier  
PXD014121.

**\*Graphical Abstract**

**Triplets control and insulin-stimulated**  
 ATDC5 cells grown to day 3, 7, 14, 17, 21, 28, 35



## **Highlights**

- Stimulated ATDC5 cells synthesize major cartilage extracellular matrix components
- ATDC5 cells produce known and potentially new contributors to chondrogenesis
- Mature aggrecan accumulates in the extracellular matrix of stimulated ATDC5 cells
- Crosslinked type II collagen bears cartilage-related chemical modifications
- Triple helix hydroxylation is the major determinant of fibrillar collagen deposition

# **The ATDC5 model of chondrogenesis exhibits major proteome hallmarks of hyaline cartilage and triggers collagen build up *via* triple helix hydroxylation**

Wilhelm Dafné<sup>1</sup>, Kempf Hervé<sup>1</sup>, Bianchi Arnaud<sup>1</sup>, Vincourt Jean-Baptiste<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> UMR 7365 CNRS-UL IMoPA, Vandoeuvre-les-Nancy, France

<sup>2</sup> Proteomics core facility of UMS 2008 UL-CNRS-INSERM IBSLor, Vandoeuvre-Lès-Nancy, France

**Corresponding author:** jean-baptiste.vincourt@univ-lorraine.fr; **address:** UMR 7365 CNRSUL IMoPA, Biopole du Campus Brabois-Santé, 9, Avenue Forêt de Haye, CS 50184, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cedex France.

**Key words:** hydroxylation; post-translational modifications; procollagen; proteoglycan; mass spectrometry; crosslink; extracellular matrix.

## **ABSTRACT:**

Fibrillar collagens and proteoglycans (PGs) are quantitatively the major constituents of extracellular matrices (ECM). They carry numerous crucial post-translational modifications (PTMs) that tune the resulting biomechanical properties of the corresponding tissues. The mechanisms determining these PTMs remain largely unknown, notably because available established cell lines do not recapitulate much of the complexity of the machineries involved. ATDC5 cells are a model of chondrogenesis widely used for decades, but it remains described mostly at histological and transcriptional levels. Here, we have inspected the proteome of the ATDC5 model, focusing on its ECM. Insulin-stimulated ATDC5 cells substantially synthesize cartilage-relevant components, which they incorporate into their ECM. Aggrecan, the major cartilage PG, bears most of its naturally occurring maturation hallmarks (glycosylations and sulfations) in cartilage. Type II collagen carrying many of its PTMs found *in vivo* (proline hydroxylations, lysine hydroxylations and glycosylations), is crosslinked *via* LOX (lysyl oxidase)-dependent mechanisms. Finally, collagen accumulation in the ECM is determined by triple helix hydroxylations, which profoundly increase immediately upon insulin stimulation,

without ascorbate supplementation. In conclusion, the ATDC5 model recapitulates critical aspects of the cartilage ECM-processing machinery and should be useful to decipher the regulatory mechanisms involved.

Proteomics data are available *via* ProteomeXchange with identifier PXD014121.

Reviewer account details to get access to uploaded data *via* ProteomeXchange **Username:** reviewer21888@ebi.ac.uk; **Password:** R4KJ8Ka8

**ABBREVIATIONS:** AB (Ammonium Bicarbonate);  $\beta$ APN (beta-aminopropionitrile); CNBr (cyanogen bromide); dMMB (dimethyl methylene blue); ECM (extracellular matrix); FA (formic acid); GO (Gene Ontology); IAA (iodoacetamide); LOX (lysyl oxidase); PG (proteoglycan); PTM (post-translational modification).

## 4. 1. INTRODUCTION

The extracellular matrix (ECM) is primarily composed of proteoglycans (PGs) and fibrillar collagens, the most abundant proteins of the human body. It provides a critical scaffold for cells, is required for essential cell functions (motility, proliferation, survival and differentiation) [1] and supports most of the biomechanical properties of tissues and organs [2]. Although very distinct in their composition and elementary functions, both collagens and PGs consist in particularly large macromolecular complexes. Their building blocks carry multiple and tightly regulated post-translational modifications (PTMs) that perfectly cope with intrinsic needs and solicitations of each organ [3]. The crucial role of the ECM is highlighted by the wide spectrum of syndromes and diseases, from minor to lethal, that arise from genetic abnormalities in ECM proteins [4] in particular when affecting collagens [5, 6] and enzymes which modify them [7-9].

Over decades, remarkable improvements were achieved in describing ECM molecules [2, 10], notably through mass spectrometry [11-13] and characterizing the molecular mechanisms involved [14-17]. Most achievements have required strictly *in vivo* studies, precisely because these aspects are tightly regulated by subtle differentiation programs of the cells in environmental conditions that are barely reproducible *in vitro*. However, practically, there are

also ECM-specific limitations to *in vivo* studies: the limited amounts of newly synthesized molecules, compared to the pool of accumulated ones, do not facilitate the characterization of synthesis intermediates. Specific findings were also achieved through strictly *in vitro* approaches, although imperfect as they may not reflect the whole process [18-20].

In vertebrates, cartilage and bone cells produce among the densest and most abundant ECM. Although *in vivo* high-throughput analysis of the chondrocyte transcriptome [21, 22] and proteome [23, 24] has brought a global picture of the major genes and proteins involved in ECM build-up, many of the processing mechanisms remain unsolved. In order to promote a more comprehensive characterization of the molecular mechanisms of ECM synthesis, the field would benefit from models of an intermediate complexity, such as established cell lines that recapitulate a substantial part of the sequential events occurring *in vivo*. Many established cell lines secrete procollagens and at least some of their processing intermediates into the medium. Nevertheless, very few are capable of assembling collagen into an insoluble network, and when they do, it is abnormally matured [25, 26], demonstrating how unsatisfactorily they recapitulate *in vivo* situations.

The mouse embryonal carcinoma-derived cell line ATDC5 is a widely used cellular model of chondrogenesis [27-34], referenced in more than 600 publications. However, to date, the ATDC5 model has only been described at histological and transcriptomic levels [35-37]. Herein, we investigated for the first time the time-course of proteome regulations occurring in specific cell fractions in insulin-stimulated ATDC5 (iATDC5), taking unstimulated ATDC5 (cATDC5) as controls, in order to better describe the actual composition of their ECM, and confronted our findings to the more classically used read-outs, *i.e.*, histological staining and mRNA levels.

## 5. 2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

### 2.1 Cell culture.

The ATDC5 cell line was obtained from the Riken Cell Bank (Tsukubai, Japan) at passage 12 and cultured at all steps at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> – 20% O<sub>2</sub>. ATDC5 cells were cultured in expansion medium consisting in Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) containing 5 % FBS (11320-033 Gibco), 5.5 µg/mL human transferrin (T3309 Sigma), and 3.10<sup>-8</sup> M sodium selenite (S5261 Sigma) as previously described [27]. Here, we used the most consensual differentiation method as follows: ATDC5

cells were plated at  $3.10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in 12-well culture plates and grown in monolayer to confluence (day 0 of the experiment). From this point and for the next 14 days, cells were either maintained further in expansion medium (cATDC5) or switched to the same medium supplemented with 10 µg/mL insulin (I3146 Sigma) to induce chondrogenesis (iATDC5).

From day 14 until the end of the experiment, DMEM/F12 was replaced with  $\alpha$ -MEM medium (12561-056 Gibco) supplemented with 10 mM beta-glycerophosphate (G9422 SigmaAldrich). Media were refreshed every other day. At days 3, 7, 14, 17, 21, 28 and 35, dedicated cultures were rinsed once and washed once for 5 min in PBS and then FBS-starved in medium containing similar transferrin and insulin concentrations for two more days, prior to analysis (allowing suitable analysis of secreted proteins). This procedure was not found to alter mitochondrial activity, as found earlier with primary cells [38].

## **2.2 Study design.**

As the study required multiple analytical methods, which could not be performed from the same samples, 15 replicate culture wells were prepared for each experimental point to be investigated. Of them, 3 were used for mineral deposition analysis, 3 for proteoglycan content, 3 for DNA content, 3 for mRNA studies and 3 for proteome studies, allowing technical triplicate analysis in each analytical procedure. Most data reported here were obtained from a single experiment, all technical replicates were grown and processed at the same time, because our preliminary investigations suggested that independent experiments exhibited differences in the folds and exact time-points of regulations, although in other experiments the responses of iATDC5 followed a similar trend.

## **2.3 Differentiation and mineralization.**

ATDC5 cells were stained with Alcian blue 8GX pH 0.1 (S/6-2 RA Lamb) and Alizarin red (A5533 Sigma-Aldrich) at various time points to detect respectively the proteoglycan accumulation and mineralization. Cells were washed with PBS twice, then fixed with ethanol 90% at -20 °C until the end of the experiment, rinsed in PBS and stained with 0.1% Alcian blue in HCl 0.1M overnight, or 1% Alizarin red in distilled water (pH 4.1-4.3) for 45 sec, rinsed with distilled water, and photographed. Thereafter, Alcian blue was dissolved in 6 M HCl overnight and absorbance at  $\lambda = 600$  nm was measured in 96-well plates using a Varioscan spectrophotometer (Thermofisher). Measurements of Alizarin red staining was performed as described [55].

## **2.4 Hoechst assay for DNA content.**

Monolayer cell cultures were resuspended in 1 mL of 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, pH 7.4 and lysed by two pulse-mode sonication burst cycles of 30 seconds each. Samples were centrifuged for 30 minutes at 4°C, 16 000g. 200 µL of 0.1 µg/mL Hoechst 33258 (H3569 Invitrogen) were added to 10 µL supernatants in a 96-well plates). Fluorometric measurements (348 nm excitation wavelength, 456 nm absorption wavelength) were performed with the Varioskan Flash (Thermo Scientific) running Skan it 2.4.3 software. Absolute quantification was determined using standard curves prepared from calf thymus DNA (D3664-2MG Sigma).

**2.5 RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction analysis.** Total RNA was isolated from ATDC5 cells using RNeasy mini kit® (74104 Qiagen). 100ng of total RNA were reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (28025021 Invitrogen) with random hexamer primers, according to the manufacturer's instructions.

### **2.6 Real-time quantitative polymerase chain reaction.**

Real time quantitative PCR was performed with standard curve calibration, using the following primers : RPS29\_For, GGAGTCACCCACGGAAGTT; RPS29\_Rev, GCCTATGTCCTTCGCGTACT; COL1A1\_For, GTCCCGCTGGTCAAGATG; COL1A1\_Rev, CTCCAGCCTTTCCAGGTTCT; COL2A1\_For, TGGTATTCCTGGAGCCAAAG; COL2A1 Rev, ACCAGTTGCACCTTGAGGAC; COL10A1\_For, TTCATCCATACGCCATAAAG; COL10A1\_Rev, AGGGACCTGGGTGTCCTC; PGCA\_For, GCTGCAGTGATCTCAGAAGAAG; PGCA\_Rev, GATGGTGAGGGAAGACCCTA; MMP13\_For, ACTCAAATGGTCCCAAACGA; MMP13\_Rev, GGTGTCACATCAGACCAGACC. The results were normalized to *RPS29* mRNA levels as described [39] and expressed as fold regulation over the control.

### **2.7 Protein fractionation.**

All steps were performed at 4 °C unless stated otherwise. Centrifugations were all carried out at 16,000 g for 5 min. All fractions were stored at -80°C until further use. Secretomes were collected, clarified and stored. Cell monolayers were washed twice in PBS, scrapped in 1 mL PBS-Triton X-100 1%, transferred to Eppendorf tubes and centrifuged. The soluble fraction was collected and its protein content was measured using Pierce® BCA Protein Assay Kit (23225 Thermo Scientific) as recommended by manufacturer's instructions. The insoluble fraction was washed once in 1 mL PBS-Triton X-100 1% and further extracted in 500 µl Guanidine Buffer [guanidine hydrochloride (G3272 Sigma-Aldrich), 6 M; Tris, 50 mM, DTT

50 mM, pH 8.0] overnight under rotation. The Guanidine-soluble fraction was collected. The insoluble fractions were washed once in guanidine buffer and twice in distilled water, then rotated overnight in 500  $\mu$ l pure formic acid (FA; 405792 Carlos Erba). 1 volume water was added and the FA-soluble fraction was removed. Of note, this fraction contained insignificant protein amounts as judged when running evaporated samples on Coomassie gels. The remaining insoluble material was resuspended in 200  $\mu$ l FA, 70%, containing 0.125 M CNBr (cyanogen bromide, C91492 Sigma-Aldrich) and incubated overnight on a rotator at room temperature in the dark under a chemical fume hood. At this point, no insoluble material was visible in any sample. 5 volumes of distilled water were added and samples were dried overnight prior to storage, effluents being collected in a cold trap containing excess NaOH.

## **2.8 Sample preparation for proteome studies.**

Samples were all normalized based on the DNA content of the corresponding time points. Secretomes were normalized by dilution according to cell numbers into fresh expansion medium and precipitated using DOC 0.02% (D6750 Sigma)/TCA 15% (T6399 Sigma), rinsed twice in acetone, resuspended in 50  $\mu$ l Urea Buffer (6M Urea, 50 mM Tris, pH 8.0) and stored until further use. Guanidine extracts were precipitated with 2 vol. ice-cold Ethanol overnight at -20 °C, rinsed twice in Ethanol, dried for 5 min and resuspended in an adequate volume of Laemmli loading buffer for normalization, the minimal volume being set to 100  $\mu$ l. Samples were resuspended through 3 freeze/thaw cycles and 20  $\mu$ l aliquots were Ethanol-precipitated, dried, resuspended in 20  $\mu$ l Urea Buffer and stored until further use. Dried CNBr extracts were directly resuspended in Laemmli Buffer, normalized and prepared for further use similarly. Prior to tryptic digestion of secretome and Guanidine extracts, 20  $\mu$ l samples prepared in Urea Buffer were treated at room temperature with 0.8  $\mu$ l DTT 100 mM for 45 min, then with 0.8  $\mu$ l IAA (iodoacetamide) 1 M for 45 min and finally with 0.8  $\mu$ l DTT 1 M for 10 min. These steps were avoided for CNBr extracts. Samples were then diluted 10-fold in Tris, 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8.0, containing 200 ng sequencing grade trypsin (V5280 Promega) and incubated at 37 °C overnight. Digests were purified using C18 spin columns (89870 Thermofisher) according to manufacturer's recommendations, resuspended in 20  $\mu$ l ACN 2 %, TFA 0.1 % and transferred to nanoHPLC sampler tubes.

## **2.9 Nano-HPLC setup for proteome investigations.**

Fractionation was managed mostly as described in [40] with slight adaptations depending on sample kinds: For secretomes and Guanidine extracts, samples were separated into 340 fractions using longer LC runs, the ACN gradients being lengthened to 60 min, in order to better cope

with sample complexity. For CNBr extracts, considering the relatively low hydrophobicity of most collagen peptides, LC gradients were kept to 30 min and the 170 fraction collection was set between 17.5 and 34.5 min.

### **2.10 Relative peptide quantification based on label-free LC-MALDI.**

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium [41] *via* the PRIDE [42] partner repository with the dataset identifier PXD014121 and 10.6019/PXD014121. Measurements were performed mostly as described in [38]. Ratios and t-test p-values for all (m/z ; retention time) coordinates were calculated using ProfileAnalysis 2.3 (Bruker) by comparing MS ion chromatograms with the following filters: 50 ppm mass deviation; 30 sec retention time deviation; minimum 3 counts within one biological group. Most calculations were made between a given iATDC5 time-point and its control counterpart. However, as the secretomes of control cells were incrementally contaminated by FBS-derived proteins from day 21 to 35 (evidenced in figure 5. D), which were likely to lower the apparent relative amounts of individual proteins of interest in the corresponding samples, proteins found increased in iATDC5 cells at these time points were cross-validated by calculations of their changes in iATDC5 cells between successive time points, from day 14 to 35. All allowed calculations were exported to proteinscape 2.4 server.

### **2.11 Peptide, PTM and protein identifications.**

All (m/z: retention time) coordinates found regulated with relative ratios below -2 or above +2 with significance (t -test p-value < 0.05) at any time point were selected by creating corresponding scheduled precursor lists in ProfileAnalysis, which were then used for automated MS/MS fragmentation in dedicated automatic methods in WARP-LC (Bruker). In addition, all masses found with s/n > 20 in one random sample of each analysis were also selected for MS/MS. All obtained MS/MS spectra together with the corresponding (m/z; retention time) coordinates were exported to Proteinscape server 2.4 and used for Swissprot mouse database interrogation through Mascot server 2.4. There were distinctions in database interrogation filters and data handling, depending on the considered extracts, which are detailed in Supplemental data legends. For global extract analysis, proteins were considered as identified with sufficient certainty if obtaining an FDR below 0.5 % using the random decoy strategy.

### **2.12 Protein ratio calculations and statistical interpretation.**

Ratios and corresponding p-values were assigned to identified peptides in Proteinscape 2.4 using the following alignment criteria: m/z deviation < 0.03 Da, retention time deviation < 30

sec. For each protein identified from 4 or more peptides passing quality control, the two peptides exhibiting lowest and highest ratio values were excluded. In addition, when analyzing secretomes, due to massive regulation of proline hydroxylation in fibrillar collagens (explained in results), all peptides corresponding to their triple helices were manually unselected, leaving for calculation only the peptides originating from C-propeptide regions. The median value of ratios observed for all remaining peptides of a given protein was used as the protein fold change and the median value of all remaining peptide p-values was used as the protein p-value for the observed change (if any). In the case of qualitative changes (peptides that were observed in all three replicates of a given group but lacking in the other), ratios and t-tests could not be calculated and therefore, these peptides were not integrated into the statistics of the corresponding protein. However, peptide qualitative changes were retained in the protein tables, as there were proteins described only by such peptides, reflecting potent, yet unquantifiable regulations. Such cases were considered whenever the corresponding protein was described by a minimum of two such peptides (all of them exhibiting coherent regulations).

### **2.13 SDS-PAGE and staining.**

The same samples used in MS analysis were separated by SDS-PAGE on gradient 4-20% PROTEAN® TGX Stain-Free™ Gels (456-8095 BIO-RAD), fixed, washed in water and stained either with colloidal Coomassie or dimethylmethylene Blue [43] (dMMB, 03610 Polysciences) as follows: 122 mg dMMB was first dissolved in 10 mL ethanol overnight under rotation and then settled for 2 hours. The staining solution consisted in 5 mL of the obtained soluble fraction diluted into 100 mL formic acid, 1mM, pH 3.5, 20% ethanol. Gels were stained overnight and washed in pure water several times and scanned on a Chemidoc XRS+ imager (BIO-RAD).

### **2.14 Western blotting analysis.**

SDS-PAGE was performed as described in the previous section and proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes within Trans-Blot® Turbo™ Transfer Packs (1704157 BIO-RAD) with Trans-Blot® Turbo™ transfert system. Antibodies against the Cpropeptides of type I $\alpha$ 1 and type II procollagens as well as the corresponding HRP-conjugated secondary antibodies were described elsewhere [44] Blots were developed with the enhanced chemiluminescence system (1705061 BIO-RAD) and acquired on a Chemidoc XRS+ imager (BIO-RAD). Loading controls were performed based on stain-free signal.

### **2.15 Polyacrylamide gel band analysis.**

For gel band protein content analysis, gel pieces were washed as follow : three times in 200  $\mu$ L of ammonium bicarbonate (AB) 100 mM for 15 min, once in 200  $\mu$ L of ACN 50%/AB 50% for 15 min, then once in 200  $\mu$ L of AB for 15 min, and finally twice in 200  $\mu$ L ACN for 3 min. Gel fragments were then sonicated for 2 min, and dried 30 min. 100 ng of trypsin was added in a total volume of 20  $\mu$ L AB, 50 mM and digestion was performed overnight at room temperature. Peptides were extracted twice in 25  $\mu$ L of TFA 1% /ACN 80% under sonication for 7 minutes, supernatants were pooled, dried and resuspended in 10  $\mu$ L ACN 2% TFA 0,1% and sonicated 30 sec. Supernatants were transferred to nano-HPLC sampler tubes and processed for MALDI analysis as described above without notion of relative quantification, ions being selected for fragmentation based on their S/N ratio, the minimal S/N threshold being set to 20.

### **2.16 Bioinformatic Gene Ontology Analysis.**

Proteins identified by LC-MALDI-MS/MS were analyzed using DAVID Bioinformatics Resources v6.7 [45] to obtain a comprehensive description of the overrepresented biological processes and functional related groups of proteins within our data set. For DAVID analysis, only FDR significant (p-value < 0.005) overrepresented terms were considered. As background, the default *Mus musculus* genome was used.

## **6. 3. RESULTS**

### **3.1 The chondrogenic-like phenotype of iATDC5 confirmed at the proteome level by secretome analysis.**

After confirming that the phenotype of our samples were in accordance with the literature [29, 31] (Supplemental data S. 1), we examined their soluble secretomes [46] as previously described [38, 40]. 72 proteins being significantly up- or down-regulated were revealed. To obtain a comprehensive description of the related groups of regulated proteins, we performed Gene Ontology (GO) annotation enrichment analyses, focusing on biological processes. **[figure 1]** Figure 1. A shows the significant top four enriched GO term categorization that classifies 33 proteins. Two of the most enriched terms are consistent with chondrogenic differentiation. Collagen fibril organization (GO: 0030199; PGCA, ANXA2, CO2A1, CO5A1, CO5A2, COBA1, COBA2, FMOD, LYOX), the most enriched of all, and ECM organization (GO: 0030198; SMOC2, CCD80, FBLN1, FBLN5, LEG3, NID2, POSTN, PGBM), with both early and late protein regulations, depicting one major valuable feature of iATDC5 cells: the ability to produce large amounts of ECM components. Noticeably, glycolytic process (GO: 0006096; ALDOA, ENOA, PGK1, PGAM1, KP YM, TPIS), the second most

enriched term, was upregulated in iATDC5 immediately upon insulin stimulation and throughout the whole experiment.

Among the 72 regulated proteins in the secretome, 42 proteins (figure 2. B) have previously been reported as regulated at the mRNA level in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells [36] or at the protein level upon chondrogenesis *in vivo* [23] and *ex vivo* [24]. Among them, CO2A1 and aggrecan (PGCA) were dramatically upregulated from day 7 (figure 1. B), demonstrating at the proteome level the chondrocyte-like expression profile of iATDC5. Type XI collagen (COBA1), although poorly used as a marker in the model, is a component of functional heterofibrils found *in vivo* in cartilage [47] and was observed concomitantly with CO2A1. Noteworthy, among ECM-related components, there were not only up- but also dramatically down-regulated proteins, including Periostin (POSTN), Fibulin-1 (FBLN1), type V collagen (CO5A2) and type XII collagen (COCA1), suggesting that iATDC5 cells not only started synthesizing cartilage-related proteins but also ceased synthesizing a number of proteins related to their basal phenotype.

### **3.2 The composition of the guanidine-soluble ECM of ATDC5 cells.**

Next, we examined guanidine extracts, which, when prepared from cartilage, are mostly composed of PGs, non-fibrillar collagens and accessory ECM proteins [23]. Guanidine extracts obtained from cATDC5 were poor at time points earlier than day 7 of the experiment and therefore we started investigating iATDC5 vs cATDC5 regulation ratios from this time point. **[figure 2]** By day 17, however, the content of guanidine extracts from cATDC5 increased and reached total levels comparable to those of iATDC5 (figure 2. A), suggesting that switching the medium for  $\alpha$ MEM favored their ECM synthesis. In this fraction, 52 proteins were found regulated (figure. 2. B), demonstrating both early and late ECM remodeling events. Regarding the common markers of chondrogenesis, guanidine extracts demonstrated again the upregulation of CO2A1 and PGCA, suggesting that iATDC5 not only synthesized major cartilage components, but also integrated them to their ECM. In addition, this fraction revealed the upregulation of COAA1 (type X collagen), as early as day 7, while it was absent from secretomes. However, although *COL10* mRNA levels were found 400-fold upregulated (supplemental data S.1, in agreement with the literature), it remained a very minor component of the ECM, as suggested by its relatively low identification score until the end of the experiment (not included in figure 2 but available from Supplemental data S. 3). Among the

52 proteins found regulated in this fraction, 24 proteins were previously reported through proteome analysis of guanidine extracts prepared from chondrogenesis models, either *in vivo* [23] or *ex vivo* [24]. These included, in addition to the common markers of chondrogenesis, other fibrillar (CO1A1, CO1A2, COCA1) and non-fibrillar (CO6A1, CO6A2) collagens, PGs (PGS1, PGBM), accessory ECM proteins (NID2, SRPX2, EMIL1, TENA, TSP1), extracellular (LOXL4) and intracellular enzymes (G3P, PDIA3), transporters (VDAC1, ADT1, ADT2), a chaperone (GRP78), but also cytoskeletal (TBA1B, VIM) and nuclear (LMNA) components. We also found a number of regulations not described earlier in chondrogenesis, for proteins from virtually all these functional classes (notably, RPN1, PDIA1, GRP75, ACTB, TBB5, TIMP3, ATPB), including a number of nuclear proteins (H11, H13, H13, H15, H2A1H and H2B1H, HNRH1, ROA1, ROA2, DHX9, RMXL1).

### **3.3 iATDC5 accumulate largely mature aggrecan in their ECM.**

In the guanidine extract data set, peptide identification of aggrecan core protein was restricted to the G1, G2, and G3 globular domains, suggesting that interglobular glycosaminoglycan carrier domains must be heavily modified, preventing identification by LC-MS/MS [48]. To better characterize the length of glycan chains and sulfation of the PGs, we performed SDS-PAGE coupled to dMMB staining (figure 2. C). It did not reveal any staining against samples obtained from cATDC5 (figure 2. C) even at the latest time-points, while both iATDC5, as early as day 14, and bovine articular cartilage samples exhibited very high molecular weight PGs. The major corresponding protein was found by mass spectrometry to be aggrecan in both cases (data not shown). These findings were in accordance with the notion that aggrecan was largely glycosylated and sulfated (based on dMMB staining [43]). When the same samples were investigated after protein backbone removal, the observed patterns smeared over almost the entire lanes, reflecting the heterogeneity of glycosaminoglycan chain lengths. There were apparently less chains of the highest molecular weights from iATDC5 than from bovine cartilage however. Still, aggrecan of iATDC5 appears highly glycosylated and sulfated in a way that resembles the *ex vivo* sample, indicating that iATDC5 possess most of the naturally occurring PG processing machinery in cartilage.

### **3.4 Composition and regulation of the collagen fraction.**

Up to day 14 of the experiment, cATDC5 did not contain any guanidine-resistant material (not shown here but evidenced in figure 5. A). Therefore, the CNBr contents at earliest timepoints could not be compared and we investigated only the composition of the corresponding iATDC5 CNBr extracts. [figure 3] These were almost uniquely composed of fibrillar collagens, with the

only significant exception of Fibronectin (FINC, figure 3. A). Therefore, iATDC5 were early capable of integrating fibrillar collagens into a solid network, as found *in vivo*. Based on the number of identified peptides for each of them, CO2A1 came second, preceded only by CO1A1, and representing about 1/4<sup>th</sup> of the total collagen. From day 17 onward, cATDC5 started accumulating material in the CNBr fraction, enabling comparisons with iATDC5 (figure 3. B). In addition to CO2A1, which was substantially upregulated at all time-points, type III collagen (CO3A1) was very robustly down-regulated. Other regulations, although less prominent, were concomitantly evidenced, notably upregulation of COBA1 and downregulation of FINC. Therefore, the major cartilage ECM components are not only produced by iATDC5, but also integrated into the ECM.

### **3.5 Full inhibition of collagen crosslinking by $\beta$ APN.**

*In vivo*, collagen crosslinking requires LOX-mediated oxidative deamination of key lysine residues [13]. iATDC5 cells were treated during the whole experiment with 0.2 mM betaaminopropionitrile ( $\beta$ APN), which irreversibly inhibits enzymes of the LOX family (figure. 3. C). In contrast to non-treated iATDC5,  $\beta$ APN-treated iATDC5 exhibited a total shift of the collagen content from the CNBr extract to the guanidine extract, reflecting potent inhibition of collagen crosslinking. Therefore, in the ATDC5 model, collagen crosslinking appears to be fully dependent on LOX activity.

### **3.6 Type II procollagen proteolytic cleavage in iATDC5.**

As the proteolytic processing of procollagen is a critical step of fibrillogenesis [49], we next questioned whether N- and C-propeptides were cleaved from the type II procollagen secreted by iATDC5. [figure 4] We found peptides that unequivocally demonstrated cleavage of both the N- and C-propeptides at their conventional locations (figure 4), but none corresponding to the uncleaved precursor. Indeed, our western blotting experiments using an antibody directed against the C-propeptide of type II procollagen revealed, as early as day 7 and until day 35, a single reactive species corresponding to the cleaved C-propeptide (Supplemental data 8). Altogether, these data indicate that synthesized CO2A1 by iATDC5 is fully processed in terms of proteolytic cleavage. This is unlike other type II collagen-producing established cell lines characterized in the past [25].

### **3.7 The PTM status of type II collagen in iATDC5 is very similar to that found *in vivo*.**

In order to further characterize type II collagen synthesized by iATDC5, we investigated its chemical modifications (figure 4). Remarkably, many of the peptides identified in this approach

were found under several distinct chemical states. This finding highlights the heterogeneity of PTM combinations carried by the population of CO2A1 molecules (proline hydroxylation, lysine hydroxylation, galactosylation and glucosyl-galactosylation). Overall, combining findings from the CNBr digests and secretomes, 59 % of the triple helix sequence was covered by this analysis. This rate is insufficient to report on the exact PTM status of CO2A1 in the model, especially considering that several regions of particular interest, such as the N-telopeptide and both GXKGHR motifs involved in cross-linking, were missing. Still, this level of sequence coverage allows comparing the observed PTMs to those found *in vivo* (figure 4), taking as a reference the most exhaustive type II collagen PTM mapping reported to date, obtained from bovine cartilage pepsin extracts [53]. The vast majority of the PTMs found in iATDC5 was consistent with those reported *in vivo*, highlighting the strength of ATDC5 cells as a model of type II collagen maturation. [figure 5]

### **3.8 Type I collagen synthesis is regulated at multiple levels in ATDC5 cells.**

cATDC5 assemble no cross-linked collagen until day 17, as highlighted by running CNBr extracts on SDS-PAGE (figure 5. A), while iATDC5 demonstrate material accumulation as early as day 7. Type I collagen is the major component of CNBr extracts (figure 3. A). Therefore, in contrast to cATDC5, iATDC5 integrate type I collagen into their ECM (among other, but less prominent proteins) over the first 14 days of culture. Strikingly, when examined at the mRNA level (figure 5. B), *COL1A1* continuously decreases from day 3 to day 21 in cATDC5 and in higher extent in iATDC5, in total contrast with type I collagen deposition. According to global secretome analysis, type I procollagen neosynthesis is very abundant in both cATDC5 and iATDC5, without significant regulation between the two. This is why it is not listed in figure 1 (the corresponding output data are listed in Supplemental data S. 2). However, when the same data were re-analyzed seeking out proteolytic processing events, N-propeptide cleavage of both CO1A1 and CO1A2 was found very significantly upregulated in iATDC5 versus cATDC5 (figure 5. C), while C-propeptide cleavage was modestly (and insignificantly) upregulated. A western blotting analysis of the secretomes using an antibody directed against the C-propeptide of CO1A1 (figure 5. D) confirmed all of the above findings: (i) in both cATDC5 and iATDC5, there was little signal (at any molecular weight) after day 14, consistent with low mRNA levels (figure 5. B) in the second part of the experiment; (ii) the antibody detected not only the cleaved C-propeptide, but also two bands of higher molecular weights corresponding to those of the unprocessed and N-terminally cleaved-procollagens, respectively. (iii) C-propeptide cleavage was evidenced in both cATDC5 and iATDC5 over the

first 14 days; (iv) procollagen being cleaved only at the Npropeptide was evidenced in iATDC5 at day 14 but not in cATDC5. Altogether, these data are consistent with the notions that (a) *COL1A1* mRNA levels achieved in both cATDC5 and iATDC5 cells are lower beyond day 14, leading to lower procollagen neosynthesis; (b) procollagen proteolytic cleavage is more effective in iATDC5 over the first part of the differentiation, especially regarding the N-propeptide.

### **3.9 Collagen accumulation in ATDC5 cells depends primarily on triple helix hydroxylation.**

Regulations of further PTMs of type I procollagen triple helix were also investigated from secretome data. Figure 5.E highlights the findings for one representative peptide carrying up to 5 hydroxylations (regarding lysine and proline hydroxylations indifferently). Quite impressively, the hydroxylation level of this peptide, which was virtually null in cATDC5 at days 3-14, was dramatically induced in iATDC5 as early as day 3 and further progressed until day 14. The same peptide was also found alternatively galactosyl-glucosylated on a lysine residue; this modification was down-regulated in iATDC5, but this may primarily reflect its incompatibility with hydroxylations, since it was never detected together with massive hydroxylation of the surrounding proline residues (the corresponding data are highlighted in supplemental data S.7). Similar results were obtained for other peptides encompassing the whole triple helix, with absolutely no outlier, highlighting immediate, robust and progressive induction of triple helix hydroxylations in iATDC5 up to day 14 (the whole corresponding data are listed in Supplemental data S.7). In summary, while total amounts of secreted procollagen were comparable between cATDC5 and iATDC5, that being secreted by cATDC5 was very poorly hydroxylated, while that of iATDC5 was largely hydroxylated.

Beyond day 14, upon switching the culture medium for  $\alpha$ MEM which contains ascorbate, a cofactor considered essential for prolyl hydroxylases [54], cATDC5 started accumulating into their ECM detectable collagens, which quickly reached levels comparable to that of iATDC5 (figure 5. A) until the end of the experiment. This was remarkable, because at these late time points, *COL1A1* mRNA (figure 5. B) and secreted C-propeptide (either cleaved or not, figure 5. D) had reached their minimum levels. However, triple-helix proline hydroxylation levels at the corresponding time points (shown for day 35, figure 5. E, again, other triple-helix peptides behaved similarly) were then highly and similarly hydroxylated in both cATDC5 and iATDC5. Altogether, these findings strongly suggest that proline hydroxylation is the major determinant, as opposed to gene expression and protein synthesis, of type I collagen assembly in both

iATDC5 and cATDC5, but at distinct experimental time points, upon distinct stimuli. Obviously, the regulations of both precursor cleavage and triple helix hydroxylation could not be investigated for type II procollagen, as cATDC5 secreted it at incomparably lower levels than iATDC5 (figure 1 and supplemental data S. 8).

## 7. 4. DISCUSSION

Since its first description in 1990 [28], the ATDC5 model has become truly popular in the field of chondrogenesis and spread through worldwide laboratories, allowing pertinent functional characterization of multiple actors of chondrogenesis without the complexity of *in vivo* experiments [28, 30, 31, 55-57]. Noticeably, iATDC5 cells accumulate fibrillar collagenresembling structures into their ECM, as shown by electron microscopy [34].

However, the ATDC5 proteome remained largely unknown until now. Here we investigated the time-course of proteome regulations occurring in iATDC5, taking cATDC5 as controls, in order to better describe the actual composition of their ECM, and found 106 proteins significantly regulated, taking into consideration all time points and extracts. Among them, 62 proteins had been described earlier in proteomics studies of chondrogenesis, either *in vivo* or *ex vivo* [23, 24], consolidating the biological significance of the model. Several of the presently identified proteins have not been characterized in chondrogenesis yet and ATDC5 cells may thus be considered as a good model to assess their functions in the future. The most common markers of early chondrogenesis, (*i.e.*, aggrecan, types II collagen), are absent from cATDC5 at all stages but are synthesized (figure 1), integrated into the ECM (figures 2, 3, 5) and largely matured (figures 2, 4) by iATDC5. Maturation processes of these major macromolecules involve multiple and coordinated steps, that remain largely uncharacterized, precisely because established cellular models that recapitulate them are lacking. Towards this perspective, ATDC5 cells should be very useful.

The present findings also indicate that a number of proteins considered important in chondrogenesis are missing or at unexpectedly low levels in this model. In particular, Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), is abundant (and functionally important) in cartilage; it is among the most abundantly secreted proteins in primary chondrocytes [40, 58] and in mesenchymal stem cells undergoing chondrogenesis [38, 59]. Yet, it is absolutely missing in the present dataset. Likewise, other functionally important cartilage ECM components, notably, type IX collagen [60] and Matrilins [61], though less obviously evidenced by mass spectrometry

in cell culture systems, are not found either. Type X collagen is found specifically in guanidine extracts prepared from iATDC5 (figure 2), but it remains close to the minimal detection threshold. These findings may reflect an imperfect chondrogenesis of the model.

In the past, chondrogenesis of ATDC5 cells was found inducible by ascorbate, though with much lower efficacy than by insulin [33, 62]. Coherently, in the present study, CO2A1 neosynthesis reaches detectable, yet very low, levels in cATDC5 once grown in  $\alpha$ MEM, which contains ascorbate (figure 1 and Supplemental data S.2). Concurrently, but much more robustly, cATDC5 become capable of hydroxylating and assembling collagen (figure 5). This is coherent with the notion of ascorbate being essential for prolyl hydroxylase activity [54]. In contrast, iATDC5 synthesize cartilage markers (figures 1-2) but also hydroxylate and assemble collagen immediately upon insulin stimulation (figures 3 & 5), even while cultured in DMEM/F12, which is devoid of ascorbate. Earlier findings obtained in permeabilized cells [49] highlighted the importance of proline hydroxylation towards type III collagen triple helix formation and suggested that the latter was required for correct N-propeptide stabilization by disulfide bonds. In addition, mutations that perturb the correct folding of the N-terminal region of type I collagen triple helix alter N-propeptide cleavage in patients [63]; [64] and *in vitro*, partially unfolded procollagen is cleaved by C-proteinase but not by N-proteinase [65]. Therefore, the improved N-propeptide cleavage observed here in iATDC5 (figure 5. C & D) may not reflect a true enhancement of the corresponding enzymatic activities, but rather, improved N-propeptide conformation being a consequence of triple helix formation in line with dramatically increased triple helix hydroxylation (figure 5. E). **[figure 6]** Figure 6 depicts the summary of current findings regarding procollagen maturation events occurring in the model and how they connect functionally one to the others in line with the bibliography.

The mechanism by which iATDC5 cells hydroxylate procollagen without ascorbate supplementation is unknown. One plausible explanation is that, as ATDC5 cells are of murine origin, they are potentially capable of synthesizing ascorbate [46]. However, mice were also found to perform ascorbate-independent synthesis of collagen [68] and therefore, it remains unclear by which of these two routes insulin triggers collagen hydroxylation by ATDC5 cells without ascorbate supplementation. Among other proteins found induced by insulin in secretomes, it was remarkable to find that the second most enriched GO term was the energetic process (figure 1). More specifically, the corresponding proteins were regulated immediately upon insulin stimulation, together with global triple helix hydroxylation, suggesting that the two processes might be linked functionally. Very recently, specific energetic metabolic

pathways were demonstrated to promote collagen accumulation by increasing triple-helix hydroxylation in cartilage [69] and in cancer cells [70]. These findings are comparable to our current observations. Therefore, the pathway by which insulin triggers cartilage-resembling ECM accumulation in ATDC5 cells is likely to mimic, in a simplified environment, the metabolic control exerted over collagen production *in vivo*. The manageability of the model, residing in its simple cellular nature and induction by a single exogenous factor, may facilitate further characterization of the mechanisms involved.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** we are grateful to Frédéric Cailotto and David Moulin, from our laboratory, for their critical reading of the manuscript.

**DECLARATION OF INTEREST:** none.

*Formatting of funding sources:* This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## 8. 5. BIBLIOGRAPHY

- [1] Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123:4195-200.
- [2] Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci.* 2007;120:1955-8.
- [3] Hudson DM, Garibov M, Dixon DR, Popowics T, Eyre DR. Distinct post-translational features of type I collagen are conserved in mouse and human periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2017;52:1042-9.
- [4] Jarvelainen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2009;61:198-223.
- [5] Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *Lancet.* 2016;387:1657-71.

- [6] Wenstrup RJ, Florer JB, Davidson JM, Phillips CL, Pfeiffer BJ, Menezes DW, et al. Murine model of the Ehlers-Danlos syndrome. col5a1 haploinsufficiency disrupts collagen fibril assembly at multiple stages. *J Biol Chem.* 2006;281:12888-95.
- [7] Schwarze U, Cundy T, Liu YJ, Hofman PL, Byers PH. Compound heterozygosity for a frameshift mutation and an upstream deletion that reduces expression of SERPINH1 in siblings with a moderate form of osteogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A.* 2019;179:1466-75.
- [8] Scietti L, Campioni M, Forneris F. SiMPLoD, a Structure-Integrated Database of Collagen Lysyl Hydroxylase (LH/PLOD) Enzyme Variants. *J Bone Miner Res.* 2019;34:1376-82.
- [9] Hudson DM, Joeng KS, Werther R, Rajagopal A, Weis M, Lee BH, et al. Post-translationally abnormal collagens of prolyl 3-hydroxylase-2 null mice offer a pathobiological mechanism for the high myopia linked to human LEPREL1 mutations. *J Biol Chem.* 2015;290:8613-22.
- [10] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:4-27.
- [11] Wu JJ, Weis MA, Kim LS, Eyre DR. Type III collagen, a fibril network modifier in articular cartilage. *J Biol Chem.* 2010;285:18537-44.
- [12] Hsueh MF, Khabut A, Kjellstrom S, Onnerfjord P, Kraus VB. Elucidating the Molecular Composition of Cartilage by Proteomics. *J Proteome Res.* 2016;15:374-88.
- [13] Eyre DR, Weis MA, Wu JJ. Advances in collagen cross-link analysis. *Methods.* 2008;45:65-74.
- [14] Heard ME, Besio R, Weis M, Rai J, Hudson DM, Dimori M, et al. Sc65-Null Mice Provide Evidence for a Novel Endoplasmic Reticulum Complex Regulating Collagen Lysyl Hydroxylation. *PLoS Genet.* 2016;12:e1006002.
- [15] Pyott SM, Schwarze U, Christiansen HE, Pepin MG, Leistriz DF, Dineen R, et al. Mutations in PPIB (cyclophilin B) delay type I procollagen chain association and result in perinatal lethal to moderate osteogenesis imperfecta phenotypes. *Hum Mol Genet.* 2011;20:1595-609.

- [16] Kalamajski S, Liu C, Tillgren V, Rubin K, Oldberg A, Rai J, et al. Increased Ctelopeptide cross-linking of tendon type I collagen in fibromodulin-deficient mice. *J Biol Chem.* 2014;289:18873-9.
- [17] Eyre DR, Weis MA. Bone collagen: new clues to its mineralization mechanism from recessive osteogenesis imperfecta. *Calcif Tissue Int.* 2013;93:338-47.
- [18] Mazzorana M, Snellman A, Kivirikko KI, van der Rest M, Pihlajaniemi T. Involvement of prolyl 4-hydroxylase in the assembly of trimeric minicollagen XII. Study in a baculovirus expression system. *J Biol Chem.* 1996;271:29003-8.
- [19] Fichard A, Tillet E, Delacoux F, Garrone R, Ruggiero F. Human recombinant alpha1(V) collagen chain. Homotrimeric assembly and subsequent processing. *J Biol Chem.* 1997;272:30083-7.
- [20] Lamberg A, Helaakoski T, Myllyharju J, Peltonen S, Notbohm H, Pihlajaniemi T, et al. Characterization of human type III collagen expressed in a baculovirus system. Production of a protein with a stable triple helix requires coexpression with the two types of recombinant prolyl 4-hydroxylase subunit. *J Biol Chem.* 1996;271:11988-95.
- [21] Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002;2:389-406.
- [22] Clancy BM, Johnson JD, Lambert AJ, Rezvankhah S, Wong A, Resmini C, et al. A gene expression profile for endochondral bone formation: oligonucleotide microarrays establish novel connections between known genes and BMP-2-induced bone formation in mouse quadriceps. *Bone.* 2003;33:46-63.
- [23] Kudelko M, Chan CW, Sharma R, Yao Q, Lau E, Chu IK, et al. Label-Free Quantitative Proteomics Reveals Survival Mechanisms Developed by Hypertrophic Chondrocytes under ER Stress. *J Proteome Res.* 2016;15:86-99.
- [24] Wilson R, Norris EL, Brachvogel B, Angelucci C, Zivkovic S, Gordon L, et al. Changes in the chondrocyte and extracellular matrix proteome during post-natal mouse cartilage development. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11:M111 014159.
- [25] Fernandes RJ, Schmid TM, Eyre DR. Assembly of collagen types II, IX and XI into nascent hetero-fibrils by a rat chondrocyte cell line. *Eur J Biochem.* 2003;270:3243-50.

- [26] Kerwar SS, Cardinale GJ, Kohn LD, Spears CL, Stassen FL. Cell-free synthesis of procollagen: L-929 fibroblasts as a cellular model for dermatosparaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70:1378-82.
- [27] Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y. A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. *Cell Differ Dev*. 1990;30:109-16.
- [28] Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y. Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. *J Cell Biol*. 1996;133:457-68.
- [29] Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. *J Bone Miner Res*. 1997;12:1174-88.
- [30] Akiyama H, Shigeno C, Hiraki Y, Shukunami C, Kohno H, Akagi M, et al. Cloning of a mouse smoothed cDNA and expression patterns of hedgehog signalling molecules during chondrogenesis and cartilage differentiation in clonal mouse EC cells, ATDC5. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;235:142-7.
- [31] Shukunami C, Akiyama H, Nakamura T, Hiraki Y. Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *FEBS Lett*. 2000;469:83-7.
- [32] Yao Y, Wang Y. ATDC5: an excellent in vitro model cell line for skeletal development. *J Cell Biochem*. 2013;114:1223-9.
- [33] Altaf FM, Hering TM, Kazmi NH, Yoo JU, Johnstone B. Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. *Eur Cell Mater*. 2006;12:64-9; discussion 9-70.
- [34] Newton PT, Staines KA, Spevak L, Boskey AL, Teixeira CC, Macrae VE, et al. Chondrogenic ATDC5 cells: an optimised model for rapid and physiological matrix mineralisation. *Int J Mol Med*. 2012;30:1187-93.
- [35] Chen L, Fink T, Zhang XY, Ebbesen P, Zachar V. Quantitative transcriptional profiling of ATDC5 mouse progenitor cells during chondrogenesis. *Differentiation*. 2005;73:350-63.

- [36] Chen L, Fink T, Ebbesen P, Zachar V. Temporal transcriptome of mouse ATDC5 chondroprogenitors differentiating under hypoxic conditions. *Exp Cell Res.* 2006;312:1727-44.
- [37] Zhai Z, Yao Y, Wang Y. Importance of suitable reference gene selection for quantitative RT-PCR during ATDC5 cells chondrocyte differentiation. *PLoS One.* 2013;8:e64786.
- [38] Henrionnet C, Gillet P, Mainard D, Vincourt JB, Pinzano A. Label-free relative quantification of secreted proteins as a non-invasive method for the quality control of chondrogenesis in bioengineered substitutes for cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12:e1757-e66.
- [39] Guibert M, Gasser A, Kempf H, Bianchi A. Fibroblast-growth factor 23 promotes terminal differentiation of ATDC5 cells. *PLoS One.* 2017;12:e0174969.
- [40] Riffault M, Moulin D, Grossin L, Mainard D, Magdalou J, Vincourt JB. Label-free relative quantification applied to LC-MALDI acquisition for rapid analysis of chondrocyte secretion modulation. *J Proteomics.* 2015;114:263-73.
- [41] Deutsch EW, Csordas A, Sun Z, Jarnuczak A, Perez-Riverol Y, Ternent T, et al. The ProteomeXchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D1100-D6.
- [42] Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D442-D50.
- [43] Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta.* 1986;883:173-7.
- [44] Vincourt JB, Etienne S, Cottet J, Delaunay C, Malanda CB, Lionneton F, et al. Cpropeptides of procollagens I alpha 1 and II that differentially accumulate in enchondromas versus chondrosarcomas regulate tumor cell survival and migration. *Cancer Res.* 2010;70:4739-48.
- [45] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4:44-57.

- [46] Maeda N, Hagihara H, Nakata Y, Hiller S, Wilder J, Reddick R. Aortic wall damage in mice unable to synthesize ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:841-6.
- [47] McAlinden A, Traeger G, Hansen U, Weis MA, Ravindran S, Wirthlin L, et al. Molecular properties and fibril ultrastructure of types II and XI collagens in cartilage of mice expressing exclusively the alpha1(IIA) collagen isoform. *Matrix Biol*. 2014;34:105-13.
- [48] Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol*. 2001;12:69-78.
- [49] Miyahara M, Njieha FK, Prockop DJ. Formation of collagen fibrils in vitro by cleavage of procollagen with procollagen proteinases. *J Biol Chem*. 1982;257:8442-8.
- [50] Hojima Y, van der Rest M, Prockop DJ. Type I procollagen carboxyl-terminal proteinase from chick embryo tendons. Purification and characterization. *J Biol Chem*. 1985;260:159966003.
- [51] Van der Rest M, Rosenberg LC, Olsen BR, Poole AR. Chondrocalcin is identical with the C-propeptide of type II procollagen. *Biochem J*. 1986;237:923-5.
- [52] Dombrowski KE, Prockop DJ. Cleavage of type I and type II procollagens by type I/II procollagen N-proteinase. Correlation of kinetic constants with the predicted conformations of procollagen substrates. *J Biol Chem*. 1988;263:16545-52.
- [53] Song E, Mechref Y. LC-MS/MS identification of the O-glycosylation and hydroxylation of amino acid residues of collagen alpha-1 (II) chain from bovine cartilage. *J Proteome Res*. 2013;12:3599-609.
- [54] Barnes MJ. Function of ascorbic acid in collagen metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 1975;258:264-77.
- [55] Zhang Y, Yang TL, Li X, Guo Y. Functional analyses reveal the essential role of SOX6 and RUNX2 in the communication of chondrocyte and osteoblast. *Osteoporos Int*. 2015;26:553-61.
- [56] Lodewyckx L, Cailotto F, Thyssen S, Luyten FP, Lories RJ. Tight regulation of wingless-type signaling in the articular cartilage - subchondral bone biomechanical unit: transcriptomics in Frzb-knockout mice. *Arthritis Res Ther*. 2012;14:R16.

- [57] Castano Betancourt MC, Cailotto F, Kerkhof HJ, Cornelis FM, Doherty SA, Hart DJ, et al. Genome-wide association and functional studies identify the DOT1L gene to be involved in cartilage thickness and hip osteoarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:8218-23.
- [58] Taylor DW, Ahmed N, Parreno J, Lunstrum GP, Gross AE, Diamandis EP, et al. Collagen type XII and versican are present in the early stages of cartilage tissue formation by both redifferentating passaged and primary chondrocytes. *Tissue Eng Part A*. 2015;21:683-93.
- [59] Rocha B, Calamia V, Casas V, Carrascal M, Blanco FJ, Ruiz-Romero C. Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. *J Proteome Res*. 2014;13:1045-54.
- [60] Eyre DR, Apon S, Wu JJ, Ericsson LH, Walsh KA. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage. *FEBS Lett*. 1987;220:337-41.
- [61] Brachvogel B, Zaucke F, Dave K, Norris EL, Stermann J, Dayakli M, et al. Comparative proteomic analysis of normal and collagen IX null mouse cartilage reveals altered extracellular matrix composition and novel components of the collagen IX interactome. *J Biol Chem*. 2013;288:13481-92.
- [62] Temu TM, Wu KY, Gruppuso PA, Phornphutkul C. The mechanism of ascorbic acid-induced differentiation of ATDC5 chondrogenic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E325-34.
- [63] Malfait F, Symoens S, Goemans N, Gyftodimou Y, Holmberg E, Lopez-Gonzalez V, et al. Helical mutations in type I collagen that affect the processing of the amino-propeptide result in an Osteogenesis Imperfecta/Ehlers-Danlos Syndrome overlap syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8:78.
- [64] Cabral WA, Makareeva E, Colige A, Letocha AD, Ty JM, Yeowell HN, et al. Mutations near amino end of alpha1(I) collagen cause combined osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome by interference with N-propeptide processing. *J Biol Chem*. 2005;280:19259-69.
- [65] Prockop DJ, Sieron AL, Li SW. Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. *Matrix Biol*. 1998;16:399-408.

- [66] Berg RA, Prockop DJ. 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.* 1973;52:115-20.
- [67] Clark CC, Richards CF. Underhydroxylated minor cartilage collagen precursors cannot form stable triple helices. *Biochem J.* 1988;250:65-70.
- [68] Parsons KK, Maeda N, Yamauchi M, Banes AJ, Koller BH. Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:E1131-9.
- [69] Stegen S, Laperre K, Eelen G, Rinaldi G, Fraisl P, Torrekens S, et al. HIF-1alpha metabolically controls collagen synthesis and modification in chondrocytes. *Nature.* 2019;565:511-5.
- [70] Elia I, Rossi M, Stegen S, Broekaert D, Doglioni G, van Gorsel M, et al. Breast cancer cells rely on environmental pyruvate to shape the metastatic niche. *Nature.* 2019;568:117-21.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Proteins found modulated in the secretomes of the ATDC5 model.** A. Gene Ontology focused on biological process of the significantly overrepresented terms in ATDC5 undergoing chondrogenic differentiation (FDR <0.005). Only the four highest overrepresented terms for biological process category are shown. Numbers embedded in the bars indicate the percentage of involved proteins within a term among all proteins within our data set. B. Time-dependent regulation of secreted proteins of iATDC5 versus cATDC5 are hierarchically clustered in the form of a two-dimensional heat map. Protein abbreviations are according to the Uniprot database. The scale bar indicates color coding in the range from one hundred-fold down-regulation to one hundred-fold up-regulation. Lost and new proteins were found only in cATDC5 or iATDC5, respectively. Note that proteins found unregulated at any time point were not listed here. Proteins reported in either [23, 24, 36] are highlighted in blue, grey and purple respectively. Lack of data is indicated by white boxes. Proteins implicated in at least one of four described biological processes are in bold. The whole output data are listed in Supplemental data S.2.

**Figure 2: The overall ATDC5 phenotype revealed by guanidine extract analysis.** A. Examination of the protein content of guanidine extracts obtained at major time points by SDS-PAGE coupled to Coomassie staining. The pattern shown here are representative of all replicates. This panel highlights the low content of extracts obtained at early time-points in cATDC5 and also serves as loading controls for panel C. B. The regulations of iATDC5 versus cATDC5 guanidine extracts are hierarchically clustered in the form of a twodimensional heat map. Protein abbreviations are according to the Uniprot database. The scale bar indicates color coding in the range from one hundred-fold down-regulation to one hundred-fold up-regulation. Lost and New proteins are found only in cATDC5 or iATDC5, respectively. Lack of data is indicated by white boxes. Note that proteins found unregulated at any time point were not listed here. The whole output data are listed in Supplemental data S.3. Proteins reported in either [23, 24, 36] are highlighted in blue, grey and purple respectively. C. Examination by SDS-PAGE coupled to dMMB staining of the PG content of guanidine extracts obtained from iATDC5 at day 14 and 35, compared to chondroitin sulfate standards, guanidine extracts prepared from bovine articular cartilage as positive control and cATDC5 at day 35 as negative control, with or without proteinase K treatment.

**Figure 3: Profound and biologically relevant regulation of collagen assembly by iATDC5 cells as revealed by CNBr extract analysis.** A. Number of identified peptides (mascot score > 35) in CNBr extracts from iATDC5 at day 14. The corresponding output data are listed in Supplemental data S.4. B. Time-dependent regulations of CNBr extract contents during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. The regulation profiles of proteins found in CNBr extracts of iATDC5 versus cATDC5 are hierarchically clustered in the form of a twodimensional heat map. The scale bar indicates color-coding in the range from one hundredfold down-regulation to one hundred-fold up-regulation. Lost proteins are only identified in cATDC5, while new proteins are only identified in iATDC5. Lack of data is indicated by white boxes. Note that proteins found unregulated at any time point were not listed here. The corresponding output data are listed in Supplemental data S. 5. C.  $\beta$ APN fully inhibits collagen crosslinking. ATDC5 chondrogenesis was induced by insulin with or without  $\beta$ APN, and cultures were analyzed for the production of covalently cross-linked ECM (bottom panel) and of non-crosslinked ECM (top panel) by SDS-PAGE coupled to Coomassie staining. Results shown here are from one replicate obtained from iATDC5 at day 21, but are representative of the whole experiment. The major content, as determined by mass spectrometry of tryptic peptides, of most prominent bands were annotated. In the bottom panel, annotations are according to the collagen cyanogen bromide peptide nomenclature.

**Figure 4. PTMs of type II collagen synthesized by iATDC5.** Residues are numbered according to their position in CO2A1 precursor of mouse and bovine origin as annotated in the UniprotKB database. The PTMs annotated here for the bovine protein are according to 23879958 and serve as comparison to those found here in iATDC5. Residues annotated in grey correspond to peptides which were not identified. Residues annotated in italic correspond to peptides which were identified only from secretome analysis, the others being from CNBr extracts. Residues in red were found hydroxylated and those underlined were optionally modified. The prolines in green were found hydroxylated but not conserved between species. Yellow circles indicate lysine galactosylation and blue circles indicate additional glucosylation. Arrows indicate the theoretical proteolytic cleavage sites by N- and Cproteinases, respectively [50-52], respectively, the two of which were confirmed from secretome analysis in the present study. The PTM residue positions shown here are those matching best peptide Mascot scores according to MSMS fragmentation. Many of the peptides were identified under several versions differing by the number of PTMs and there were cases of peptide versions for which the exact residue position of a given PTM could not be certified. In such cases, the PTM localization was

considered more likely at a position found in other versions of the same peptide. The double arrows show a situation where the exact PTM localization could not be discriminated. The corresponding output data are listed in Supplemental data S.6 and Supplemental data S.7.

**Figure 5: Collagen assembly is timely correlated to procollagen maturation rather than to gene/protein precursor expression.** A. CNBr protein content examination by SDS-PAGE coupled to Coomassie staining. Most intense bands observed in the last lane are annotated with the major CNBr-generated fragments found when investigating their content by tryptic fingerprinting according to the collagen cyanogen bromide peptide nomenclature. X indicates that the annotated fragment is presumably crosslinked according to its electrophoretic mobility. B. mRNA expression of *COL1A1* through the experiment. C. Primary sequence of selected regions of CO1A1 and CO1A2 chains, showing MS-identified peptides (underlined and numbered from 1 to 4) demonstrating the N-terminal and C-terminal cleavage sites (left panel). Peptide regulation folds at day 14 of the experiment in iATDC5 versus cATDC5 were quantified (right panel). D. Examination of Type I procollagen processing by western blotting analysis of secretomes with an antibody directed against the C-propeptide of chain I $\alpha$ 1. CPI: cleaved C-propeptide; pro I $\alpha$ 1: type I $\alpha$ 1 procollagen; pC-pro I $\alpha$ 1: type I $\alpha$ 1 procollagen cleaved at the N-propeptide only. E. Triple helix hydroxylation regulation in iATDC5. Changes in the different chemical states of a representative peptide, corresponding to positions 501-527 of the CO1A1 precursor. Numbers in the peptide sequence indicate the positions at which hydroxylations are evidenced in the distinct versions of the peptide, with n being the minimal number of hydroxylations to be carried by the peptide for the corresponding residue to be found hydroxylated. The peptide was never found with exactly 3 hydroxylations. Double arrows indicate situations where the exact position could not be ascertained based on MS/MS fragmentation. In C & E, bars indicate average ratios +CV over iATDC5 group and -CV over cATDC5 group. Asterisks indicate a statistically significant difference (t-test \*:  $p$ -value < 0.05; \*\*:  $p$ -value < 0.01; \*\*\*:  $p$ -value < 0.001).  $\phi$  : undetectable in either group. The corresponding output data are listed in Supplemental data S.7.

**Figure 6. Summary of procollagen processing events in the model.** Boxed numbers indicate the consecutive steps demonstrated here. **1.** triple-helix hydroxylation is massively induced in iATDC5 versus cATDC5, while cultured in DMEM/F12 lacking ascorbate, as shown in figure 5. E, days 3 and 14; once grown in  $\alpha$ MEM which contains ascorbate, cATDC5 become hydroxylation-competent, as shown in figure 5. E, day 35. The notion of hydroxylation-dependent triple helix stabilization is mostly from [66, 67] **2.** N-propeptide cleavage largely

increases in iATDC5 versus cATDC5 as shown in figure 5. C for day 14 and this is a likely consequence of triple helix stabilization according to [65]. **3.** In contrast, Cpropeptide cleavage is observed in both iATDC5 and cATDC5 (figure 5. D) and not found significantly regulated between the two (figure 5. C), again in accordance to [65]. **4.** iATDC5 deposit cross-linked collagen at all time-points while cATDC5 do so only once grown in  $\alpha$ MEM as shown in figure 5.A. Cross-linking is LOX-dependent as shown in figure 3. C.

Figure 1

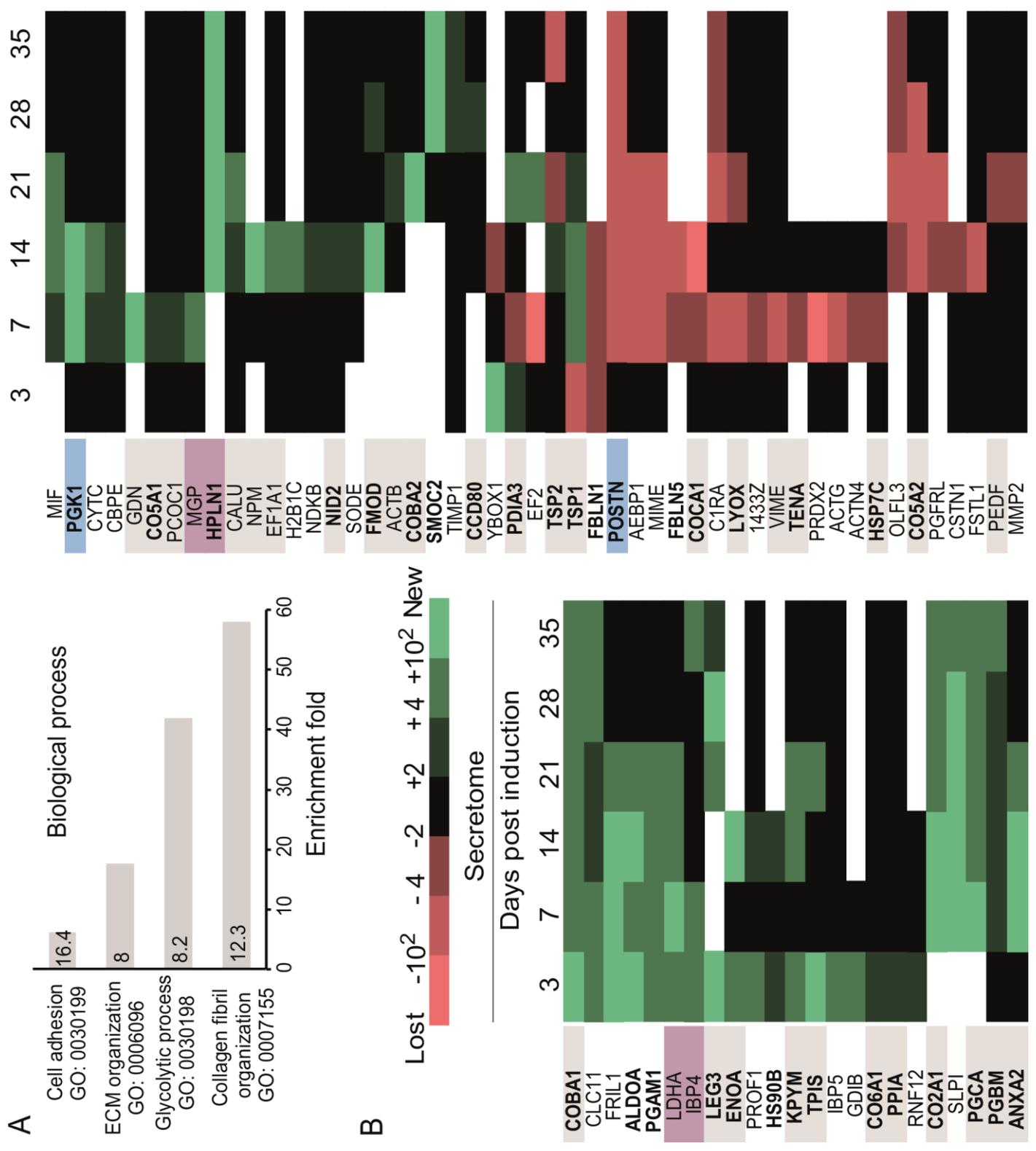


Figure 1.

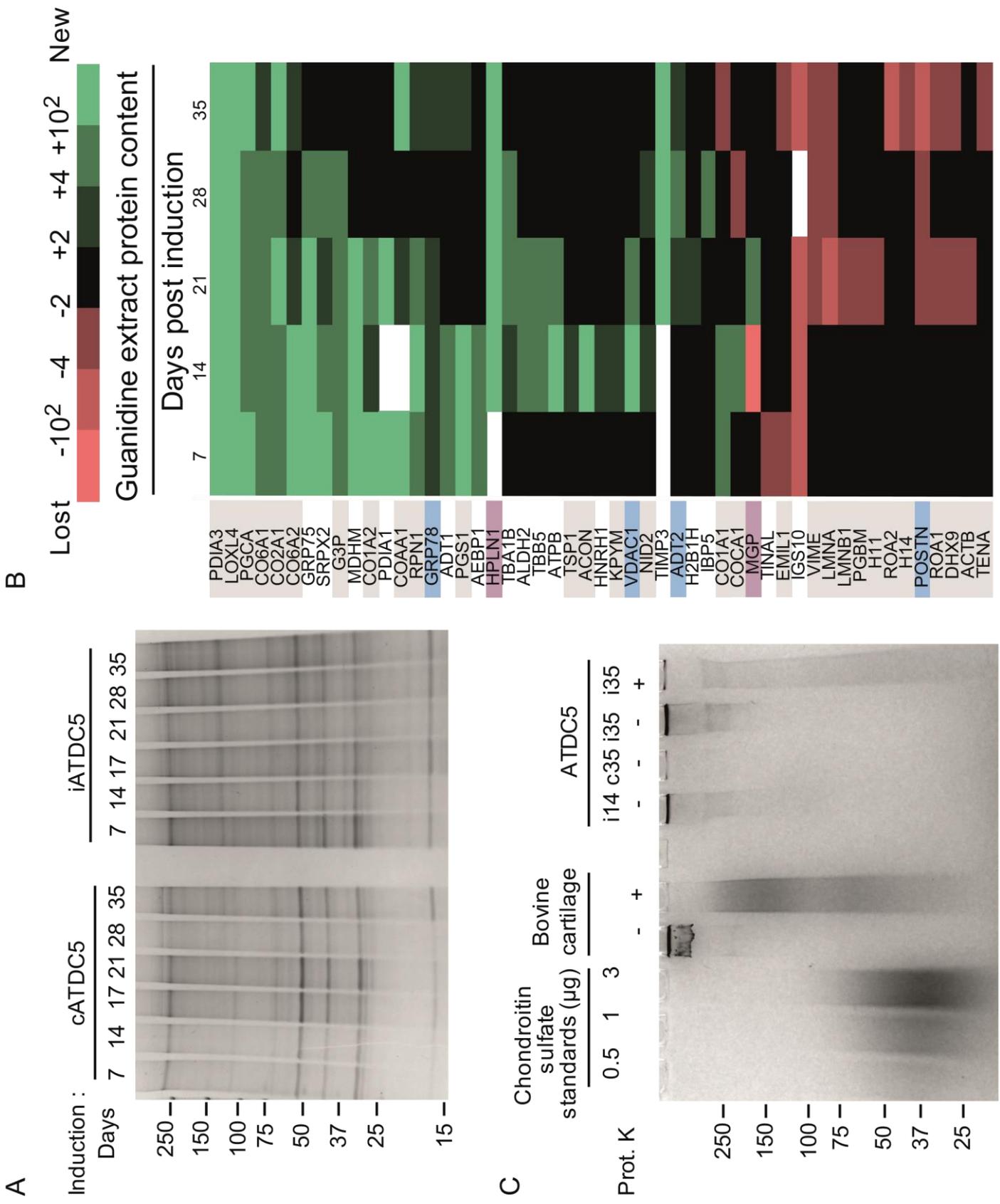
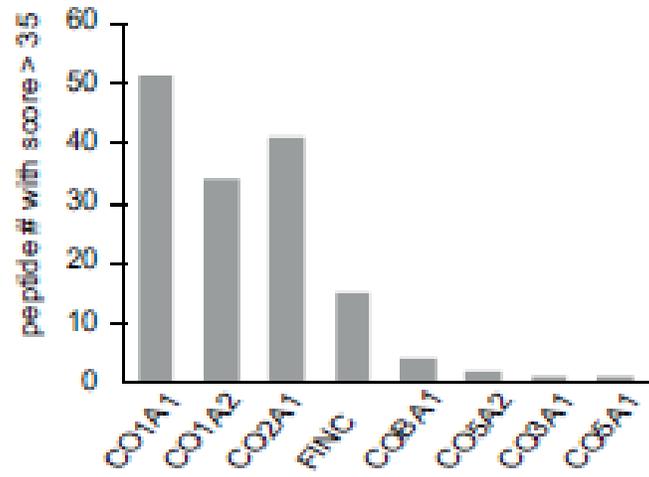
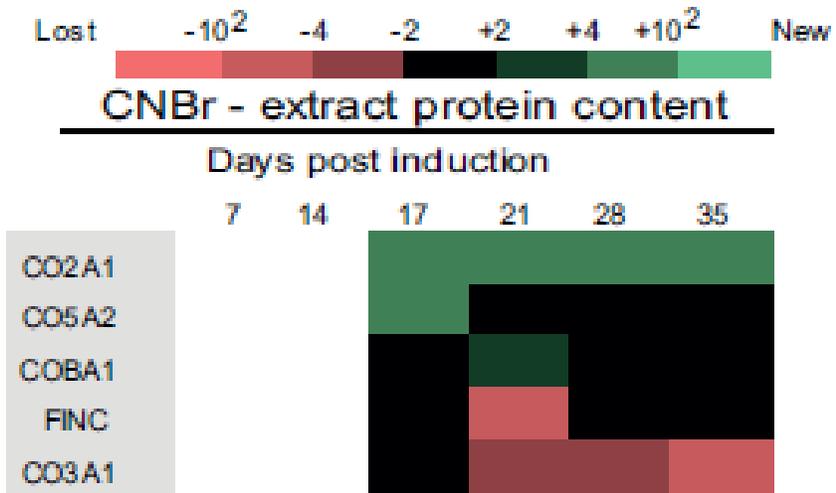


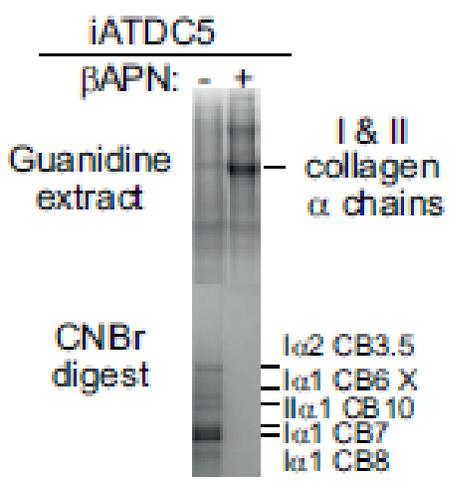
Figure 2.



**B**



**C**



**Figure 3.**

iATDC5	140	GEKGAPGPRG	RDGE <u>P</u> GT <u>P</u> GN	<u>P</u> G <u>P</u> AG <u>P</u> P <u>P</u> G <u>P</u> P	<u>G</u> P <u>P</u> GLSAGNF	AAQMAAGGYDE	KAGGAQMGVM	QGPMGPMGPR	
bovine	141	GEKGAPGPRG	RDGE <u>P</u> GT <u>P</u> GN	<u>P</u> G <u>P</u> P <u>P</u> G <u>P</u> P <u>P</u>	<u>G</u> P <u>P</u> GLG_GNF	AAQMAAGGFDE	KAGGAQMGVM	QGPMGPMGPR	
<b>N-proteinase</b> ▲									
iATDC5	210	GPPG <u>P</u> AG <u>P</u> AG	<u>P</u> QGFQGN <u>P</u> GE	<u>P</u> GE <u>P</u> GVSGEM	GPR <u>G</u> P <u>P</u> G <u>P</u> AG	<u>K</u> P <u>G</u> DDGEAGK	<u>P</u> G <u>K</u> SGERGL <u>P</u>	<u>G</u> P <u>Q</u> GARG <u>F</u> P <u>G</u>	
bovine	210	GPPG <u>P</u> AG <u>P</u> AG	<u>P</u> QGFQGN <u>P</u> GE	<u>P</u> GE <u>P</u> GVSGEM	GPR <u>G</u> P <u>P</u> G <u>P</u> AG	<u>K</u> P <u>G</u> DDGEAGK	<u>P</u> G <u>K</u> SGER <u>G</u> P	<u>G</u> P <u>Q</u> GARG <u>F</u> P <u>G</u>	
iATDC5	280	TFGL <u>P</u> GVK <u>G</u> H	RGYP <u>G</u> LDGAK	GEAGAPGVK <u>G</u>	ESGSPGENG <u>S</u>	PGPMGPRGL <u>P</u>	GERGRTGPAG	AAGARGNDGQ	
bovine	280	TFGL <u>P</u> GVK <u>G</u> H	RGYP <u>G</u> LDGAK	GEAGAPGVK <u>G</u>	ESGSPGENG <u>S</u>	PGPMGPRGL <u>P</u>	GERGRTGPAG	AAGARGNDGQ	
iATDC5	350	PGPAG <u>P</u> P <u>G</u> PV	GPAGG <u>P</u> G <u>F</u> PG	APGAKGEAG <u>P</u>	TGARGPEGA <u>Q</u>	GSRGE <u>P</u> GN <u>P</u> G	SPGPAGASGN	PGTDGI <u>P</u> GAK	
bovine	350	PGPAG <u>P</u> P <u>G</u> PV	GPAGG <u>P</u> G <u>F</u> PG	APGAKGEAG <u>P</u>	TGARGPEGA <u>Q</u>	GPRGE <u>P</u> GT <u>P</u> G	SPGPAGA <u>G</u> SN	PGTDGI <u>P</u> GAK	
iATDC5	420	GSAGAPGIAG	AP <u>G</u> F <u>P</u> GPR <u>G</u> P	<u>P</u> G <u>P</u> QATG <u>P</u> L	GPKQAGE <u>P</u> G	IAGFKGDQ <u>G</u> P	KGETGPAG <u>P</u> Q	GAPGPAGE <u>R</u> G	
bovine	420	GSAGAPGIAG	AP <u>G</u> F <u>P</u> GPR <u>G</u> P	<u>P</u> G <u>P</u> QATG <u>P</u> L	GPKQATG <u>E</u> PG	IAGFKGEQ <u>G</u> P	KGE <u>P</u> GPA <u>G</u> PQ	GAPGPAGE <u>R</u> G	
iATDC5	490	KRGARGE <u>P</u> G	AG <u>P</u> I <u>G</u> PP <u>G</u> ER	GA <u>P</u> GNR <u>G</u> F <u>P</u> G	QDGLAG <u>P</u> KGA	<u>P</u> GER <u>G</u> PSGLT	GPKGANG <u>D</u> PG	RPGE <u>P</u> GL <u>P</u> GA	
bovine	490	KRGARGE <u>P</u> G	AG <u>P</u> AG <u>P</u> PP <u>G</u> ER	GA <u>P</u> GNR <u>G</u> F <u>P</u> G	QDGLAG <u>P</u> KGA	<u>P</u> GER <u>G</u> PSGLA	GPKGANG <u>D</u> PG	RPGE <u>P</u> GL <u>P</u> GA	
iATDC5	560	RGLTGR <u>P</u> GDA	GPQGV <u>P</u> SG	AP <u>G</u> EDGR <u>P</u> G	<u>P</u> G <u>P</u> QARG <u>Q</u> P	GVMGF <u>P</u> GPKG	ANGE <u>P</u> GKAGE	KGLAG <u>P</u> GLR	
bovine	560	RGLTGR <u>P</u> GDA	GPQGV <u>P</u> SG	AP <u>G</u> EDGR <u>P</u> G	<u>P</u> G <u>P</u> QARG <u>Q</u> P	GVMGF <u>P</u> GPKG	ANGE <u>P</u> GKAGE	KGL <u>P</u> GA <u>P</u> GLR	
iATDC5	630	GL <u>P</u> GKDGETG	AAG <u>P</u> G <u>P</u> SGP	AGERGBQAG	<u>G</u> PSGPQGL <u>P</u> G	PPGPPGEGGK	QGDQGI <u>P</u> GEA	GAPGLV <u>G</u> PRG	
bovine	630	GL <u>P</u> GKDGETG	AAG <u>P</u> G <u>P</u> AG <u>P</u>	AGERGBQAG	<u>G</u> PSGPQGL <u>P</u> G	PPGPPGEGGK	<u>P</u> GDQGV <u>P</u> GEA	GAPGLV <u>G</u> PRG	
iATDC5	700	ERGF <u>P</u> GERGS	PGAQGLQ <u>G</u> PR	GLPGT <u>P</u> GT <u>D</u> G	PKGAAG <u>P</u> DGP	PGAQGP <u>P</u> GLQ	GMPGERGAAG	IAG <u>P</u> KGDRGD	
bovine	700	ERGF <u>P</u> GERGS	PGSQGLQ <u>G</u> AR	GLPGT <u>P</u> GT <u>D</u> G	PKGAAG <u>P</u> PAG <u>P</u>	PGAQGP <u>P</u> GLQ	GMPGERGAAG	IAG <u>P</u> KGDRGD	
iATDC5	770	VGEKG <u>P</u> EGAP	GKDGG <u>R</u> GLTG	PI <u>G</u> PP <u>G</u> PAG	NGEKGEV <u>G</u> PP	GPSGSTGARG	APGERGETG <u>P</u>	PGPAG <u>F</u> AG <u>P</u> P	
bovine	770	VGEKG <u>P</u> EGAP	GKDGG <u>R</u> GLTG	PI <u>G</u> PP <u>G</u> PAG	NGEKGEV <u>G</u> PP	GPAGTAGARG	APGERGETG <u>P</u>	PGPAG <u>F</u> AG <u>P</u> P	
iATDC5	840	GADGQ <u>P</u> GAKG	DQGEAGQ <u>K</u> GD	AGAPG <u>P</u> QGPS	GAP <u>G</u> PQGP <u>T</u> G	VTGPKGARGA	QGP <u>P</u> GATG <u>F</u> P	GAAGR <u>V</u> G <u>P</u> PG	
bovine	840	GADGQ <u>P</u> GAKG	EQGEAGQ <u>K</u> GD	AGAPG <u>P</u> QGPS	GAP <u>G</u> PQGP <u>T</u> G	VTGPKGARGA	QGP <u>P</u> GATG <u>F</u> P	GAAGR <u>V</u> G <u>P</u> PG	
iATDC5	910	ANGN <u>P</u> G <u>P</u> AGP	PG <u>P</u> AGKD <u>G</u> PK	GVRGDS <u>G</u> PPG	PAG <u>D</u> P <u>G</u> LQ <u>G</u> P	AGA <u>P</u> GE <u>K</u> GE <u>P</u>	GDDG <u>P</u> SGLDG	PPG <u>P</u> QGLAGQ	
bovine	910	SNGN <u>P</u> G <u>P</u> PGP	PG <u>P</u> SGKD <u>G</u> PK	GARGDS <u>G</u> PPG	PAG <u>D</u> P <u>G</u> LQ <u>G</u> P	AG <u>P</u> GE <u>K</u> GE <u>P</u>	GDDG <u>P</u> S <u>G</u> PDG	PPG <u>P</u> QGLAGQ	
iATDC5	980	RGIVGL <u>P</u> GQR	GERGF <u>P</u> GL <u>P</u> G	PSGE <u>P</u> GKQGA	PGA <u>S</u> GDRG <u>P</u> P	GPVGP <u>P</u> GLT <u>G</u>	PAGE <u>P</u> GRE <u>G</u> S	PGADG <u>P</u> GRD	
bovine	980	RGIVGL <u>P</u> GQR	GERGF <u>P</u> GL <u>P</u> G	PSGE <u>P</u> GKQGA	PGA <u>S</u> GDRG <u>P</u> P	GPVGP <u>P</u> GLT <u>G</u>	PAGE <u>P</u> GRE <u>G</u> S	PGADG <u>P</u> GRD	
iATDC5	1050	GAAGVKGDRG	ETGALGAP <u>G</u> A	<u>P</u> G <u>P</u> P <u>G</u> SPGPA	GPTGKQGD <u>R</u> G	EAGAQQG <u>P</u> MG <u>P</u>	SGPAGARGIA	GPQG <u>R</u> RGDKG	
bovine	1050	GAAGVKGDRG	ETGAVGAP <u>G</u> A	<u>P</u> G <u>P</u> P <u>G</u> SPGPA	GPIGKQGD <u>R</u> G	EAGAQQG <u>P</u> MG <u>P</u>	AG <u>P</u> AGARG <u>M</u> P	GPQG <u>R</u> RGDKG	
iATDC5	1120	ESGRQGERGL	KGHRGFTG <u>L</u> Q	GL <u>P</u> G <u>P</u> P <u>G</u> PSG	DQGASG <u>P</u> AG <u>P</u>	SGPRG <u>P</u> AG <u>P</u> V	GPSKDG <u>S</u> NG	I <u>P</u> G <u>P</u> IG <u>P</u> PGP	
bovine	1120	ETGEAGERGL	KGHRGFTG <u>L</u> Q	GL <u>P</u> G <u>P</u> P <u>G</u> PSG	DQGASG <u>P</u> AG <u>P</u>	SGPRG <u>P</u> AG <u>P</u> V	GPSKDG <u>G</u> ANG	I <u>P</u> G <u>P</u> IG <u>P</u> PGP	
<b>C-proteinase</b> ▼									
iATDC5	1190	RGRSGETGPV	GPPGS <u>P</u> G <u>P</u> PG	PPGPPG <u>P</u> GID	MSAFAGLGQR	EKG <u>P</u> DP <u>P</u> QYM	RADEAD <u>S</u> TLR	QHDVEVDATLK	
bovine	1190	RGRSGETGPA	GPPGN <u>P</u> G <u>P</u> PG	PPGPPG <u>P</u> GID	MSAFAGLGQR	EKG <u>P</u> DP <u>P</u> QYM	RADEAAG <u>N</u> LR	QHDAEVDATLK	

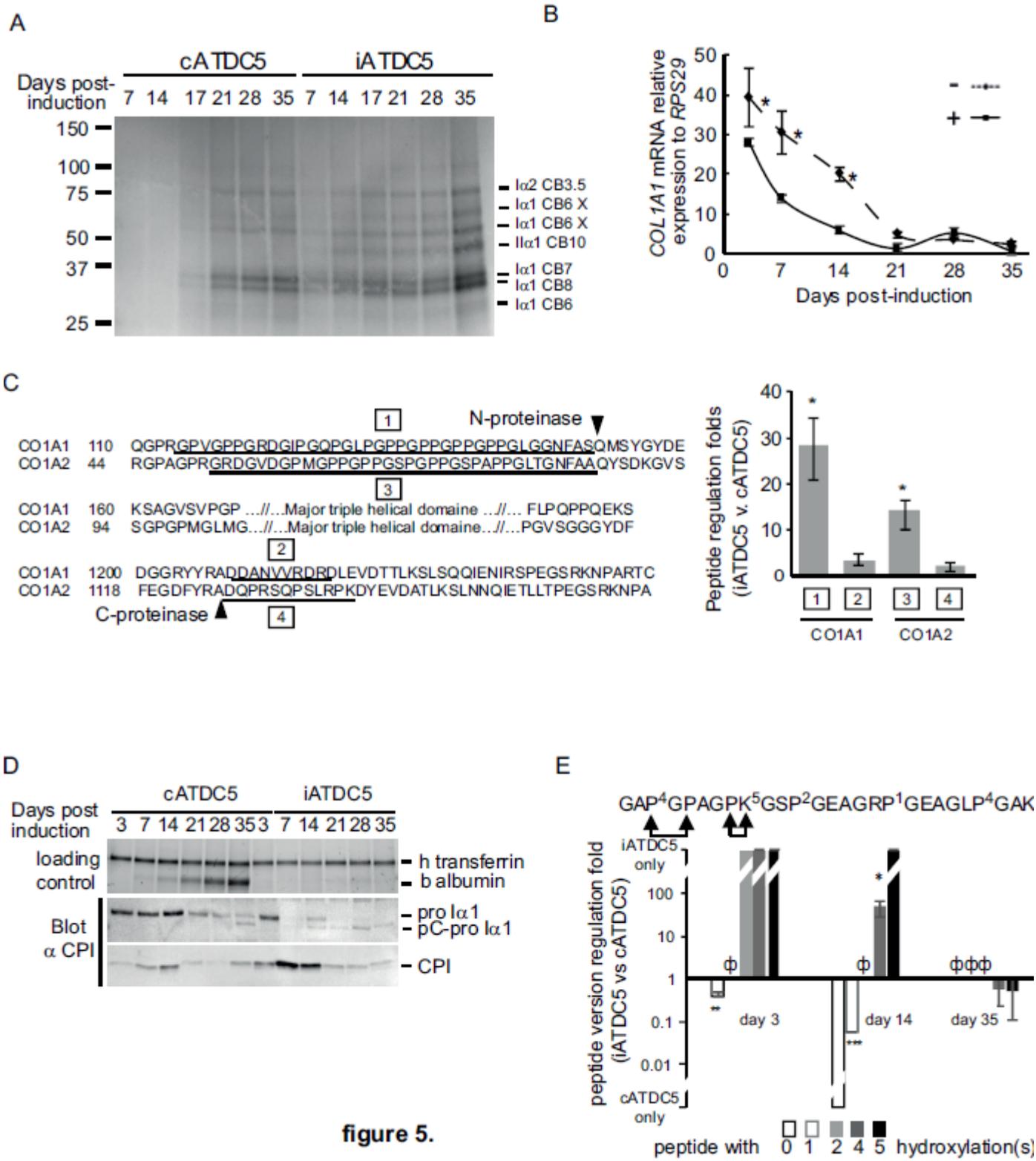
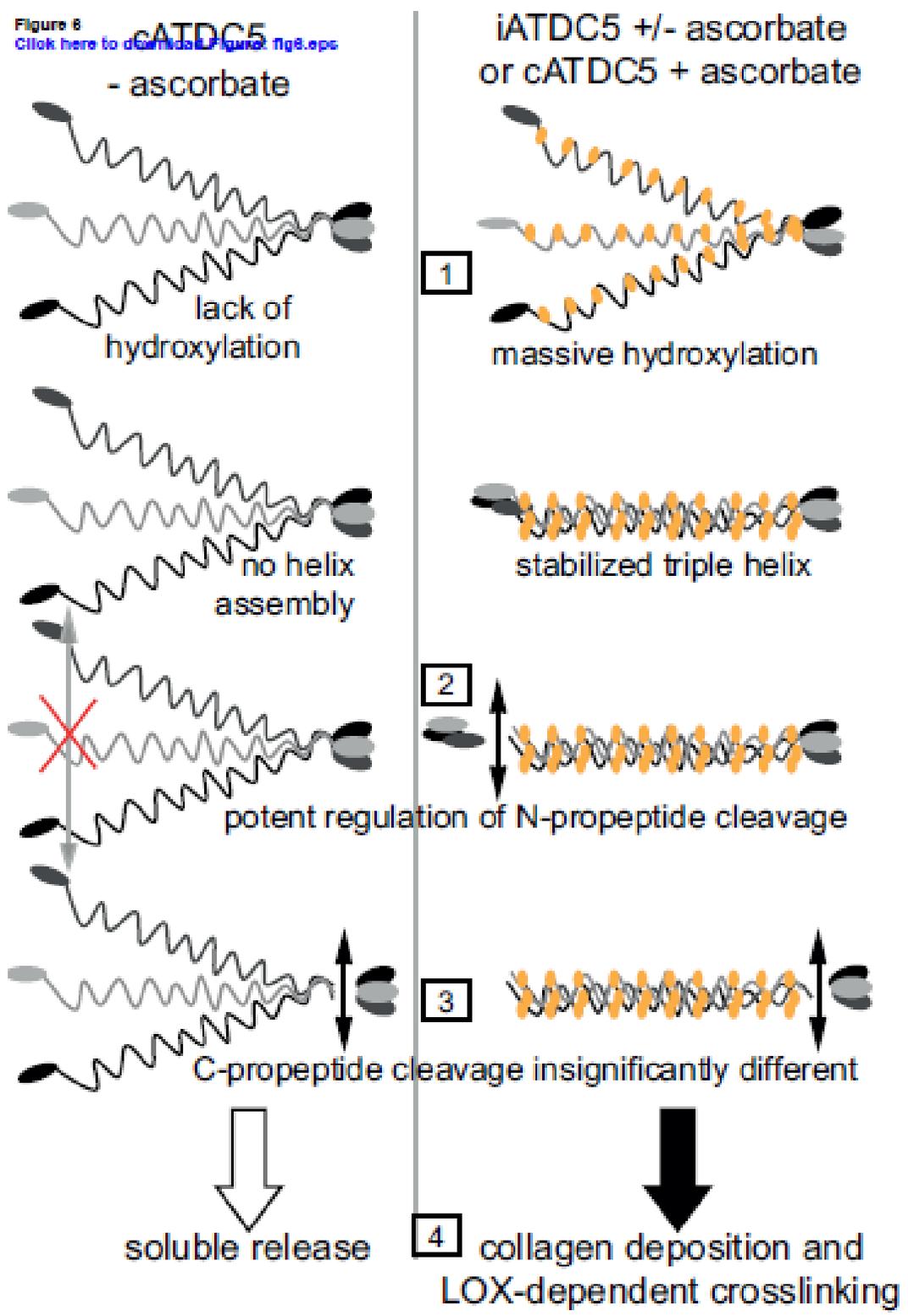


Figure 6  
[Click here to download Figure fig6.epc](#)



**figure 6**









## ABSTRACT

Endochondral ossification is the mechanism by which long bones of Vertebrates grow. It requires chondrogenesis, that is, the locally and timely organized differentiation of growth plate chondrocytes, for the formation of a primary cartilage pattern, which is later replaced by bone. Chondrogenesis relies on the production of a dedicated collagen (especially type II) - rich extracellular matrix (ECM), which will then mineralize, and many aspects of which remain difficult to characterize, notably because *in vivo* models lack handiness and *in vitro* models recapitulating their complexity are lacking. A protein, Chondrocalcin, corresponding to the C-propeptide of type II collagen (CPII), is a component of joint and growth plate cartilage, and has been described as involved in the mineralization process of the latter. On the other hand, to what extent and how CPII would regulate mineralization remains to be specified.

The ATDC5 cell line exhibits an undifferentiated state and high proliferative ability when maintained in culture, but engages into a differentiation program resembling the multistep chondrogenic differentiation observed *in vivo* when stimulated with insulin. Although this cell line is widely used, its proteome is barely described. In order to define to what extent this model recapitulates the main aspects of cartilage ECM formation, we have performed a time-resolved proteome analysis of differentiating ATDC5 cells focused on the ECM and the level of maturation of its main components by LC-MALDI-TOF / TOF. In addition to protein regulations suggesting that the differentiation of ATDC5 involves early and significant reprogramming of metabolic pathways, these cells synthesize and gradually integrate into their ECM a wide range of cartilage components. Remarkably, aggrecan and type II collagen appear to carry most of their maturations described *in vivo*. More importantly, collagen accumulation in the ECM is correlated with major maturation events, including proteolytic cleavages and triple helix hydroxylations, rather than with gene expression or precursor protein synthesis.

The ATDC5 cells synthesize and integrate CPII into their ECM instantly following the induction of mineralization in this model, and express all the machinery for assembling and modifying collagens. We have shown in *pull-down* assays performed in this model that CPII, unlike its counterparts of type I and III procollagens (CPI and CPIII respectively), did not directly interact with PCPE-1, the BMP-1 activator, suggesting mechanistic differences between the maturations process of the corresponding procollagens. In addition, these results are consolidated by additional *in vivo* studies of CPII, as purified from bovine growth and joint cartilage, confirming that two CPII cleavage sites coexist and demonstrating for the first time that CPII trimers contain all four possible combinations of the two cleavage sites. These data suggest that each monomer within the trimer is cleaved independently of the others. In addition, in primary cultures of human chondrocytes, pharmacological inhibition of BMP-1 modestly affects the cleavage of CPII, unlike CPI, but seems to favor its matrix integration. Overall, this work highlights CPII cleavage mechanism as distinct from that of CPI and CPIII and more complex than anticipated.

Functional characterization of key events of ECM elaboration in ATDC5 cells should allow better dissecting the mechanisms of chondrogenesis and cartilage mineralization.

## RESUME

L'ossification endochondrale est le mécanisme par lequel les os longs se développent chez les Vertébrés. Elle nécessite la chondrogenèse, c'est-à-dire la différenciation coordonnée de manière spatiotemporelle des chondrocytes de la plaques de croissance, pour la formation d'un patron cartilagineux primaire, qui est ensuite remplacé par l'os. Elle repose sur la production d'une matrice extracellulaire (MEC) dédiée riche en collagènes (notamment de type II) qui va ensuite minéraliser et dont de nombreux aspects restent difficiles à caractériser, notamment parce que les modèles *in vivo* manquent de maniabilité et que les modèles *in vitro* font défaut. Une protéine, Chondrocalcine, correspondant au C-propeptide du collagène de type II (CPII), est un composant des cartilages articulaire et de croissance, et a été décrite comme impliquée dans le processus de minéralisation de ce dernier. En revanche, dans quelle mesure et par quel mécanisme CPII régulerait la minéralisation restent à préciser.

La lignée cellulaire ATDC5 présente un état indifférencié et une capacité proliférative élevée lorsqu'elle est maintenue en culture, mais s'engage dans un programme de différenciation séquentiel semblable à la chondrogenèse *in vivo* après stimulation à l'insuline. Bien que cette lignée soit largement utilisée, son protéome est à peine décrit. Afin de définir à quel point ce modèle récapitule les principaux aspects de la formation de la MEC du cartilage, nous avons effectué une analyse temporelle par LC-MALDI-TOF / TOF de la régulation du protéome, axée sur la MEC et le niveau de maturation de ses principaux composants. Outre des régulations protéiques suggérant que la différenciation des ATDC5 implique une reprogrammation précoce et importante des voies métaboliques, ces cellules synthétisent et incorporent progressivement dans leur MEC un vaste panel de composants cartilagineux. De façon remarquable, l'agrecane et le collagène de type II semblent porter la plupart des maturations décrites *in vivo*. Plus important encore, l'accumulation de collagène dans la MEC est corrélée aux principaux événements de maturation, notamment les clivages protéolytiques et les hydroxylations de la triple hélice, plutôt qu'à l'expression des gènes et précurseurs protéiques.

Les cellules ATDC5 produisent et intègrent CPII à leur MEC immédiatement suite à l'induction de la minéralisation dans ce modèle et possèdent toute la machinerie d'assemblage et de modification des collagènes. Nous avons montré dans des essais de pull-down réalisés dans ce modèle que CPII, contrairement à ses homologues des procollagènes de type I et III (CPI et CPIII respectivement), n'interagissait pas directement avec PCPE1, l'activateur de BMP-1, suggérant des divergences mécanistiques entre les maturations des procollagènes correspondant. Par ailleurs, ces résultats sont consolidés par des études complémentaires *in vivo* des sites de clivage de CPII purifiée à partir de cartilage de croissance et articulaire bovin, confirmant que 2 sites de clivage de CPII coexistent et démontrant pour la première fois que les trimères de CPII contiennent les quatre combinaisons possibles des deux sites de clivage. Ces données suggèrent que chaque monomère au sein du trimère est clivé indépendamment des autres. Par ailleurs, en cultures primaires de chondrocytes humains, l'inhibition pharmacologique de BMP-1 affecte modestement le clivage de CPII, contrairement à CPI, mais semble favoriser son intégration matricielle. Dans l'ensemble, ces travaux amènent à considérer le mécanisme de clivage de CPII comme distinct de celui de CPI et CPIII et comme plus complexe qu'il n'était anticipé.

La caractérisation fonctionnelle des événements clés de l'élaboration de la MEC dans les cellules ATDC5 devrait permettre de mieux disséquer les mécanismes de la chondrogenèse et de la minéralisation.