

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE NANTES

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « *Biologie des organismes* »

Par
Christelle DARRIEUTORT-LAFFITE

Etude de la composition et des mécanismes de constitution des dépôts calciques dans la tendinopathie calcifiante de la coiffe des rotateurs.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 3 octobre 2019

Unité de recherche : Laboratoire Phy-Os, INSERM UMR 1238, Faculté de Médecine de Nantes

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Pr David MAGNE, Professeur des Universités, Université Lyon 1

Pr Hang Korng EA, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Université Paris 7

Composition du Jury :

Président : Pr Béatrice Bouvard

Examineurs : Béatrice Bouvard, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Université d'Angers

Gaetane Nocturne, Maître de Conférence Universitaire-Praticien hospitalier, Université Paris-Sud

Dir. de thèse : Benoit Le Goff, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Université de Nantes

Co-dir. de thèse : Frédéric Blanchard, Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes

Invité(s)

Yves Maugars, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Université de Nantes

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	4
REMERCIEMENTS	5
INTRODUCTION GENERALE	6
A. La coiffe des rotateurs	7
1. Anatomie de la coiffe des rotateurs	7
2. Composition et physiologie du tendon	8
3. Biologie et biomécanique de la coiffe des rotateurs	11
4. Modifications de la coiffe en réponse au stress mécanique	12
B. La tendinopathie calcifiante : épidémiologie, présentation clinique et prise en charge thérapeutique	13
1. Définition et épidémiologie	13
2. Présentation clinique	14
3. Hypothèses physiopathologiques dans la tendinopathie calcifiante	15
4. Modèles de tendinopathies	17
5. Prise en charge thérapeutique	18
OBJECTIFS	21
RESULTATS / PARTIE I	23
Etude de l'organisation des calcifications tendineuses et de la capacité des ténocytes humains issus de la coiffe à induire une minéralisation <i>in vitro</i> .	
A. Résumé de l'article	24
B. Article soumis Journal of Clinical Medicine	26
C. Résultats complémentaires	73
D. Discussion complémentaire	77
RESULTATS / PARTIE II	80
Recherche de facteurs régulateurs de la tendinopathie calcifiante	
A. Introduction complémentaire	81
B. Matériels et Méthodes	81
1. Extraction et dosage des protéines présentes dans les calcifications	83
2. Dosage des protéines d'intérêt par ELISA	86

3. Etude du PEDF en immunohistochimie dans les tendons	86
4. Etude de l'effet du PEDF sur la minéralisation <i>in vitro</i>	87
C. Résultats	88
1. Quantification des différentes protéines et recherche de corrélations avec les éléments cliniques	88
2. Expression de PEDF au sein des tendons calcifiés	94
3. Effet du PEDF sur la minéralisation <i>in vitro</i>	95
4. Expression et sécrétion du PEDF par les ténocytes en culture	96
D. Discussion	98
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	102
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	106
FINANCEMENTS	108
LISTE DES FIGURES	109
LISTE DES TABLEAUX	112
ANNEXES	112
Annexe 1. Darrieutort-Laffite C et al, Calcific tendonitis of the rotator cuff: from formation to resorption. Joint Bone Spine. 2018 Dec;85(6):687-692	112
Annexe 2. Darrieutort-Laffite C et al. Treatment strategy in calcific tendonitis of the rotator cuff. J.monrhu.2018.01.002	119
Annexe 3. Darrieutort-Laffite C et al. Are Corticosteroid Injections Needed After Needling and Lavage of Calcific Tendinitis: A Randomized, Double-Blind, Non-Inferiority Trial. Ann Rheum Dis. 2019 Jun;78(6):837-843	125
REFERENCES	132

Liste des abréviations

ACAN : aggrécane	MMP13 : matrix metallopeptidase 13
ADN : acide désoxyribonucléique	MO : milieu ostéogénique
ARN : acide ribonucléique	OPG : ostéoprotégérine
ATP : Adénosine TriPhosphate	OPN : ostéopontine
BCA : Bicinchoninic acid Assay	PCR : polymerase chain reaction
BSA : Bovin serum albumin	PFL : ponction-fragmentation-lavage
BMP-2 : Bone Morphogenic Protein 2	PEDF : pigment epithelium-derived factor
BSP : bone sialoprotein	PPi : pyrophosphate inorganique
CCL : cellules chondrocyte-like	Pi : phosphate inorganique
COL : collagène	POSTN : périostine
COMP : cartilage oligomeric matrix protein	RT-qPCR : reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
CH : milieu à différenciation chondrocytaire	RUNX2 : runt related transcription factor 2
CT : milieu contrôle	SCX : scléroxis
DAB : diaminobenzidine	SERPIN : serine protease inhibitor
DC : dépôt calcique	SOFG : Safranin O Fast Green
EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid	SOX 9 : SRY box 9
ENPP1 : Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	SVF : sérum de veau fœtal
HE : hématoxyline et éosine	TNAP :tissu-nonspecific alkaline phosphatase
ITNAP : inhibiteur de la TNAP	TNMD : ténomoduline
MF : métaplasie fibrocartilagineuse	TRAP : Tartrate-resistant acid phosphatase
MKX : Mohawk	

Remerciements

Je tiens à remercier,

Benoit Le Goff pour m'avoir proposé de travailler sur cette thématique, pour son investissement quotidien pour le dynamisme du service et pour m'accompagner dans ce double cursus.

Frédéric Blanchard pour sa présence au quotidien et son aide aux manipulations (y compris le 24 décembre !) et pour nous faire partager ses expériences lors de nos discussions entre médecins et scientifiques. J'espère que notre collaboration restera toujours aussi enrichissante.

Les Professeurs David Magne et Hang Korng Ea pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail.

Les Professeurs Béatrice Bouvard et Yves Maugars pour avoir accepté de participer aux différents comités de suivi de thèse et au jury.

L'équipe du laboratoire Phy-Os pour sa disponibilité et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée et en particulier, Paul et Eva qui m'ont aidé au cours de leurs stages.

Enfin, je remercie mon mari Didier pour son soutien durant toutes ces années dans tous mes projets professionnels et pour m'apporter la motivation à poursuivre dans les moments difficiles.

INTRODUCTION

Introduction

A. La coiffe des rotateurs

1. Anatomie de la coiffe des rotateurs

La coiffe des rotateurs est composée de 4 muscles : le supra-épineux, l'infra-épineux, le sub-scapulaire et le petit rond. Un autre tendon participe dans la même région à la stabilisation de l'épaule : le chef long de biceps brachial. La coiffe des rotateurs a une organisation unique car ses tendons s'unissent pour former une structure continue qui enveloppe la tête humérale (Figure 1) (1). A sa surface se situe la bourse sous-acromio-deltoidienne qui est une interface de glissement sous l'acromion et le ligament acromio-coracoïdien.

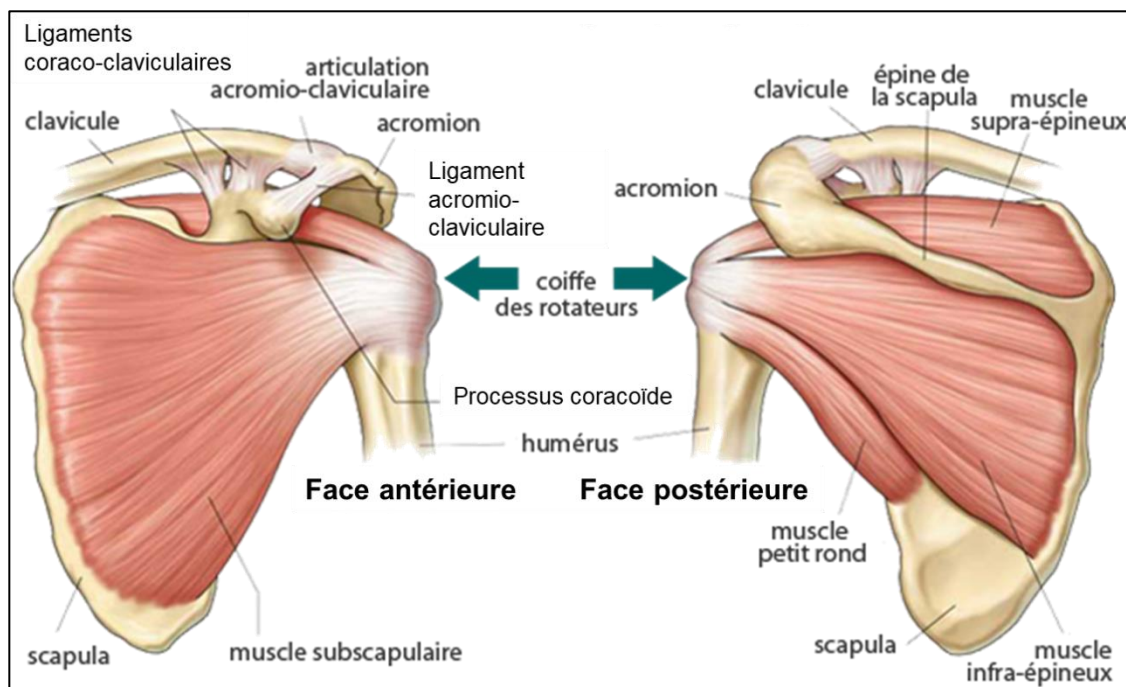


Figure 1. Anatomie de l'épaule et des muscles de la coiffe des rotateurs. On peut voir qu'il existe une continuité entre les tendons qui coiffent la tête humérale. La bourse sous-acromiale non représentée se situe entre les tendons (en-dessous) et le ligament acromio-coracoïdien et l'acromion (au-dessus) et permet le glissement des tendons lors des mouvements.

2. Composition et physiologie du tendon

Le tendon est la structure interposée entre le muscle et l'os dont le rôle principal est de transmettre la force produite par le muscle à l'os pour permettre le mouvement. Le tendon est constitué en majorité de collagène de type I (65 à 80 % du poids sec) dont les fibrilles s'assemblent pour former des unités de taille croissante (Figure 2) (2) : les fibrilles de collagène s'organisent en triple hélice et les hélices vont s'assembler de manière longitudinale et latérale pour former les fibres. Les fibres s'assemblent ensuite entre elles pour former des unités plus grandes appelées fascicules. Le collagène de type I est majoritaire mais d'autres types sont présents (type III, IV, VI) dont certains sont spécialisés dans l'assemblage du collagène (type VI, XII, XIV et XXII) (3,4).

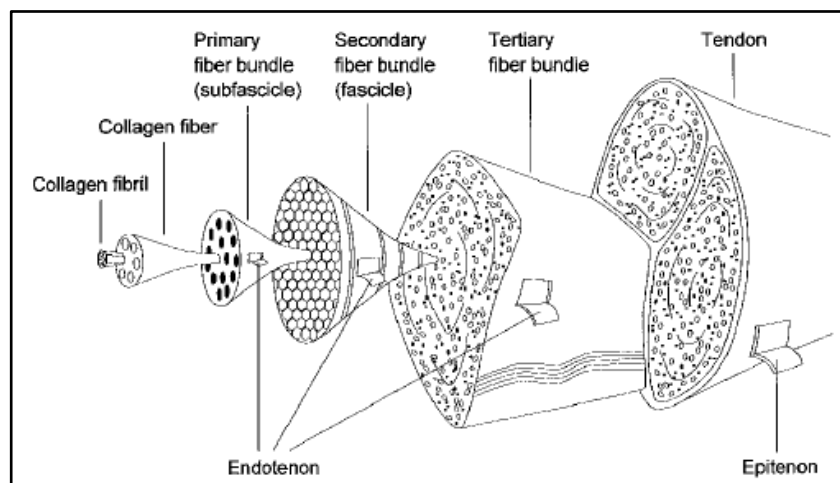


Figure 2. Schéma de l'organisation des fibres tendineuses au sein des différentes unités constituant l'ensemble du corps tendineux. Schéma issu de la référence (2).

L'organisation fibrillaire du tendon est essentielle pour assurer sa résistance au stress mécanique engendré par la contraction musculaire et résister aux forces longitudinales, transversales ou horizontales ou rotatoires qu'il subit.

La matrice du tendon est également composée d'élastine et de protéoglycanes. Les protéoglycanes principales sont les suivantes : décorine, fibromoduline, biglycane et lumican. Elles participent à l'organisation du réseau collagénique et à la lubrification du tendon. Les fibres élastiques, quant à elle, représentent 1-2% du poids sec du tendon et sont présentes principalement à la jonction os-tendon (enthèse). Enfin, la matrice extra-cellulaire

est composée de glycosaminoglycanes, de glycoprotéines structurales et de substances anorganiques telles que le calcium, le magnésium, le cuivre, le zinc, le phosphore ou le cobalt. Ces éléments sont impliqués dans la croissance et le métabolisme normal des structures musculaires (2). Au total, cette matrice extra-cellulaire constitue un gel hydrophile ayant une capacité de rétention d'eau importante et a un rôle important pour la stabilisation de la structure collagénique, le maintien de l'homéostasie ionique et la synthèse des fibres de collagène.

Enfin, les cellules du tendon sont les ténoblastes et les ténocytes. A la naissance, il existe un ratio élevé de cellules par rapport à la matrice. A cette période, ces cellules ont des morphologies et tailles différentes (allongées, arrondies ou polygonales). Au cours de la croissance, il existe une réduction de ce ratio en faveur de la matrice et les ténoblastes adoptent une morphologie similaire, allongée. A l'âge adulte, les ténoblastes deviennent des ténocytes qui sont des cellules fusiformes avec un cytoplasme peu abondant. La fonction des ténocytes est de synthétiser le collagène et les autres composants de la matrice. Cette capacité de synthèse est élevée pendant la croissance et diminue avec l'âge (2). Les ténocytes, comme les chondrocytes et les ostéoblastes se différencient à partir des cellules souches mésenchymateuses avec un rôle primordial des facteurs de transcription Scléroxis (Scx) et Mohawk Homeobox (Mkx) (3,5,6). Les différentes voies de différenciation de la cellule souche mésenchymateuse sont reprises dans la figure 3 ci-dessous.

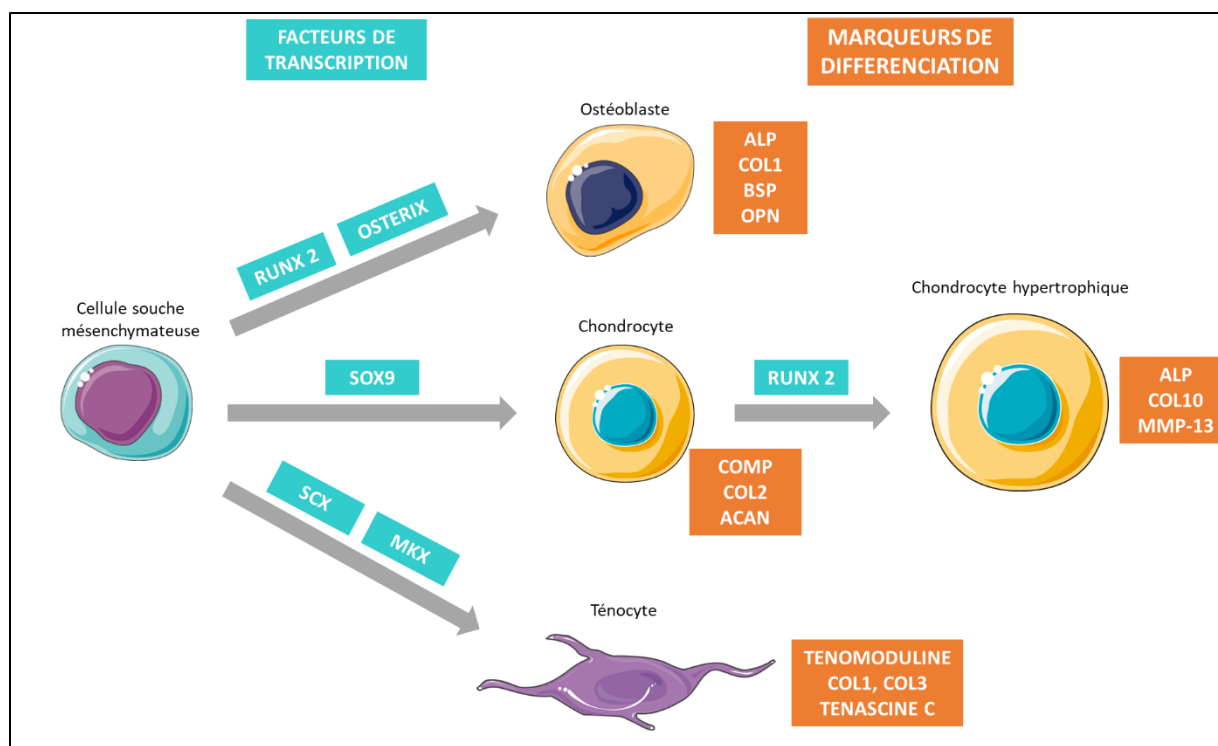


Figure 3. Voies de différenciation de l'ostéoblaste, du chondrocyte et du ténocyte à partir de la cellule souche mésenchymateuse et facteurs de transcription impliqués. SCX : Scléraxis ; MKX : Mohawk Homeobox ; ALP : phosphatase alcaline ; COL1 : collagène de type I ; BSP : Bone SialoProtein ; OPN : ostéopontine ; COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein ; COL2 : collagène de type II, ACAN : aggrecane ; COL3 : Collagène de type III ; COL10 : Collagène de type X.

Les ténocytes sont caractérisés par l'expression de ténomoduline. La ténomoduline est une glycoprotéine transmembranaire qui est fortement exprimée par les tendons et les ligaments. Les souris déficientes en ténomoduline ont une densité réduite en ténocytes et des fibrilles de collagène de diamètre anormal (6) ce qui suggère son rôle fondamental dans la prolifération des ténocytes et la fibrillation du collagène. L'expression des marqueurs spécifiques du ténocyte est sous le contrôle du facteur de transcription Scx (3). Scx régule également la transcription de *Col1a1* et *Col1a2*. Le rôle primordial de Scx pour le développement tendineux est illustré par l'aspect défectueux des tendons des souris Scx-déficientes dont la matrice extra-cellulaire est appauvrie et désorganisée. Mxk est également impliqué dans la prolifération des ténocytes et la régulation de la matrice extra-cellulaire puisque les souris Mxk-/- ont des tendons de petite taille avec un nombre diminué de ténocytes (5). Par ailleurs, Mxk inhibe la différenciation chondrocytaire comme schématisé ci-dessous (Figure 4).

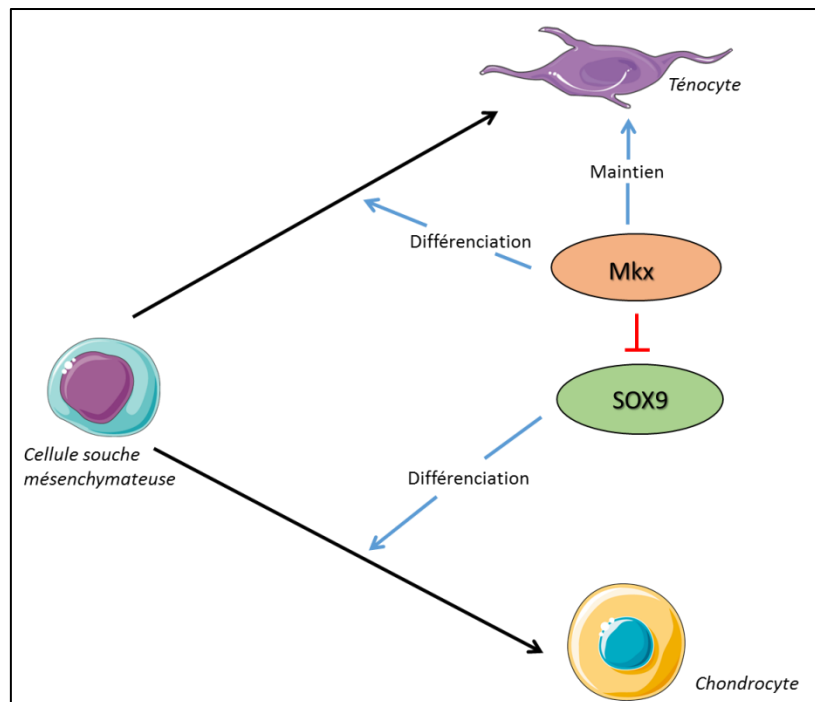


Figure 4. Rôle de Mohawk Homeobox (Mkx) dans la différenciation et le maintien du phénotype ténocytaire. Mkx a un effet inhibiteur de l'expression de Sox9 pour éviter l'orientation vers un phénotype chondrocytaire.

3. Biologie et biomécanique de la coiffe des rotateurs

La coiffe des rotateurs a une organisation unique car ses tendons s'unissent pour former une structure continue qui enveloppe la tête humérale (1). La zone de jonction à l'os est divisée en 4 parties : tendon, fibrocartilage, fibrocartilage calcifié et os. Le tendon est principalement composé de collagène de type I, de décorine, de biglycanes et de cellules fusiformes. En s'approchant de l'insertion osseuse, les cellules de l'enthèse ont une morphologie plus ronde et la zone est riche en collagènes de type II, IX et X et en aggrecane. Ces cellules expriment Sox9 et ont la capacité de minéraliser (3).

Sur le plan biomécanique, l'épaule est une articulation instable compte tenu de la faible congruence des surfaces articulaires (tête humérale et glène de l'omoplate). Le labrum (cartilage fibreux), la capsule et les ligaments gléno-huméraux améliorent en partie la stabilité de l'épaule. Les tendons de la coiffe vont également participer à la stabilisation de l'articulation : le sub-scapulaire de 0 à 90° d'abduction ou en rotation externe et le supra-épineux et le long biceps ont une action de stabilisation vers le bas (7). La position anatomique des muscles de la coiffe et du chef long du biceps brachial crée la configuration

idéale pour comprimer activement la tête humérale dans la cavité glénoïdienne. De manière individuelle, il a été mis en évidence que certains facteurs anatomiques, notamment la longueur de l'acromion et l'orientation de la glène, favorisent la survenue soit de lésions de la coiffe soit d'une omarthrose (8).

4. Modifications de la coiffe en réponse au stress mécanique

Le tissu tendineux est capable de s'adapter à une surcharge mécanique via une augmentation temporaire de son activité métabolique (augmentation de la synthèse du collagène). Les ténocytes réagissent au stress mécanique en se multipliant et en régulant la synthèse et le turn-over de la matrice extra-cellulaire. Mais il existe également lors du stress mécanique une augmentation de l'expression des matrix métalloprotéinases qui dégradent le collagène. Une période de repos est donc nécessaire pour que la balance soit positive pour la synthèse sans laquelle il existe une perte de collagène. A ce moment-là, le tendon produit un tissu conjonctif de qualité biomécanique inférieure avec une perte d'organisation de la matrice collagénique et des modifications de type cartilagineuse (sur-expression de marqueurs tels que les protéoglycanes, les glycosaminoglycanes et SOX9) (9,10). Cependant, ces anomalies décrites dans les lésions tendineuses entraînées par une sur-utilisation n'aboutissent pas à un dépôt de cristaux et nous allons voir dans la partie suivante les caractéristiques de la tendinopathie calcifiante.

B. La tendinopathie calcifiante : épidémiologie, présentation clinique et prise en charge thérapeutique

1. Définition et épidémiologie

La tendinopathie calcifiante est une cause fréquente de douleurs de l'épaule puisqu'elle représente entre 10 et 42 % des épaules douloureuses chroniques (11–14). Elle est due à des dépôts de cristaux d'apatite au sein des fibres des tendons de la coiffe des rotateurs (Figure 5). Ces dépôts peuvent être complètement asymptomatiques, retrouvés sur 3 à 10 % des épaules non douloureuses (15,16).

Elle touche préférentiellement des sujets âgés de 30 à 60 ans avec une prédominance féminine. Les dépôts d'apatite peuvent être observés au niveau d'autres localisations (hanches, mains et pieds, rachis cervical) mais l'épaule est la localisation la plus fréquente et la plus étudiée (17). A ce niveau, les dépôts se forment majoritairement au sein du supra-épineux puis de l'infra-épineux et une atteinte bilatérale est possible (18).

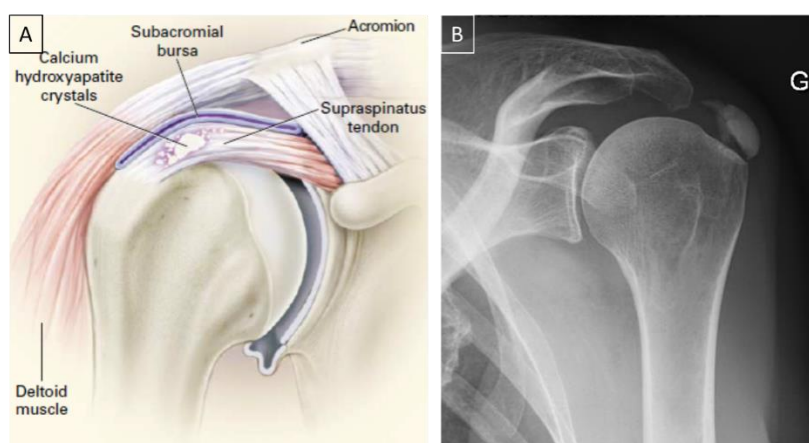


Figure 5. *A: Représentation des dépôts calciques au sein des tendons de la coiffe. B: Radiographie de face d'un patient atteint d'une tendinopathie calcifiante de la coiffe. On voit une image dense et homogène de tonalité calcique située dans l'espace sous-acromial qui se projette en regard de l'insertion du supra-épineux.*

Parmi les facteurs généraux associés, il a été montré qu'il n'y avait pas de lien avec le travail manuel ou le coté dominant, ceci suggérant des phénomènes pathologiques différents de la tendinopathie induite par le stress mécanique. Il a été noté, par certains

auteurs, l'association avec des pathologies endocriniennes telles que l'hypothyroïdie ou le diabète sans qu'il n'y ait de lien bien établi sur le plan physiopathologique (19). Une étude de 2015 a mis en évidence un taux inférieur de phytates urinaires chez les patients porteurs de calcifications de la coiffe, les phytates étant issus de l'alimentation (céréales et légumes) et connus pour être des inhibiteurs de la formation des cristaux d'apatite (20).

2. Présentation clinique

Chez les patients symptomatiques, deux présentations cliniques existent:

- Soit un tableau douloureux chronique de l'épaule, volontiers nocturnes et survenant par poussées, sur un fond de douleurs mécaniques quotidiennes secondaires à un conflit sous-acromial. Concernant l'apparition des symptômes, il a été démontré que la taille de la calcification était associée aux douleurs notamment au-delà d'1,5 cm en radiographie (14). En échographie, la taille de la calcification, la présence d'un signal doppler autour de la calcification et la présence d'une bursite sont associées au développement des douleurs (21).
- Soit des douleurs aiguës d'apparition brutale, intenses et insomniantes. Ce tableau correspond à la résorption de la calcification. Au cours de ce phénomène, la calcification se rompt et les cristaux se déversent dans la bourse sous-acromiale située juste au-dessus des tendons (Figure 5) créant une bursite inflammatoire. Cette résorption survient de manière spontanée, après une période plus ou moins longue de douleurs chroniques mais peut également survenir chez des patients asymptomatiques jusque-là. La radiographie permet de faire le diagnostic montrant une calcification d'aspect flou, hétérogène et fragmenté.

3. Hypothèses physiopathologiques dans la tendinopathie calcifiante

En ce qui concerne les mécanismes d'apparition des calcifications au sein des tendons, quelques éléments sont disponibles dans la littérature. Ils ont été repris dans une revue jointe en annexe (Annexe n°1) (22).

D'après l'hypothèse d'Uthoff, la plus reprise, les cellules impliquées dans l'apparition de la minéralisation sont des cellules de type chondrocytaire (23). En effet, il a été observé dans plusieurs études histologiques la présence autour des dépôts de cellules au noyau arrondi dans une lacune péricellulaire ressemblant à des chondrocytes (23–25), le dépôt, lui, étant amorphe. Cette zone périphérique est positive en toluidine blue et Azur A suggérant une métaplasie fibrocartilagineuse. Cependant, il n'y a pas de collagène II dans cette zone (25,26). Dans les lésions dégénératives du tendon, il a aussi été décrit la présence de cellules chondroïdes et l'augmentation d'expression de Sox9, ainsi qu'une expression de collagène II, sans pour autant qu'une minéralisation y soit associée.

Cette minéralisation pourrait se faire via la formation de vésicules matricielles car il en a été observé au niveau du tendon (25,27). Ces vésicules matricielles contiennent le matériel nécessaire à la formation de cristaux d'apatite : tissue non specific alkaline phosphatase (TNAP), ectonucleotide pyrophosphate phosphodiesterase 1 (ENPP1) et Phospho-1 ainsi que des transporteurs du calcium (annexines) et du phosphore (Pit-1/2). Cependant, la densité en vésicules matricielles ne semble pas plus importante dans les régions calcifiées par rapport aux régions non calcifiées (25). Par ailleurs, la présence d'une expression de TNAP qui induirait la minéralisation par les cellules de type chondrocytaire n'est pas clairement établie puisque les données sont contradictoires à ce sujet (23,25).

Une autre possibilité serait que les calcifications soient induites par des complexes phospholipidiques comme suggéré par Boskey et *al.* (28). En effet, ces complexes associant calcium, phospholipides et phosphate (Ca-PL-P) ont été retrouvés de manière abondante dans des tissus calcifiés de diverses origines (artère, peau, tendon, rein) et sont capables d'induire *in vitro* et *in vivo* des dépôts d'apatite (28,29). Ces complexes sont issus de débris cellulaires ou membranaires. Dans les calcifications du cartilage, il a été montré que les cristaux engendraient une apoptose des chondrocytes pourvoyeuse de débris membranaires

qui seraient une source de nouvelles calcifications. Au niveau du tendon, un mécanisme équivalent n'a pour l'instant pas été démontré.

Une autre question demeure sur l'origine des cellules de type chondrocytaire, à savoir si elles sont dérivées des ténocytes ou si elles proviennent de la différenciation de cellules souches tendineuses (30,31). Ces cellules souches tendineuses ont été identifiées à partir de tendons de souris, de rats et de tendons humains. Elles se différenciaient au moment de l'extraction par leur capacité à former des colonies et à se multiplier rapidement. Elles possèdent une expression plus importante de ténomoduline, un marqueur spécifique du tendon, que les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse (30). Concernant les marqueurs de surface, elles sont positives comme les MSC pour CD146, CD90 et CD44 et négatives pour CD34, CD45 et CD106. En conditions de culture adaptées, ces cellules étaient capables de se différencier vers la lignée ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire et avaient un potentiel d'auto-renouvellement, ce qui a permis de valider leur caractère de « cellules souches ».

Enfin, il a été suggéré que les lésions pourraient être induites par l'hypoxie. Une publication récente a montré que des ténocytes prélevés sur des patients âgés étaient capables de produire des dépôts minéraux en condition d'hypoxie après 8 semaines de culture. Dans cette étude, les tendons utilisés étaient des tendons fléchisseurs des doigts avec trois tranches d'âge de donneurs (jeunes asymptomatiques, tendinose (entre 35 et 44 ans), et sujets âgés (plus de 65 ans)). Les ténocytes maintenus en hypoxie (1% d'O₂) surexprimaient les collagènes de type II et X mais l'apparition de dépôts n'était observée que pour les sujets de plus de 65 ans (32).

Concernant les phénomènes impliqués dans la disparition des calcifications, ceux-ci ne sont pas connus pour le moment. Pourtant, cette phase de résorption est la phase terminale de l'évolution naturelle. Il a été montré que des cellules multinucléées CD68 positives et TRAP positives étaient présentes autour des dépôts suggérant qu'elles pourraient participer à la résorption (33). Cependant, aucun élément n'est connu sur l'origine de ces cellules et les facteurs régulant leur apparition.

4. Modèles de tendinopathies

Les modèles de tendinopathie sont aujourd'hui la plupart du temps chez le rat car il possède une anatomie articulaire proche de celle de l'homme et que la taille de ses structures tendineuses est plus adaptée à la réalisation d'expérimentations que celles de la souris. De plus, il a été montré que les modifications induites par le stress mécanique y étaient proches de celles rencontrées chez l'homme : désorganisation de la matrice, augmentation du nombre de cellules et apparition de cellules chondroïdes associées à une altération des propriétés biomécaniques (moins bonne résistance à la traction) (10). Dans ces modèles de stress mécanique, il n'est pas décrit de calcification.

Dans les modèles par injection de collagénase, Lui et *al.* ont observé l'apparition de calcifications 12 semaines après l'injection dans le tendon patellaire. A ce niveau, il était observé une métaplasie chondrocytaire (34) avec une sur-expression de collagène II par les cellules de type chondrocytaire ainsi que de collagène de type X et de Sox9. Par contre, en micro-scanner, les structures étaient semblables à de l'os avec un aspect poreux au centre du dépôt. Enfin, il existait une sur-expression de BMP-2 au sein de l'ossification et des cellules. L'apparition de calcifications n'est pas décrite par les autres auteurs utilisant ce modèle mais les animaux étaient sacrifiés plus tôt, à 8 semaines, alors que les calcifications apparaissaient après 12 semaines dans le modèle précédemment décrit (35).

Il existe également des modèles par lésions tendineuses directes du tendon achilléen chez la souris qui induisent l'apparition d'une minéralisation (36,37). Ici également, il s'agit d'une ossification (37).

Concernant les modèles mutés, les souris Mxk-déficientes développent spontanément des ossifications tendineuses au niveau des tendons achilléens. A ce niveau, il s'agit bien d'ossification et non de calcification via un mécanisme endochondral (38). La perte de fonction de Mxk sur la différenciation ténocytaire contribue donc à l'apparition d'ossifications tendineuses. Chez les rats Mxk^{-/-}, il a été mis en évidence que l'inactivation de Mxk favorise la différenciation chondrogénique et ostéogénique des ténocytes (39). Concernant les souris Scx-déficientes, il est décrit une hypoplasie des tendons mais pas de calcification ou d'ossification (40). Par contre, en cas de lésion tendineuse chez des souris

Scx-/-, il a été observé 15 semaines après le traumatisme des foyers d'ossification ectopique (41).

Les modèles de tendinopathie existants reproduisent donc une ossification ce qui n'est pas ce que l'on observe dans les calcifications de l'épaule. Au niveau de l'épaule, il n'y a pas de modèle de calcification induite connu. Il est possible que cette localisation ait une particularité par rapport à la minéralisation. En effet, chez l'homme, au niveau du tendon achilléen ou patellaire, on observe plutôt des ossifications en cas de lésions tendineuses chroniques ou de traumatisme et de chirurgie mais rarement des dépôts d'apatite (42). Les contraintes mécaniques n'y sont bien sûr pas les mêmes (membre inférieur versus membre supérieur) et il n'y a pas la même organisation sur le plan anatomique qu'au niveau de la coiffe des rotateurs où il existe une connection de plusieurs tendons.

5. Prise en charge thérapeutique

Les moyens thérapeutiques utilisés ont été repris dans une monographie publiée en 2018 dans la Revue du Rhumatisme jointe en annexe 2 (43). Les points principaux sont résumés ici.

Dans les tableaux aigus, le traitement symptomatique par anti-inflammatoires non stéroïdiens est généralement rapidement efficace et ce stade de la maladie ne pose pas de problème de prise en charge.

En cas de douleurs chroniques, plusieurs techniques ont été évaluées pour soulager les douleurs pour certaines et/ou extraire la calcification : infiltration de corticoïdes, ondes de choc, ponction-fragmentation-lavage (PFL) et chirurgie. L'infiltration de corticoïdes est en général proposée en première intention après échec de la kinésithérapie et des traitements symptomatiques. Dans une étude effectuée dans le service sur 102 patients, l'infiltration de corticoïdes en sous-acromial avait permis une amélioration significative et l'absence de recours à un traitement complémentaire au cours des deux années suivantes pour un patient sur 3 (37%) (44).

Les ondes de choc de haute énergie ont également montré leur efficacité malgré l'hétérogénéité des protocoles utilisés (45). Elles permettent de réduire la douleur et d'améliorer la fonction de l'épaule de manière significative par rapport au placebo.

En ce qui concerne les techniques visant à extraire la calcification, La PFL a montré son efficacité. Elle est actuellement réalisée principalement sous échographie avec une technique à une ou deux aiguilles. Elle nécessite une anesthésie locale, puis l'aiguille est positionnée au centre de la calcification et le lavage effectué à l'aide de sérum physiologique et complété par une fragmentation de la coque périphérique. Elle se termine généralement par une infiltration sous-acromiale de corticoïdes. Dans certains cas, un deuxième geste de lavage est nécessaire notamment en cas de calcifications denses avec cône d'ombre postérieur (46). Dans un essai clinique effectué dans notre service de rhumatologie (47), nous avons également constaté que la calcification n'était pas toujours accessible à un lavage avec 22 patients sur 136 (16%) ayant dû subir une deuxième PFL (N=7) ou une exérèse chirurgicale (N=15). Par ailleurs, nous avons observé que, même en cas d'évacuation de la calcification, les patients pouvaient rester douloureux plusieurs semaines car le phénomène de résorption est long.

Ainsi, nous avons testé d'ajouter le thiosulfate de sodium, un chélateur du calcium, lors du geste de PFL, pour essayer de dissoudre les calcifications d'aspect dense (étude en cours de publication (NCT 02538939, ClinicalTrials.gov)). Le thiosulfate est actuellement déjà utilisé en intra-veineux pour le traitement des calciphylaxies de l'insuffisant rénal. Malheureusement, le thiosulfate injecté localement autour et dans la calcification n'a pas permis d'obtenir une meilleure extraction de la calcification que la PFL standard.

Concernant la chirurgie, 3 options sont possibles : évacuation seule de la calcification, acromioplastie ou les deux combinées. Les trois méthodes semblent efficaces selon les revues systématiques mais il n'existe pas d'essai comparatif de puissance suffisante pour conclure si l'une d'elle est supérieure aux autres (48). Sur le plan fonctionnel, il semble tout de même que la récupération et le retour aux activités normales soient plus rapides dans les cas où il n'y a pas d'acromioplastie (49). En outre, il ne semble pas y avoir de différence entre l'extraction de la calcification par arthroscopie ou par PFL (44). La stratégie de prise en charge thérapeutique est récapitulée dans la figure ci-dessous (Figure 6).

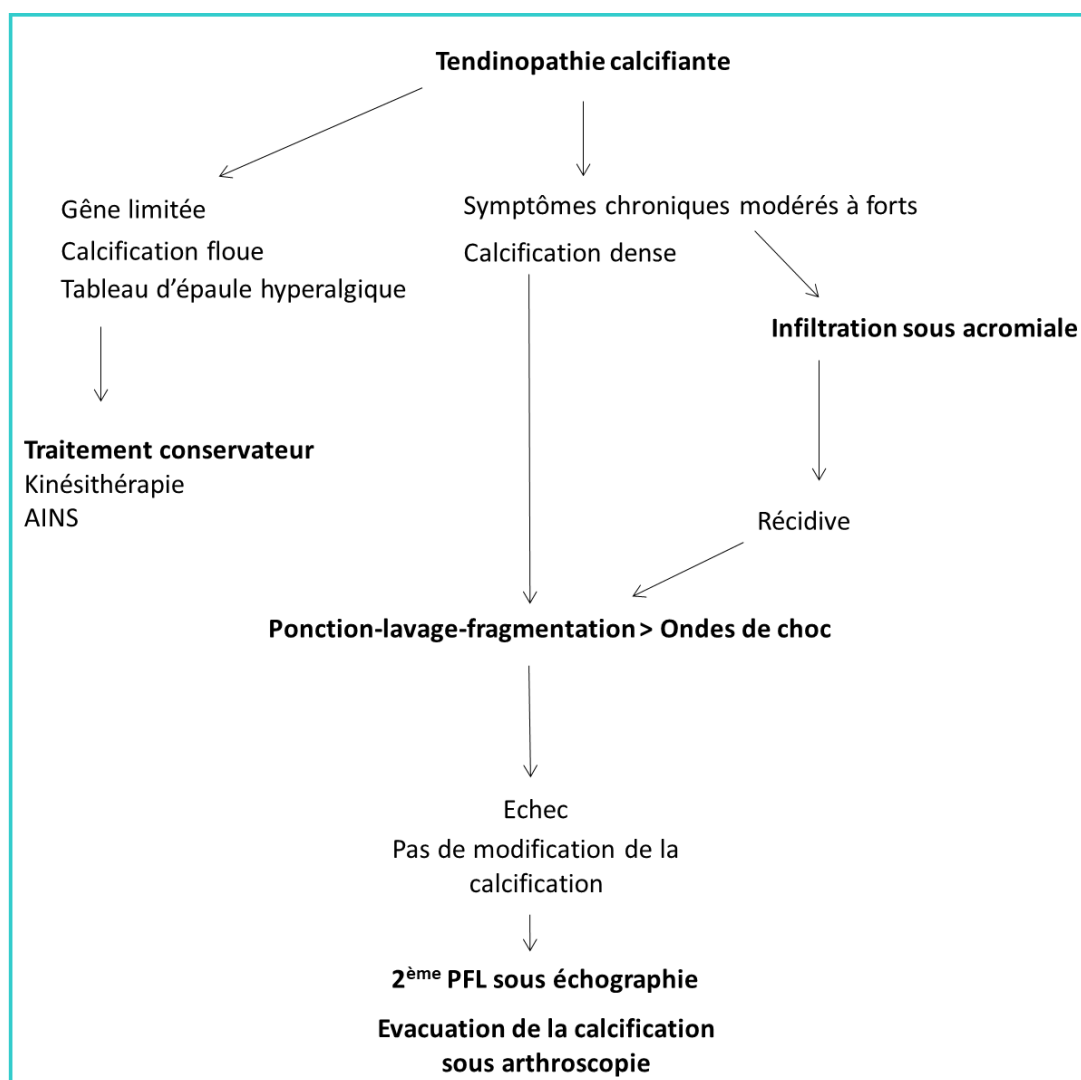


Figure 6. Résumé de la stratégie de prise en charge thérapeutique de la tendinopathie calcifiante de l'épaule.

Objectifs

L'objectif de ce travail de thèse était d'apporter de nouvelles données dans la physiopathologie des calcifications de l'épaule (Figure 7).

La première étape était d'étudier l'organisation des dépôts au sein du tendon et de caractériser les cellules présentes en périphérie de ces dépôts. En effet, comme indiqué en introduction, des cellules de type chondrocytaire ont été mises en évidence mais leur participation aux dépôts d'apatite n'est pas claire. Pour cela, nous avons utilisé des tendons calcifiés issus de cadavres. Ceci nous a permis d'avoir de larges échantillons, ce qui n'aurait pas été possible sur des patients.

Dans une deuxième partie, nous avons utilisé des ténocytes issus de la coiffe des rotateurs pour mettre en place des modèles de minéralisation *in vitro* (culture 2D et 3D). Dans ces modèles *in vitro*, le phénotype des cellules a été caractérisé et leur capacité minéralisante quantifiée.

Dans une troisième étape, nous avons étudié la composition protéique des calcifications. En effet, il est possible que les protéines associées expliquent la constitution du dépôt et sa croissance. Parmi, les protéines retrouvées, nous faisons l'hypothèse que certaines pourraient avoir un rôle régulateur dans le déclenchement du phénomène et d'autres un rôle de maintien de la calcification. L'identification de ces protéines pourrait nous permettre de proposer de nouvelles thérapeutiques pour permettre une meilleure extraction des dépôts, notamment dans le cas de calcifications dures.

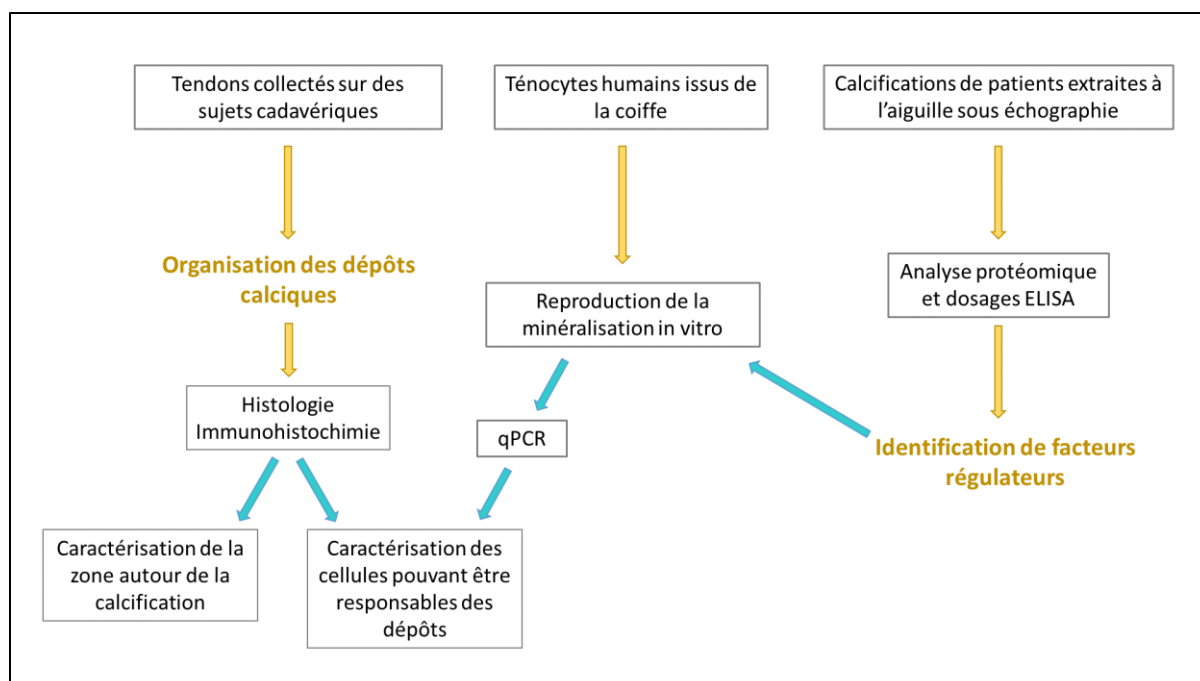


Figure 7. Synthèse des objectifs de la thèse à partir des différents échantillons humains disponibles.
qPCR : quantitative polymerase chain reaction.

PARTIE I

Résultats/Partie I

A. Résumé de l'article

La tendinopathie calcifiante est une cause fréquente de douleur chronique de l'épaule et est liée à des dépôts d'apatite au sein des tendons de la coiffe des rotateurs. Son origine est actuellement peu élucidée. Les objectifs de l'étude étaient de mieux caractériser les cellules et les mécanismes à l'origine des dépôts d'apatite dans les tendons. Des coupes histologiques de tendons humains calcifiés ont été recueillies afin d'étudier l'organisation des dépôts et le phénotype des cellules présentes autour. La capacité de minéralisation de ténocytes humains issus de la coiffe a été étudiée *in vitro* en 2 dimensions en utilisant un milieu ostéogénique et en 3 dimensions en utilisant un milieu mixte chondrogénique et ostéogénique. Enfin, des calcifications extraites de patients souffrant de tendinopathie ont été collectées suite à un geste de lavage percutané sous échographie. Une analyse par spectroscopie infra-rouge a été effectuée ainsi qu'une caractérisation de la composition protéique par spectrométrie de masse.

En histologie, la calcification apparaissait comme une zone amorphe entourée par une métaplasie fibrocartilagineuse contenant des cellules de type chondrocytaire. Ces cellules exprimaient la Tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) et l'Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1), deux enzymes-clé de la minéralisation. *In vitro*, les ténocytes humains issus de la coiffe étaient capables d'induire une minéralisation en culture 2D et les cellules exprimaient de manière significative la TNAP, le collagène de type X et la MMP13, qui sont des marqueurs de chondrocytes hypertrophiques. L'utilisation d'un inhibiteur de TNAP a permis de réduire drastiquement la minéralisation. En culture 3D, malgré une plus forte expression des marqueurs chondrocytaires, l'obtention d'une minéralisation était inconstante. L'étude des dépôts calciques issus de patients a montré une sur-représentation des protéines impliquées dans le développement de l'os et du cartilage.

En conclusion, nous avons pu montrer que les ténocytes humains avaient la faculté de se différencier en cellules ayant les caractéristiques de chondrocytes hypertrophiques et la capacité de produire des dépôts calciques via l'action de la TNAP. L'analyse protéomique a identifié des protéines impliquées dans le développement de l'os et du cartilage qui

pourraient être pour certaines des facteurs régulateurs du phénomène. Nous pensons que ces données vont permettre par la suite d'identifier des éléments de régulation pouvant représenter des cibles thérapeutiques dans la pathologie.

B. Article soumis Journal of Clinical Medicine

Rotator cuff tenocytes differentiate into hypertrophic chondrocyte-like cells to produce calcium deposits in an alkaline phosphatase-dependent manner.

C Darrieutort-Laffite (1,2), P Arnolfo (1,2), T Garraud (1,2), A Adrait (3), Y Couté (3), G Louarn (4), V Trichet (1), P Layrolle (1), B Le Goff[#](1,2), F Blanchard[#](1)

(1) INSERM UMR1238, Bone Sarcoma and remodeling of calcified tissue, Nantes University, Nantes, France

(2) Rheumatology department, CHU Nantes, Nantes, France

(3) UnivGrenobleAlpes, CEA and INSERM, BIG-BGE, F-38000 Grenoble, France

(4) Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN) - UMR CNRS 6502, Nantes University, Nantes, France

[#]Co-senior authors.

Corresponding author:

Christelle Darrieutort-Laffite

Rheumatology Department, Nantes University Hospital

1 Place Alexis Ricordeau

44000 NANTES, FRANCE

Phone number: +33 2 40 08 48 01

Email address: christelle.darrieutort@chu-nantes.fr

ABSTRACT

Calcific tendonitis is a frequent cause of chronic shoulder pain caused by apatite deposits within the rotator cuff tendons. Its cause is currently poorly known. The objectives of this study were to better characterize the cells and mechanisms involved in depositing apatite crystals in human tendons. Histologic sections of cadaveric calcified tendons showed that calcifications were amorphous areas surrounded by a fibrocartilaginous metaplasia containing hypertrophic chondrocyte-like cells that expressed Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase (TNAP) and Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (ENPP1), two key enzymes of the mineralization process. *In vitro*, tenocyte-like cells extracted from the rotator cuff were able to mineralize in osteogenic two-dimensional cultures, and expressed *TNAP*, *type X COLLAGEN* and *MMP13*, hypertrophic chondrocytes markers. The use of a TNAP inhibitor significantly prevented mineral deposits. The mineralization ability of human rotator cuff tenocyte-like cells was also assessed in three-dimensional cultures using a mixture of chondrogenic and osteogenic media. In this condition, despite a higher expression of chondrogenic markers, cells were inconstantly able to mineralize. Finally, human calcific deposits were obtained from patients undergoing an ultrasound-guided percutaneous lavage of their calcification. Infra-red spectroscopy of human calcific deposits showed that apatite crystals are associated with groups of proteins. Mass spectrometry-based proteomic characterizations showed a significant enrichment of proteins involved in bone and cartilage development and extracellular matrix (for example ENPP1, NT5E (CD73), SERPINF1 or periostin). In this study, we provide evidences that tenocytes have a propensity to differentiate into hypertrophic chondrocyte-like cells to form fibrocartilaginous tissue and to produce TNAP-dependent calcium deposits. Proteomic analyses identified proteins involved in bone and cartilage metabolism that might be regulating factors of the phenomenon. We believe

these results may pave the way to identifying regulating factors that might represent valuable targets in calcific tendonitis.

Keywords: calcific tendonitis, rotator cuff, apatite, hypertrophic chondrocytes, tissue non-specific alkaline phosphatase

INTRODUCTION

Calcific tendonitis is a frequent cause of chronic shoulder pain. Apatite deposits present within the rotator cuff tendons lead to sub-acromial impingement. Although frequent, with 10 to 42% cases of chronic shoulder pain ⁽¹⁾, its etiology remains unknown and only little data is available on the mechanisms leading to calcium deposits. Histological analysis showed the presence of a fibrocartilaginous metaplasia around the deposits containing chondrocyte-like cells.⁽²⁾ However, the role these cells play in mineralization has not been clearly determined. Uhthoff *et al.* observed alkaline phosphatase activity in chondrocyte-like cells and in the surrounding matrix, suggesting that the phenomenon could be incomplete endochondral ossification through the coalescence of calcium crystals present in matrix vesicles.⁽²⁾ In contrast, Archer *et al.* did not detect any alkaline phosphatase enzymatic activity in areas containing the rounded cells and refuted the previous hypothesis.⁽³⁾

Tenocytes are highly specialized mesenchyme-derived cells responsible for the synthesis and maintenance of connective tissue. They are embedded in a three-dimensional network of extracellular matrix components composed of type I collagen (60–85% of the dry weight), other collagen subtypes (III and V), proteoglycans, glycosaminoglycans and glycoproteins.⁽⁴⁾ When isolated and expanded *in vitro*, these cells are named tenocyte-like cells (TLC). They are characterized by the expression of a combination of markers: collagens I and III, decorin, tenomodulin, scleraxis, and tenascin-C.⁽⁵⁾ TLC also express mesenchymal stem cell surface markers and have the ability to differentiate into adipogenic, osteogenic and chondrogenic phenotypes.⁽⁶⁾ Some data suggested that multipotential stem/progenitor cells are present in tendons and are implicated in tendon regeneration.^(7,8) It has not yet been determined which cells may be responsible for the calcific deposits.

The objectives of this study were, in the first section, to describe the organization of the calcium deposits within the tendon and to characterize the cells observed around them, and in the second, to study the ability of cells extracted from the rotator cuff to induce mineralization *in vitro*, the phenotype of these cells, and the mechanisms involved. In the last section, we analyzed the composition of calcium deposits extracted from patients suffering of calcific tendonitis.

MATERIALS AND METHODS

Histology and immunochemistry

Rotator cuff tendons were collected at the Nantes anatomical facilities from fresh and non-embalmed cadaveric subjects kept at +4°C. Approval was obtained from the local Institutional Review Board and Ethics Committee for the use of human anatomical specimens. Ultrasound (US) was first used to detect calcified tendons. Tendons were considered as normal when they had a continuous, fibrillary and hyperechoic structure on US. One normal and five calcified tendons were collected from 5 subjects (median age 82 years [54-88 years]). Of the 5 calcifications, 3 had an arc-shaped morphology and 2 were fragmented without acoustic shadowing. After fixation, they were scanned ⁽⁹⁾, decalcified ⁽¹⁰⁾ and embedded. Three µm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), Alcian Blue, Safranin O/Fast Green (SOFG) and Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP).^(11,12) Von Kossa was performed on no decalcified portions of the samples.

Sections were incubated with primary antibodies targeting RUNX2 (Novus Biologicals NBP1-77461, 1/200), SOX9 (ab3697, 1/400, Abcam, UK), Type II collagen (COL2A1)(sc-52658, 1/1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), Type X collagen (COL10)(ab49945, 1/1000, Abcam), Tissue Non-specific Alkaline phosphatase (TNAP) (ab108337, 1/1000, Abcam), Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 (ENPP1) (ab40003, 1/2000, Abcam), Mohawk Homeobox (MKX) (NBP2-45863, 1/400, Novus Biologicals, USA), CD31 (ab28364, 1/100, Abcam), CD68 (M0876, 1/400, Dako, USA), and cleaved Caspase-3 (9664, 1/400, Cell Signaling, Netherlands). Secondary antibodies at 1:400 dilutions were incubated for 2 hours and streptavidin-HRP (P0397, Dako) for 1 hour, both at room temperature. Staining was achieved with DAB (TA-125-QHDX, Thermo Scientific) and counterstaining with hematoxylin. Cells were considered positive when stained in brown.

Cell culture

Tenocyte-like cells (TLC). Rotator cuff tendon samples (biceps or supra-spinatus) from 11 donors were obtained surgically at the time of shoulder replacement surgery for osteoarthritis. All donors enrolled gave their formal consent. The study was approved by the local ethics committee and by the French Research Ministry (DC-2011-1399) in accordance with the Declaration of Helsinki. Mean age was 72.1 years ($\pm$ 6.5). Tendons were digested in collagenase A (1mg/ml).^(5,6,13) Cells were cultured in RPMI medium (Lonza, Switzerland) supplemented with 10% of fetal bovine serum (ThermoScientific), essential and non-essential amino acids (Sigma-Aldrich, Germany) and used until passage 2. TLC were characterized by flow cytometry (supplemental methods).

Osteogenic medium. TLC were incubated in osteogenic medium containing dexamethasone 10^{-7} M, β -glycerophosphate 10mM and ascorbic acid 2P 250 μ M.⁽¹⁴⁾ A Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase inhibitor (TNAPi) was used at 20 μ M (EMD Millipore Corp, USA, ref 613810-10MG). Alizarin red S staining was performed ⁽¹⁴⁾ and TNAP activity quantified using an ALP Colorimetric Assay Kit (Abcam) after cell lysis.⁽¹⁵⁾

Chondrogenic three-dimensional culture. Cell pellets were obtained following the manufacturer's instructions (70,000 cells in 24-well plates) and cultured in StemPro chondrogenic medium for 7 days (A10064-01, Gibco, USA). For the 3 following weeks, the pellets were maintained in the chondrogenic medium (CH condition) or received a mixed chondrogenic/osteogenic medium (chondrogenic medium with dexamethasone 10^{-7} M, β -glycerophosphate 10mM and ascorbic acid 2P 250 μ M (CH-OM condition)).

RT-qPCR analysis

Tenocyte total RNA was extracted using mini spin columns (NucleoSpin® RNA, Macherey Nagel, France). The reverse transcription (RT)-qPCR was carried out as described.⁽¹⁶⁾ The primers used are reported in supplemental Table S1. Resultant cycle threshold (Ct) values were normalized to the invariant control, *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and expressed as $2^{-\Delta Ct}$.

Scanning Electron Microscopy (SEM) and FTIR (Fourier-Transformed Infrared)-Spectroscopy

Calcifications were extracted from 14 patients undergoing an ultrasound-guided percutaneous lavage in our Rheumatology department (mean age 52.4 years (+/-12.3), 7 men). All patients enrolled gave their formal consent. Calcific deposits were collected in saline, washed in phosphate-buffered saline (PBS) and dehydrated in ethanol 70°. SEM was performed with a TM300 microscope (Hitachi, Japan) and FTIR-spectroscopy was performed using a Bruker VERTEX 70 spectrometer with an ATR accessory equipped with a diamond crystal and using a range of 400-4000 cm^{-1} .

Proteomic and bioinformatics analysis

Calcifications from 5 patients were incubated for 2 hours in RIPA buffer, protease inhibitors (leupeptine (0.4 $\mu\text{g/ml}$), aprotinine (0.4 $\mu\text{g/ml}$)), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (5 μM) and NaVO_4 (0.5 mM). Extracted proteins were solubilized in Laemmli buffer, heated for 5 min at 95°C, before being stacked at the top of a SDS-PAGE gel (4-12% NuPAGE, Life Technologies), stained with Coomassie blue R-250 and in-gel digested using modified trypsin (Promega, sequencing grade) as previously described.⁽¹⁷⁾ The resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled with tandem MS (UltiMate 3000 and

LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific, USA). Peptides were sampled on a 300 μ m x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 μ m x 250 mm C18 column (PepMap, Thermo Scientific) using a 120-min gradient. MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). Peptides and proteins were identified using Mascot (version 2.6) through concomitant searches against Uniprot (Homo sapiens taxonomy, December 2018 version), a classical contaminants database (homemade) and the corresponding reversed databases. The Proline software (<http://proline.profiaproteomics.fr>) was used to filter the results: conservation of rank 1 peptides, peptide identification false discovery rate < 1% as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy, minimum peptide score of 25, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group. Proline was then used to perform a compilation, grouping and spectral counting-based comparison of the protein groups identified in the different samples. Proteins from the contaminant database and keratins were discarded from the final list of identified proteins. Only protein groups identified with a total of at least 2 specific spectral counts in total were retained.

The proteins identified in our proteomic analysis of calcifications were subjected to functional classifications using PANTHER v.14.0.⁽¹⁸⁾

Statistics

Results were analyzed with the Mann-Whitney test using GraphPad8 software. Data are given as mean $\pm$ SEM and results with $p < 0.05$ were considered significant. For proteomic analyses, the protein list was explored for statistical over-representation of GO (Gene Ontology) biological process and cellular component terms using Fisher's exact test and the Bonferroni correction for multiple testing. Only GO terms with an adjusted p-value < 0.05 were considered as significant hits.

RESULTS

Histological characterization of calcific tendonitis

To characterize the cell and tissue organization around calcific deposits, we analyzed samples collected from cadaveric supraspinatus tendons. Micro-Computed Tomography (CT) images showed that the calcifications were composed of multiple adjacent deposits. Their density was higher when an arc-shaped morphology was observed with ultrasound (donors 3, 4, 5) (Figure 1A). Von Kossa staining confirmed the presence of small micrometric and large millimetric, calcified areas in the 5 donors (Figure 1C: example of a large calcification) but not in the normal tendon (Supplemental figure S1). In the decalcified samples, mineral deposit sites appeared as areas containing an amorphous acellular material that remained after decalcification (Figure 1B). Four donors had small (vesicular, sub-cellular sized) calcifications disseminated between tendinous fibers in association with nearby voluminous ones encapsulated by a tissue. In one sample (donor 5), an intra-tendinous osseous metaplasia with osteoblasts, osteocytes and bone marrow was observed adjacent to the large encapsulated calcium deposits (Figure 1B). The capsule presented a red coloration after SOFG staining (proteoglycan specific) and a blue coloration with alcian blue staining (mucopolysaccharides specific), indicative of fibrocartilaginous tissue. However, this tissue was COL2 negative on immunohistochemistry whereas the fibrocartilage at the enthesis was strongly positive, as expected (Figure 1C).

Within the fibrocartilaginous area surrounding the deposits, cells with rounded nuclei and pericellular lacunae were observed suggesting chondrocyte differentiation. These cells expressed the master transcription factors RUNX2 and SOX9, the enzymes ENPP1 and TNAP and eventually type X collagen (COL10), indicative of hypertrophic chondrocyte differentiation (Figure 1D and E). Interestingly, extracellular TNAP staining was also present

at the interface between the calcium deposits and the fibrocartilaginous metaplasia, suggesting an active role of this enzyme in apatite deposition.

We also identified blood vessels (CD31+) surrounding the deposits in 4 of the 5 calcified samples. The median of the smallest distance was 56.5µm (Figure 1E). In the non-calcified portion of the samples, we did not observe such vascularization, with normal vascularization being located in the sub-acromial bursae.

We did not observe CD68+ macrophages, multinucleated giant cells or TRAP positive cells (*i.e.* osteoclasts) around the deposits (data not shown). Pathological calcification in cartilage can be associated with chondrocytes apoptosis⁽¹⁹⁾ but none of the chondrocyte-like cells expressed cleaved Caspase-3 (data not shown).

Characterization of tendon cells and assessment of their mineralization ability

Cells isolated from rotator cuff tendons had a spindle shape and expressed *COL1A1*, *COL3A1*, *MKX* and *SCLERAXIS* as expected. However, *TENOMODULIN* was very weakly expressed and lost after passage 1 (Supplemental figure S2). The majority of cells expressed CD44, CD73, CD90 and CD105 and were negative for CD45, CD133 and CD146 (Supplemental figure S2). These cells were thus termed tenocyte-like cells (TLC).⁽¹³⁾

After 21 days of TLC culture in the osteogenic medium, we obtained significant mineral deposits compared to the control medium (Figure 2A, N=5). Mineral deposits occupied 15.48% (± 2.57) of the surface of the well for the osteogenic condition *versus* 0.50% (± 0.4) for the control medium. As a positive control, human mesenchymal stem cells mineralized 53.33% (± 7.07) of the total surface of the well (data not shown).

Phenotype of the mineralizing TLC

Total RNA was extracted from TLC after 21 days of culture and the expression of several genes was measured (Figure 2B). In osteogenic medium, we observed significantly increased expression of *TNAP* and *ENPP1*, which are both implicated in the mineralization process. We also observed increased expression of several chondrocyte markers: *COL10A1*, *MMP13* and *COMP*, which are especially expressed by hypertrophic chondrocytes, but *COL2A1* was not detected and the expression of *ACAN* was significantly reduced. The osteogenic medium did not have any incidence on the expression of the other genes related to osteoblast or tenocyte differentiation.

TNAP involvement in TLC-induced mineralization

We observed a significant increase in TNAP activity from day 14 onward in osteogenic medium (Figure 3A). The use of a TNAP inhibitor showed a significant reduction in the mineral deposits induced by the osteogenic medium (Figure 3B-C), suggesting a critical role of TNAP in the process. The TNAPi modified the phenotype of the cells and induced a decrease in expression of *COL10* and *MMP13*, usually expressed by hypertrophic chondrocytes (Figure 3D). However, it did not affect the expression of the other genes studied: *TNAP*, *ENPP1*, *ACAN* and *COMP*. We did not observe any effect on the expression of *SOX9*, *RUNX2*, *SPP1*, *COL1A1*, *COL2A1* or *SCX* (data not shown).

Mineralization ability of TLC in 3D chondrogenic culture

We next wondered whether a direct chondrogenic stimulation of TLC would also favor mineral deposits. First, TLC 3D pellets cultured in a chondrogenic medium for 4 weeks were able to produce peripheral fibrocartilaginous tissue with an abundant matrix positive for Alcian blue staining, but negative for COL2 (Figure 4A). The center of the pellets was much

less structured, with poor extracellular matrix. The cells observed in the fibrocartilaginous tissue had an elongated fibroblastic shape. By immunohistochemistry, these cells expressed osteoblast and chondrocyte markers such as SOX9, RUNX2, COL10, TNAP and ENPP1. They also expressed MKX, a tenocyte marker. RT-qPCR performed on the whole pellets confirmed the expression of *RUNX2*, *TNAP*, *ENPP1*, *COL10A1* and *MKX* and the absence of expression of *COL2A1* (Figure 4B). TLC in chondrogenic pellets expressed higher levels of chondrocyte markers *COL10A1* and *MMP13* than TLC in 2D cultures. We also observed the re-expression of the tenocyte marker *TNMD* in chondrogenic pellets, although it remained undetected in the control 2D condition.

Next, TLC 3D pellets were cultured for one week in chondrogenic medium followed by 3 weeks in a mixed medium composed of the chondrogenic medium supplemented with osteogenic molecules (CH-OM). In this condition, we observed strong mineral deposits in the fibrocartilaginous peripheral tissue as well as in the poorly-organized center of the pellets for only one in three donors (Figure 5A, donor 1). Calcium deposits appeared as small micrometric vesicles that eventually aggregated to form larger, amorphous deposits. No mineralization was observed for donors 2 and 3 despite the presence of osteogenic molecules (Figure 5A). When adding the TNAPi to the mixed medium (CH-OM + TNAPi), mineralization was totally prevented for donor 1 (Figure 5A). Cells located within the fibrocartilaginous alcian blue positive area were positive for TNAP in the chondrogenic and chondrogenic/osteogenic medium, but its expression was reduced in the presence of the TNAPi (Figure 5C).

Histological and 2D *in vitro* experiments showed us that a chondrocyte transition of TLC was associated with apatite deposition. In the last part, we studied the composition of calcifications extracted from patients to identify which components, possibly regulatory, were associated with crystals.

Composition of calcium deposits

Electron microscopy performed on the calcifications extracted from patients with calcific tendonitis showed a powder composed of ellipsoidal objects ranging from 3 to 300 μm (Figure 6A). FTIR-spectroscopy found the spectrum of apatite and additional peaks were observed between 1400 and 1700 cm^{-1} and between 2900 and 3500 cm^{-1} (Figure 6B). They were linked to the presence of proteins.

Following extraction, 348 proteins were reliably identified by mass spectrometry-based proteomic analyses. Bioinformatic analysis indicated that the majority of proteins belong to the extracellular space and many have been described as components of extracellular vesicles (Figure 6C). Considering the involvement in biological processes, we observed a significant enrichment of proteins involved in extracellular matrix organization, but also, more interestingly, of proteins involved in ossification, bone growth and cartilage development (Figure 6C). This prompted us to compare our list of calcification-contained proteins to those reported to be present in connective tissues. For this, we compiled proteomic datasets previously reported to produce 3 lists of entries for i) tendon⁽²⁰⁻²⁴⁾, ii) bone⁽²⁵⁻²⁶⁾ and iii) cartilage.⁽²⁷⁻²⁸⁾ As the compiled and compared datasets were acquired from samples of different species, we relied on the gene names extracted from Uniprot⁽²⁹⁾ to perform the comparison between sample types. This analysis confirmed the presence of proteins already found in tendon, but also in bone and/or cartilage (some of them are reported in Figure 6D).

Interestingly, we identified several proteins, such as ENPP1, NT5E (CD73), SERPINF1 (PEDF) or POSTN, which are known enzymes or regulating factors implicated in the mineralization process.⁽³⁰⁻³²⁾

DISCUSSION

To explore the mechanisms involved in the pathogenesis of calcific tendonitis, we collected three types of human samples: calcified tendon samples from cadaveric subjects, tenocyte-like cells from donors and calcifications from patients with shoulder pain. The histological analysis of calcified tendons showed a fibrocartilaginous metaplasia containing chondrocyte-like cells around the deposits. This metaplasia has been previously described by Uhthoff.⁽³³⁾ This “fibrocartilaginous area” did not contain type II collagen. This lack of collagen II has already been observed in calcific tendonitis.⁽³⁾ While fibrocartilage is typically characterized by the presence of type II collagen, Benjamin *et al.*⁽³⁴⁾ reported that some types of fibrocartilage contain only a small quantity of type II collagen and mainly type I collagen (knee joint menisci). Cells within these areas expressed RUNX2 and SOX9, which are transcription factors involved in chondrocyte differentiation. Some of them also expressed COL10, suggesting a hypertrophic phenotype, which is consistent with their expression of RUNX2 and TNAP.⁽³⁵⁾ In the growth plate, the downregulation of SOX9 is essential for allowing endochondral ossification. However, in the case of calcific tendonitis, we usually did not observed ossification suggesting that these hypertrophic chondrocytes did not reach their terminal differentiation.⁽³⁶⁾

We next showed that cells extracted from rotator cuff tendons, called TLC, were able to induce mineral deposits *in vitro*. Our TLC had a fibroblastic morphology, and expressed tendon-specific and MSC markers as previously reported.^(5,13) The cells were used until passage 2 because multiple passaging of TLC leads to phenotypic drift.⁽³⁷⁾ In previous studies, mineralization was relatively weak with TLC.^(13,38) Interestingly, when using DMEM to expand TLC, we similarly did not observe any significant mineralization in osteogenic medium (data not shown). Therefore, expansion of TLC in RPMI medium with low glucose appears to be a key step for obtaining cells with significant mineral deposit ability.

Interestingly, the phenotype of the mineral-forming cells showed characteristics of hypertrophic chondrocytes, such as increased expression of *TNAP*, *COMP*, *COL10* and *MMP13*. MMP-13 plays a key role in chondrocyte hypertrophy and mineralization. Its transcription is regulated by RUNX2, and inhibiting MMP13 can suppress hypertrophy and expression of COL10. In addition, the inhibition of MMP-13 inhibits calcium incorporation in the extracellular matrix.⁽³⁹⁾

To explore whether or not cells with a cartilaginous phenotype were also able to mineralize, we cultured TLC in chondrogenic 3D pellets and exposed them to an osteogenic medium. These cultures led to inconstant mineral deposits. For donor 1 (Figure 5), striking similarities were noted with histological images obtained from calcified tendons, such as micrometric calcified vesicles and the presence of hypertrophic chondrocytes expressing TNAP. However, culturing TLC in chondrogenic/osteogenic medium cannot be a valuable culture model for calcific tendonitis.

We have shown the key role played by TNAP in calcification formation. TNAP is a key enzyme involved in the physiological mineralization process: extracellular inorganic pyrophosphates are provided by ENPP1 and then hydrolyzed by TNAP to promote mineralization. These two enzymes were expressed by the hypertrophic chondrocyte-like cells *in situ*. In addition, we observed extra-cellular TNAP on the surface of the calcium deposits. We can speculate that TNAP is present in matrix vesicles derived from the hypertrophic chondrocyte-like cells, and that mineral deposits occur in these matrix vesicles. The presence of matrix vesicles has previously been observed in tendons by electron microscopy⁽³⁾ and their potential implication in other pathological calcifications (vascular and cartilage calcifications) has been suggested.⁽⁴⁰⁾ In addition, TNAP expression was increased in TLC after 21 days in the osteogenic medium. Importantly, the inhibition of TNAP was able to decrease mineral deposits *in vitro* in 2D cultures. The TNAP inhibitor also reduced expression of the

hypertrophic chondrocyte markers *COL10* and *MMP13*. This suggests that the TNAPi acted in part on mineralization by modifying the phenotype of the cells. We still need to determine whether TNAP inhibitors will be useful in the treatment of calcifying tendonitis, as suggested previously for vascular calcifications.⁽⁴¹⁾

Finally, identification by mass spectrometry-based proteomics of the proteins associated with apatite crystals revealed an enrichment in cartilage-associated protein and the enzymes involved in cartilage metabolism that corroborates the previous results. It will be interesting in the future to study the role of these elements in the pathogenesis of the disease.

In conclusion, we provide here evidence that tenocytes have a propensity to differentiate or transdifferentiate into hypertrophic chondrocyte-like cells to form fibrocartilaginous tissue, and to produce TNAP-dependent calcium deposits. We believe these results may pave the way for further studies to identify the regulating factors that may represent valuable targets for treating calcific tendonitis.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Marc Cappelli for giving us the surgical samples and the Nantes anatomical facilities for making cadaveric subjects available for our study. Proteomic experiments were partly supported by ProFI (ANR-10-INBS-08-01 grant) and the Labex GRAL (ANR-10-LABX-49-01 grant). This work was supported by grants from the French Society for Rheumatology.

Authors' roles: CDL, PA, TG, VT, AA, YC and GL conceived and carried out experiments and were involved in the acquisition and analysis of data. CDL, YC, BLG and FB interpreted

the data and wrote the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved its submission.

References

1. Darrieutort-Laffite C, Blanchard F, Le Goff B. Calcific tendonitis of the rotator cuff: From formation to resorption. *Joint Bone Spine* 2018 Dec;85(6):687-692.
2. Uthoff HK. Calcifying tendinitis, an active cell-mediated calcification. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1975;366(1):51-8.
3. Archer RS, Bayley JI, Archer CW, et al. Cell and matrix changes associated with pathological calcification of the human rotator cuff tendons. *J Anat* 1993;82:1-11.
4. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10(6):312-20.
5. Mazzocca AD, Chowaniec D, McCarthy MB, et al. In vitro changes in human tenocyte cultures obtained from proximal biceps tendon: multiple passages result in changes in routine cell markers. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012;20(9):1666-72.
6. Klatte-Schulz F, Pauly S, Scheibel M, et al. Influence of age on the cell biological characteristics and the stimulation potential of male human tenocyte-like cells. *Eur Cell Mater* 2012;24:74-89.
7. De Mos M, Koevoet WJ, Jahr H, et al. Intrinsic differentiation potential of adolescent human tendon tissue: an in vitro cell differentiation study. *BMC Musculoskelet Disord* 2007;8:16.
8. Bi Y, Ehirchiou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 2007;13(10):1219-27.
9. Boutet MA, Najm A, Bart G, et al. IL-38 overexpression induces anti-inflammatory effects in mice arthritis models and in human macrophages in vitro. *Ann Rheum Dis* 2017;76(7):1304-1312.

10. Guihard P, Boutet MA, Brounais-Le Royer B, et al. Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury. *Am J Pathol* 2015;185(3):765-75.
11. David E, Guihard P, Brounais B, et al. Direct anti-cancer effect of oncostatin M on chondrosarcoma. *Int J Cancer* 2011;128(8):1822-35.
12. Le Goff B, Soltner E, Charrier C, et al. A combination of methotrexate and zoledronic acid prevents bone erosions and systemic bone mass loss in collagen induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R185.
13. Pauly S, Klatte F, Strobel C, et al. Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff. *Eur Cell Mater* 2010;20:84-97.
14. Guihard P, Danger Y, Brounais B, et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells* 2012;30(4):762-72.
15. Brennan MA, Renaud A, Guilloton F, et al. Inferior in vivo osteogenesis and superior angiogenesis of human adipose tissue: a comparison with bone marrow-derived stromal stem cells cultured in xeno-free conditions. *Stem Cells Transl Med* 2017;6(12):2160-2172.
16. Boutet MA, Bart G, Penhoat M, et al. Distinct expression of interleukin (IL)-36 α , β and γ , their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2016;184:159–73.
17. Salvetti A, Couté Y, Epstein A, et al. Nuclear functions of nucleolin through global proteomics and interactomic approaches. *J Proteome Res* 2016;15(5):1659-69.
18. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, et al. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc* 2013;8(8):1551-66.

19. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(6):3094-9.
20. Little D, Thompson JW, Dubois LG, et al. Proteomic differences between male and female anterior cruciate ligament and patellar tendon. *PLoS One* 2014;9(5):e96526.
21. Kharaz YA, Tew SR, Peffers M, et al. Proteomic differences between native and tissue-engineered tendon and ligament. *Proteomics* 2016;16(10):1547-56.
22. Ashraf Kharaz Y, Zamboulis D, Sanders K, et al. Comparison between chaotropic and detergent-based sample preparation workflow in tendon for mass spectrometry analysis. *Proteomics* 2017;17(13-14).
23. Cleland TP. Human Bone Paleoproteomics utilizing the single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation method to maximize detected proteins and reduce humics. *J Proteome Res* 2018;17(11):3976-3983.
24. Rossetti L, Kuntz LA, Kunold E, et al. The microstructure and micromechanics of the tendon-bone insertion. *Nat Mater* 2017;16(6):664-670.
25. Mason KE, Anex D, Grey T, et al. Protein-based forensic identification using genetically variant peptides in human bone. *Forensic Sci Int* 2018 Jul;288:89-96.
26. Cleland TP. Solid digestion of demineralized bone as a method to access potentially insoluble proteins and post-translational modifications. *J Proteome Res* 2018;17(1):536-542.
27. Önnarfjord P, Khabut A, Reinholt FP, et al. Quantitative proteomic analysis of eight cartilaginous tissues reveals characteristic differences as well as similarities between subgroups. *J Biol Chem* 2012;287(23):18913-24.
28. Folkesson E, Turkiewicz A, Englund M, et al. Differential protein expression in human knee articular cartilage and medial meniscus using two different proteomic methods: a pilot analysis. *BMC Musculoskelet Disord* 2018;19(1):416.

-
29. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D506-D515.
 30. Hasegawa T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem Cell Biol* 2018;149(4):289-304.
 31. Li F, Song N, Tombran-Tink J, et al. Pigment epithelium-derived factor enhances differentiation and mineral deposition of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2013;31(12):2714-23.
 32. Idolazzi L, Ridolo E, Fassio A, et al. Periostin: The bone and beyond. *Eur J Intern Med* 2017;38:12-16.
 33. Uthoff HK, Loehr JW. Calcific Tendinopathy of the Rotator Cuff: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *J Am Acad Orthop Surg* 1997;5(4):183-191. PMID: 10797220.
 34. Benjamin M, Ralphs JR. Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol.* 2004;233:1-45.
 35. Mueller MB, Tuan RS. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum* 2008;58(5):1377-88.
 36. Hattori T, Müller C, Gebhard S, et al. SOX9 is a major negative regulator of cartilage vascularization, bone marrow formation and endochondral ossification. *Development* 2010 Mar;137(6):901-11.
 37. Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, et al. Phenotypic drift in human tenocyte culture. *Tissue Eng* 2006;12(7):1843-9.
 38. Klatte-Schulz F, Pauly S, Scheibel M, et al. Characteristics and stimulation potential with BMP-2 and BMP-7 of tenocyte-like cells isolated from the rotator cuff of female donors. *PLoS One* 2013;8(6):e67209.

39. Wu CW, Tchetina EV, Mwale F, et al. Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J Bone Miner Res* 2002;17(4):639-51. PMID: 11918221.
40. Golub EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol* 2011 Sep;33(5):409-17.
41. Sheen CR, Kuss P, Narisawa S, et al. Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res* 2015;30(5):824-36.

Figure legends

Figure 1. Histological characterization of rotator cuff calcifications (N=5). **A:** calcific deposits assessed by micro-computed Tomography. **B:** HE (haematoxylin and eosin) staining of decalcified samples (1 image for each patient). **C:** Von Kossa staining on no decalcified samples and characterization of the fibrocartilaginous area with Alcian Blue staining, SO/FG (Safranin O Fast Green) staining and immunohistochemical staining for COL2 (brown) with Gill haematoxylin counterstain. **D and E:** Representative immunohistochemical staining for ENPP1 (Ectonucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterase 1), TNAP (Tissue nonspecific alkaline phosphatase), Runx2, Sox9, Col10 and CD31 (brown). TF: tendon fibers; CD: calcium deposits, FM: fibrocartilaginous metaplasia; OM: osseous metaplasia; CT: connective tissue; V: vessels. Scale bar = 200µM.

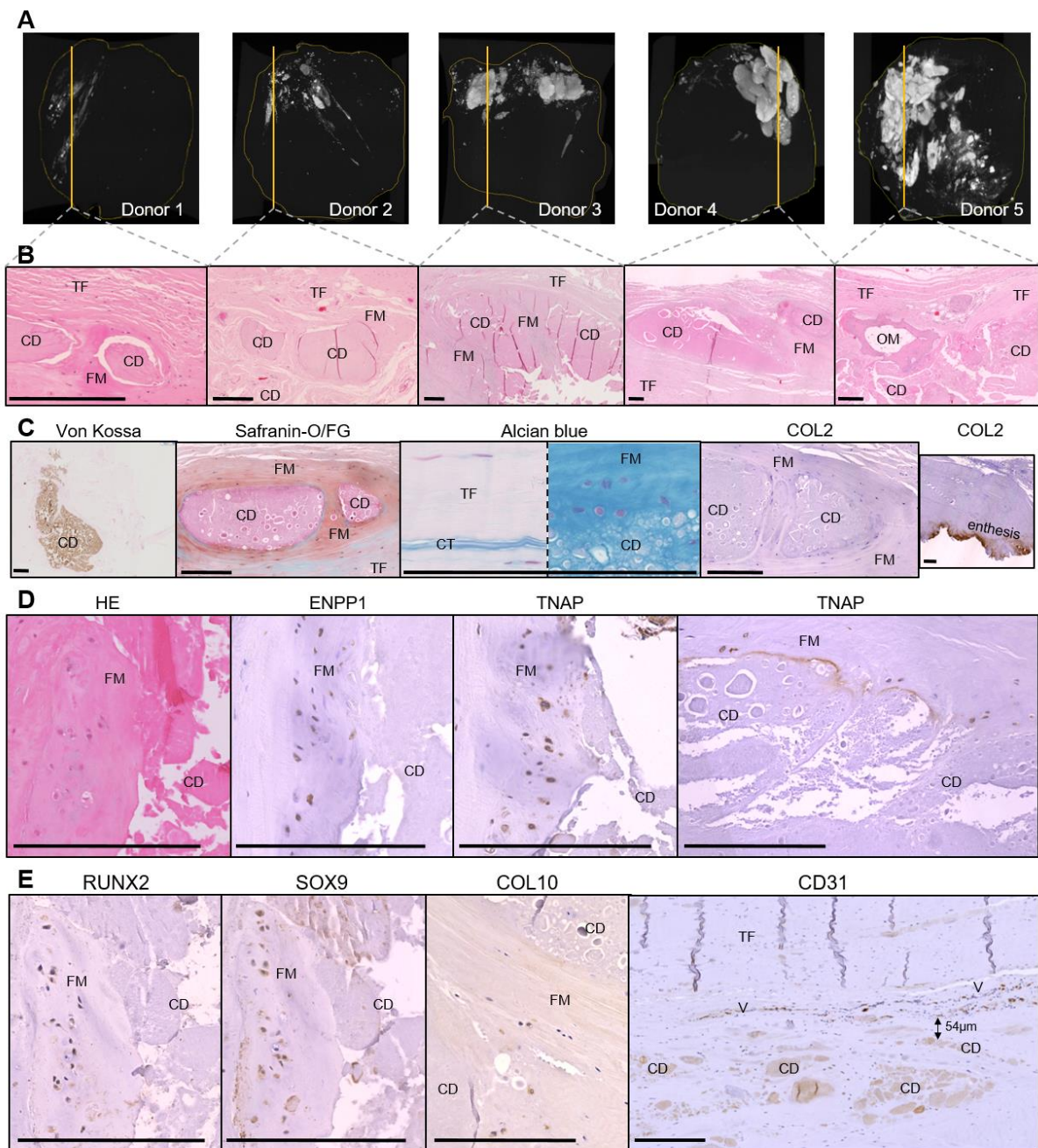


Figure 2. Assessment of mineral deposition induced by TLC after 21 days in the osteogenic medium and characterization of mineralizing cells. A: Assessment of mineral deposition by alizarin red S staining after 21 days (N=5). Quantification of the bound stain after solubilization with formic acid for the two conditions (reading at 450 nm) and representative images of the wells. CT: control medium; TLC: tenocyte-like cells; OM: osteogenic medium. Scale bar = 1mm. B: Gene expression by TLC cultured 21 days in the osteogenic medium or in the control medium (N=3 to 5). 1: Study of TNAP (tissue nonspecific alkaline phosphatase) and ENPP1 (Ectonucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterase 1) levels of expression. 2: Study of osteoblast markers: RUNX2, BGLAP (Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein), BSP (Bone SialoProtein) and SPP1 (Secreted PhosphoProtein 1). 3: Study of chondrocyte markers: SOX9, COL2A1, ACAN (aggrecan), COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein), COL10A1 and MMP13 (Matrix Metalloproteinase 13). 4: Study of tenocyte markers: SCX (Scleraxis), MKX (Mohawk Homeobox), TNMD (Tenomodulin), COL1A1 and COL3A1. * = $p < 0.05$.

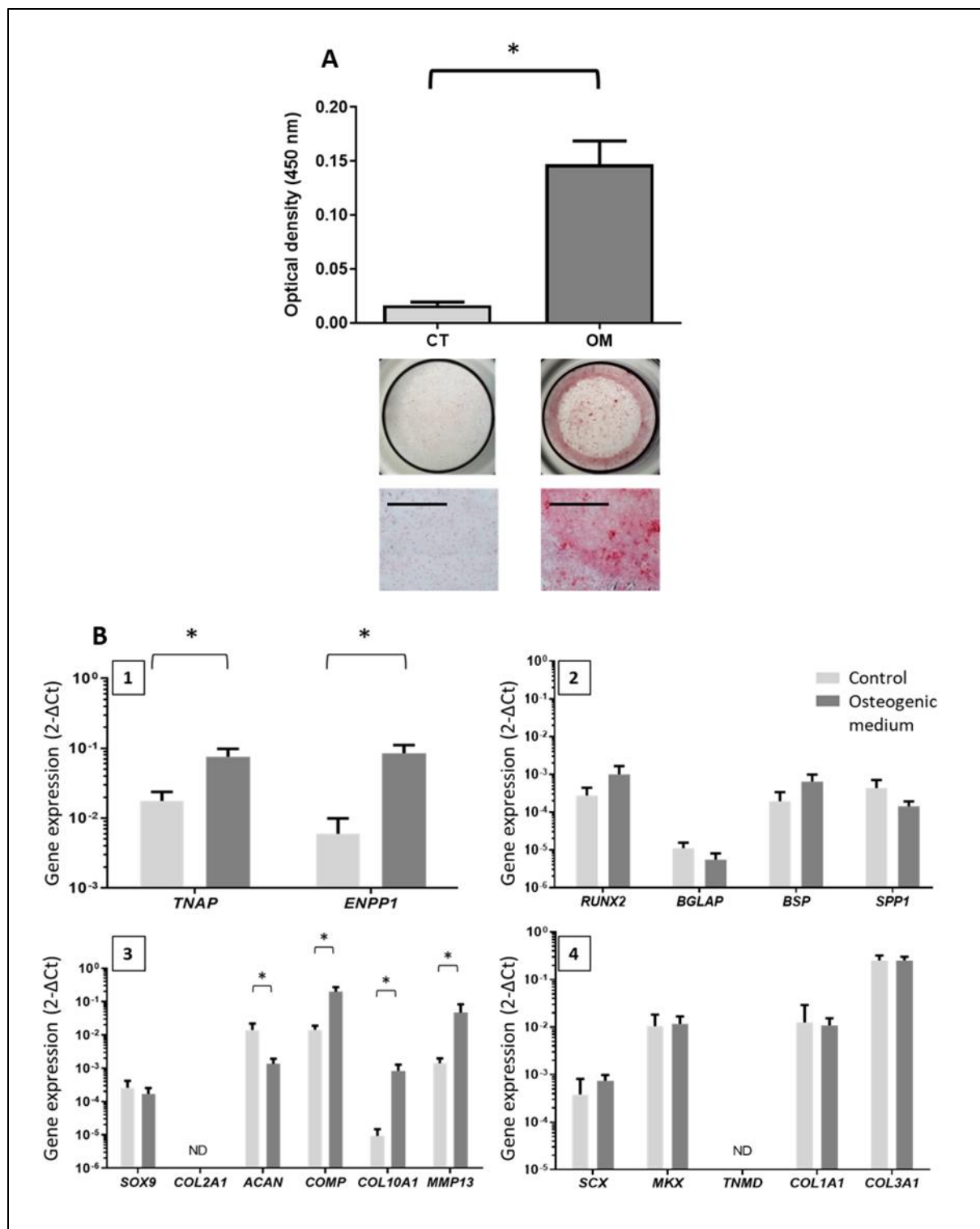


Figure 3. Study of TNAP involvement in the mineralization process. A: TNAP enzymatic activity over time for the two conditions (N=3). B: Effects of a TNAP inhibitor on the mineral deposition (N=3) assessed by the colorimetric method after solubilization of alizarin red. C: Representative images of alizarin red staining of wells of one patient. CT: control medium; OM: osteogenic medium; TNAPi: TNAP inhibitor. D: Gene expression by TLC after treatment with a TNAP inhibitor (N=3). TNAP: tissue nonspecific alkaline phosphatase; ENPP1: Ectonucleotidepyrophosphatase/ phosphodiesterase; ACAN: aggrecan; COMP: Cartilage Oligomeric Matrix Protein; COL10: type X collagen; MMP13: Matrix Metalloproteinase 13; CT: control; OM: osteogenic medium; TNAPi: TNAP inhibitor; ND: not detected. * = $p < 0.05$.

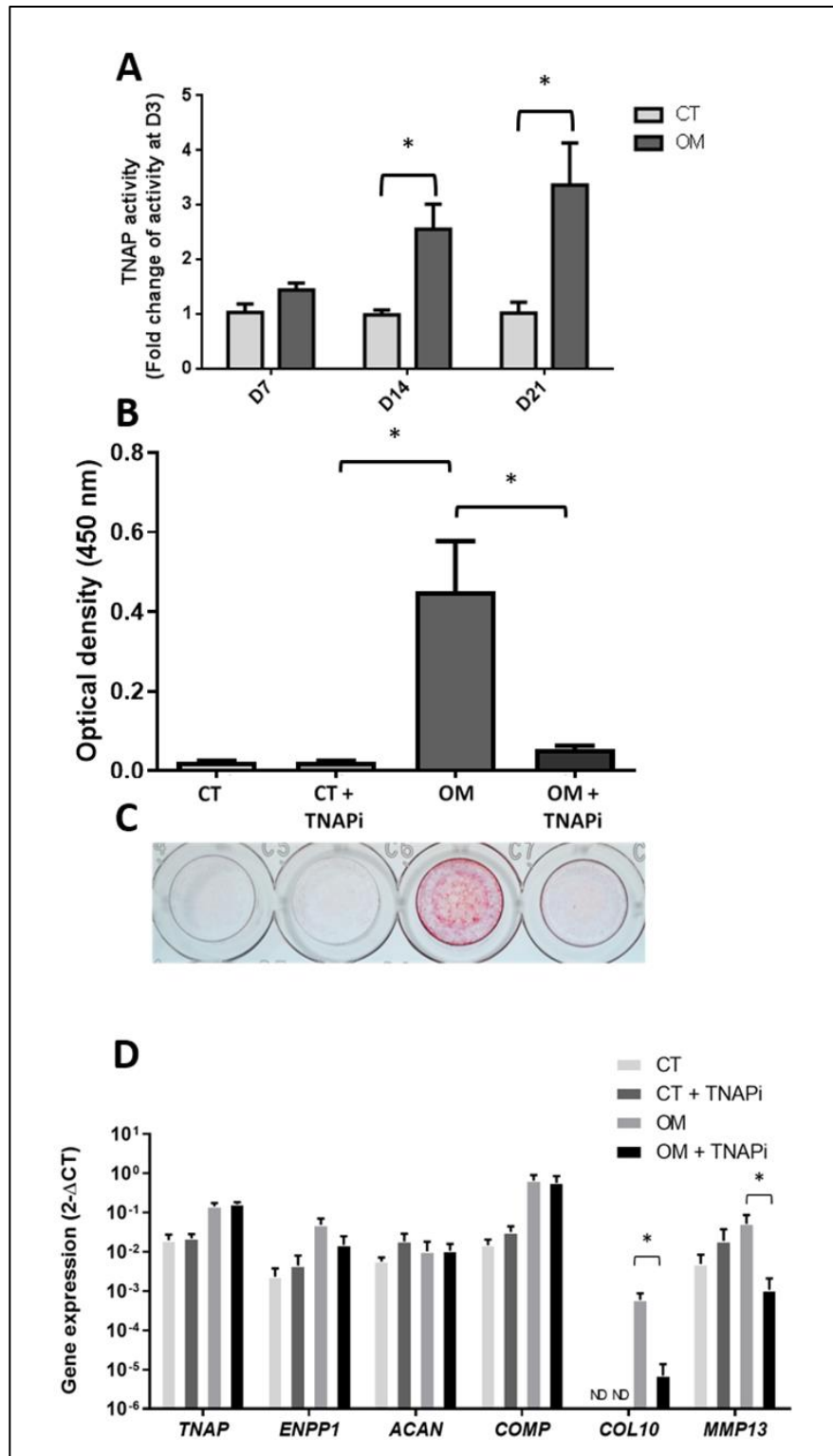


Figure 4. Characterization of TLC cultured in chondrogenic pellets. A: Representative images of histological and immunohistochemical staining of TLC pellets (CH medium) for COL2, SOX9, COL10, RUNX2, MKX, TNAP and ENPP1. COL2 positive control was obtained with a chondrosarcoma sample. HE: Hematoxylin and eosin. Scale bar 100µm. B: Gene expression of TLC cultured 4 weeks in chondrogenic pellets or in cell monolayer in control medium: levels of expression of osteoblast markers (1), chondrocyte markers (2) and tenocyte markers (3) (N=3) assessed by qPCR. * = $p < 0.05$.

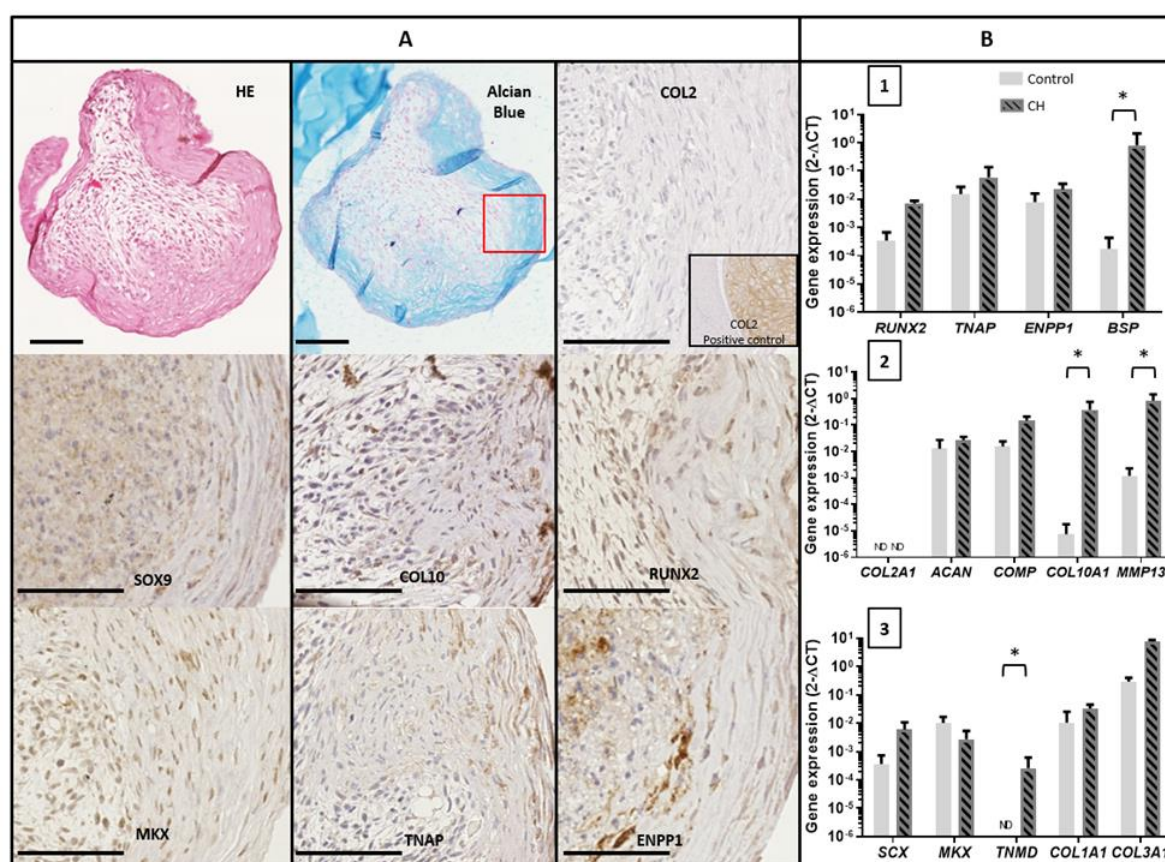


Figure 5. Mineralization ability of TLC in 3-D pellets and effects of a TNAP inhibitor (N=3). A: Representative images of Von Kossa staining of TLC pellets for two patients: mineralization was observed with donor 1 contrary to donors 2 and 3. B: Alcian blue staining. C: TNAP staining. CH = Chondrogenic medium for 4 weeks; CH-OM = chondrogenic medium for 1 week followed by 3 weeks in mixed chondrogenic/osteogenic medium; TNAPi = Tissue nonspecific alkaline phosphatase inhibitor, added for the last 3 weeks. Scale bar = 100 μ m.

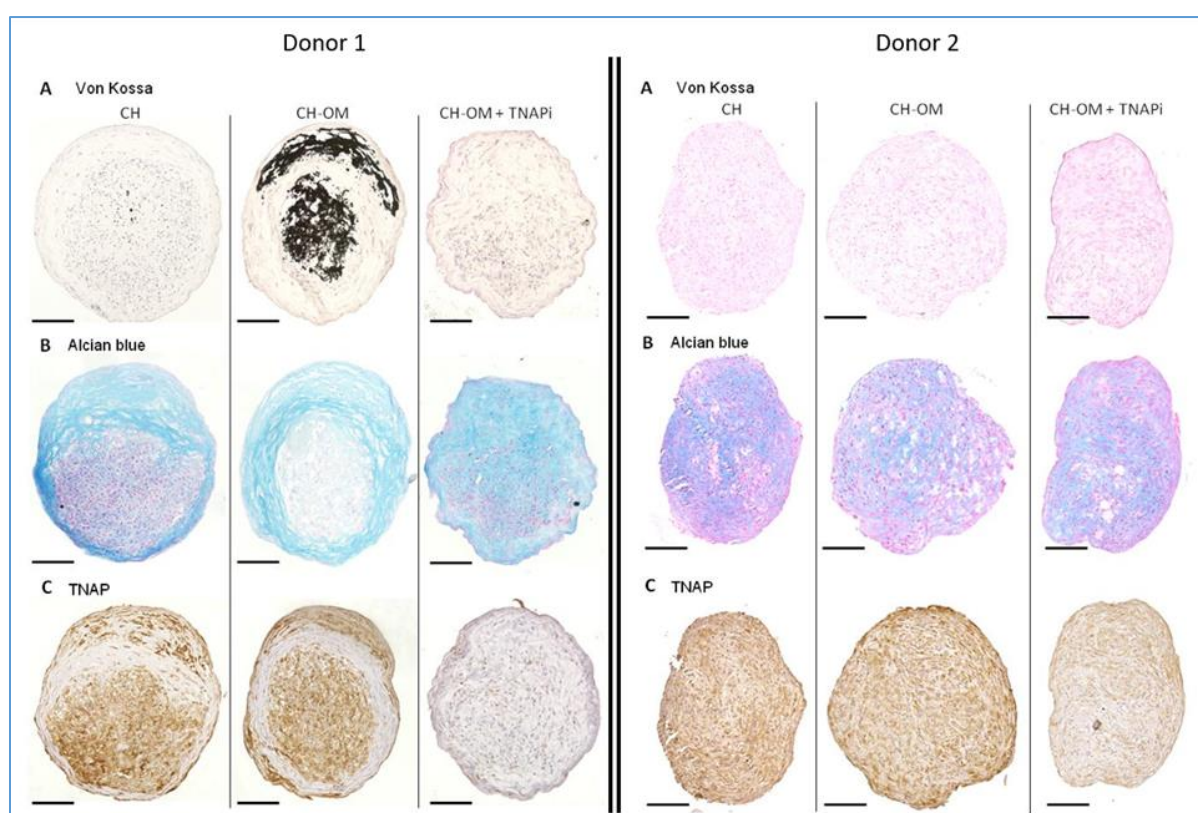
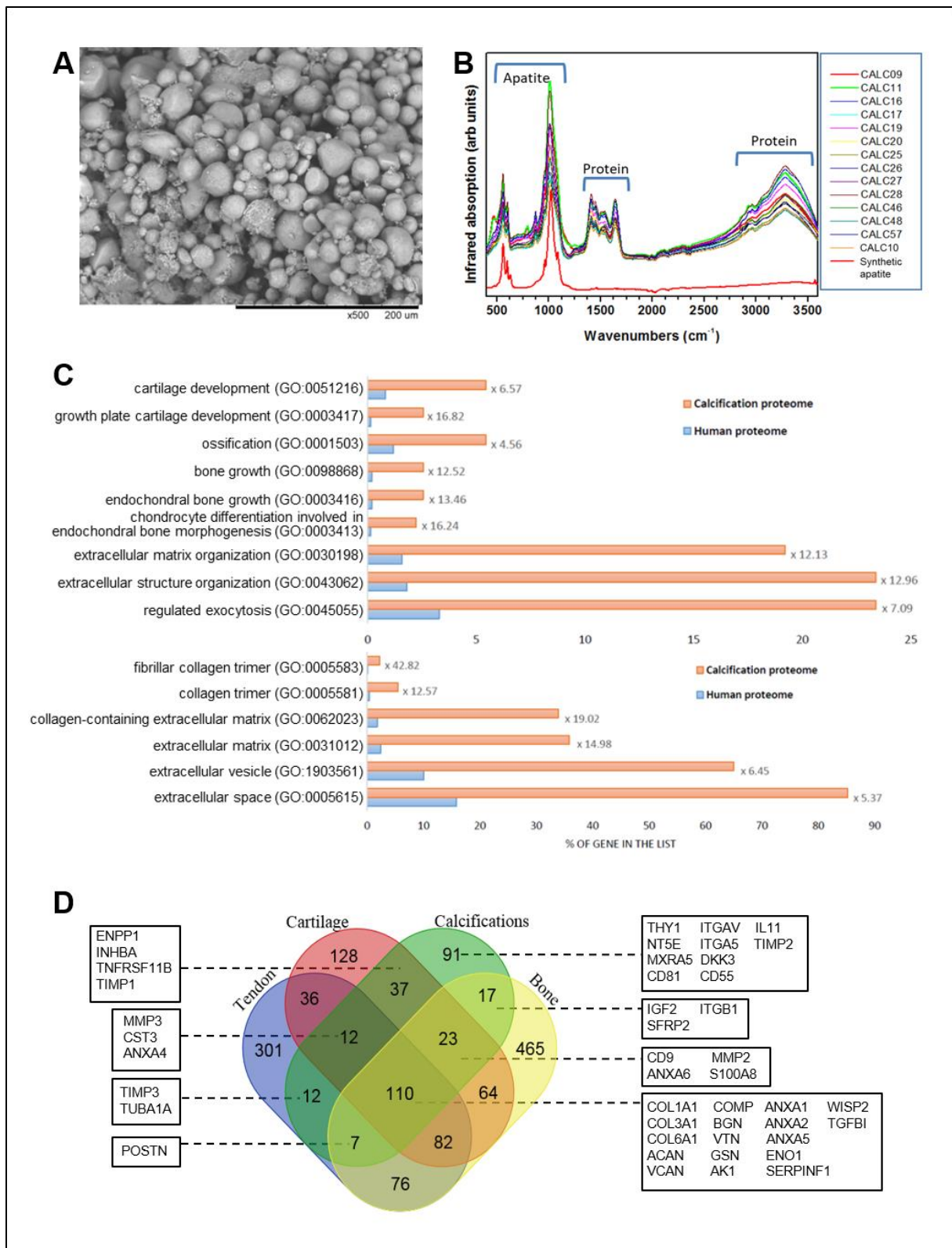


Figure 6. Analysis of the composition of calcifications extracted from patients. A: Electron Microscopy (SEM) of the calcic powder extracted from a representative patient. Scale bar 200µm. B: Fourier-Transformed Infrared (FTIR)-Spectroscopy of the patients' calcifications (N=14). SHA = synthetic hydroxyapatite. C: Bioinformatic analyses of the protein list identified in calcifications by mass spectrometry-based proteomic analyses (N=5). Percentage of genes classified in selected statistically significant GO terms in the total human proteome (blue bars) and in calcifications (orange bars) for biological process (upper panel) and cellular component (lower panel). Enrichment is indicated for each term. D: Comparison of the protein lists compiled for calcifications, bone, tendon and cartilage using Venn diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Selected proteins of interest are presented.



Supplemental material

Supplemental methods

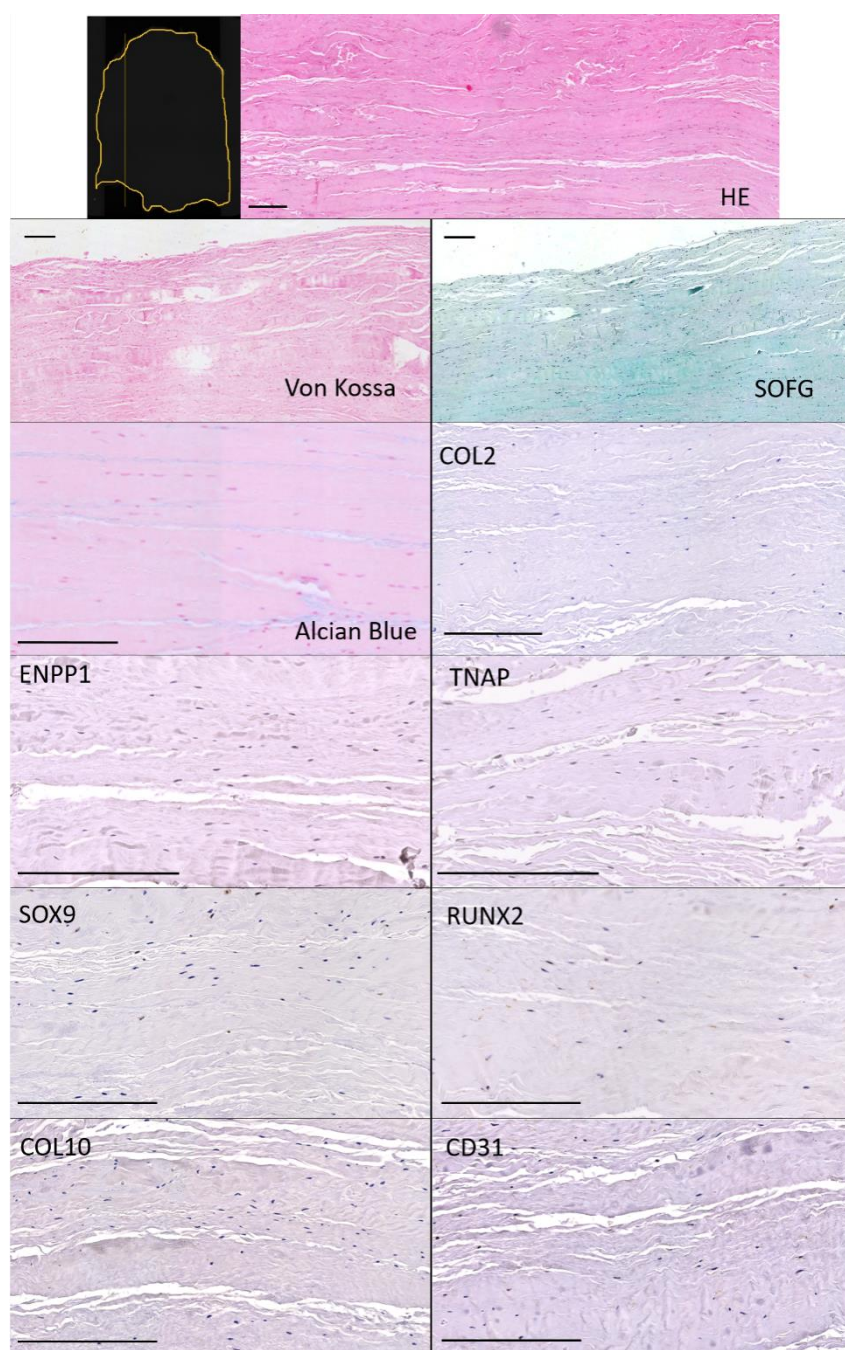
Characterization of tenocytes like cells

Surface markers of TLC were determined at passage 2 by flow cytometry (FACS). The cells were incubated with antibodies against CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD133 and CD146 for 20 minutes at room temperature. Unstained cells were used as controls (CT). After fixation, cells were analyzed with the BD-Accuri C6 Cytometer (BD Biosciences, Germany) and with BD-Accuri C6 Plus Software.

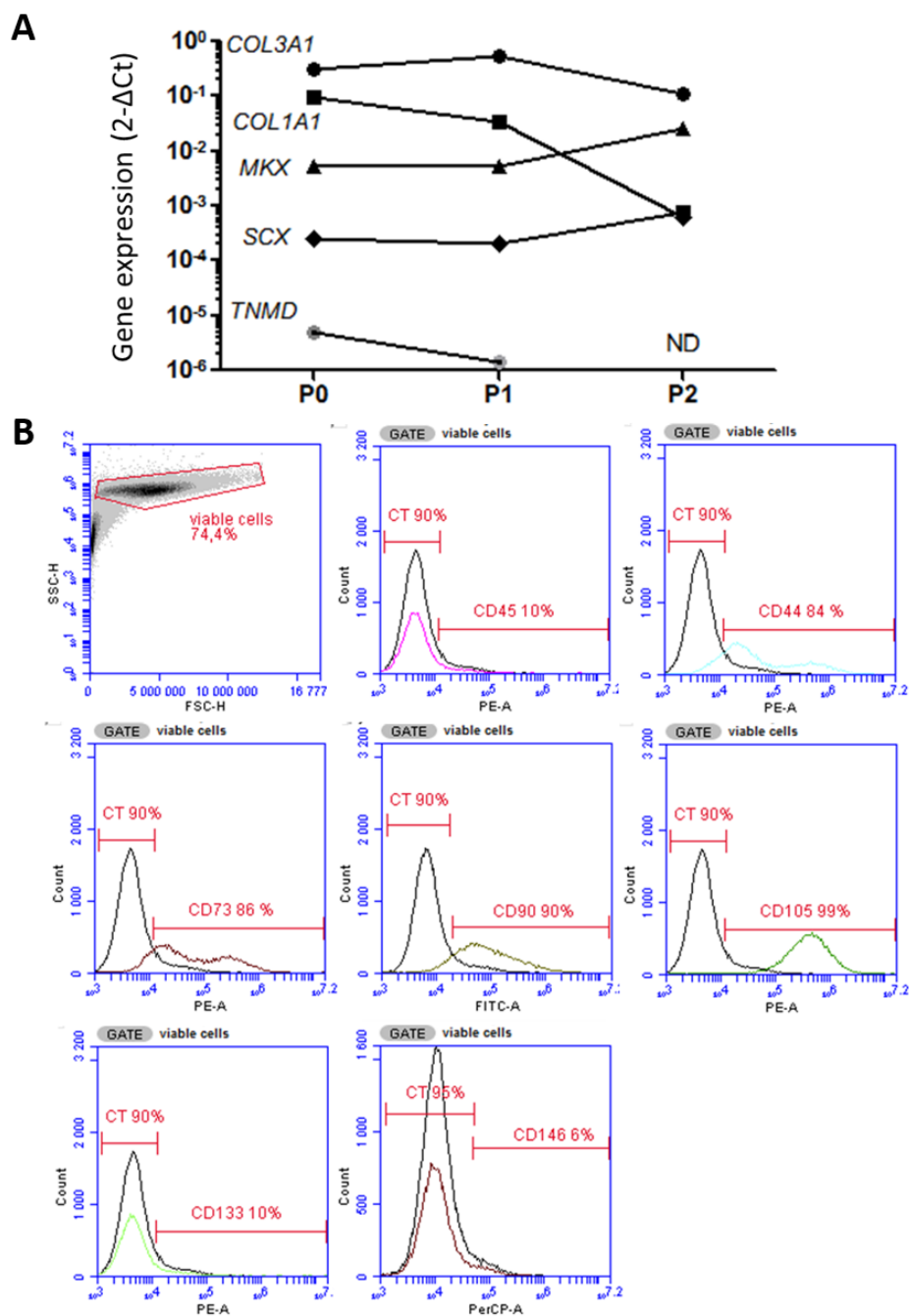
Table S1. Primers used for quantitative PCR.

GENE	Forward	Reverse
<i>RUNT-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2 (RUNX2)</i>	gcctaggcgcatttcaga	gctcttctactgagagtggaagg
<i>SOX9</i>	gtaccgcgacttgcaaac	tcgctctcggtcagaagtctc
<i>TYPE I COLLAGEN (COL1A1)</i>	ctggacctaagggtgctgct	gctccagcctctccatcttt
<i>TYPE II COLLAGEN (COL2A1)</i>	tgggtgctaattggcgagaag	cccagtctctccacgttcac
<i>TYPE III COLLAGEN (COL 3A1)</i>	agggaaagatggccaag	gcaccaccttcacccttacc
<i>TYPE X COLLAGEN (COL10A1)</i>	cacctctgcactgctcatc	ggcagcatattctcagatgga
<i>SECRETED PHOSPHOPROTEIN 1 (SPP1)</i>	gagggcttggtgtcagc	caattctcatggtagtgagtttcc
<i>BONE GAMMA-CARBOXYGLUTAMATE PROTEIN (BGLAP)</i>	ggcgctacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacagtc
<i>BONE SIALOPROTEIN (BSP)</i>	cgaatacacgggctgaatg	gtagctgtactcatctcatagggc
<i>TISSUE NON-SPECIFIC ALKALINE PHOSPHATASE (TNAP)</i>	aacaccacccaggggaac	ggtcacaatgcccacagatt
<i>ECTONUCLEOTIDE PYROPHOSPHATE/PHOPHODIESTERASE 1 (ENPP1)</i>	gaaagaccacactttacactctg	ggctttgatgacttcactgct
<i>MOHAWK HOMEODOMAIN (MKX)</i>	gctcgcagatgacgctagt	tctggctgtcgaaacggtatt
<i>SCLERAXIS (SCX)</i>	accttctgcctcagcaacca	ggccacctcctaactgcgaat
<i>TENOMODULIN (TNMD)</i>	gccagacaagcaagtgagga	ttgcctcgacggcagtaaat
<i>CARTILAGE OLIGOMERIC MATRIX PROTEIN (COMP)</i>	gacatcaggactctcgggacaac	tcgtcgtcgcaggcatcac
<i>AGGRECAN (ACAN)</i>	cccctgctatttcacgaccc	gacacacggctccacttgat
<i>MATRIX METALLOPEPTIDASE 13 (MMP13)</i>	cctggacaagtagttccaaagg	gccgggtgtaggttagatagga
<i>GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE dehydrogenase (GAPDH)</i>	tgggtgtgaaccatgagaagtatg	gggtgcaggaggcattgct

Supplemental figure S1. Histology and immunohistochemistry of a normal tendon (representative images). HE: haematoxylin and eosin; SO/FG: Safranin O Fast Green; COL2: type II collagen; ENPP1: Ectonucleotidepyrophosphatase/phosphodiesterase 1; TNAP: Tissue non-specific alkaline phosphatase; COL10: type X collagen. Scale bar = 200µM.



Supplemental figure S2. Characterization of tenocyte-like cells. A: Gene expression of tenocyte markers at different passages assessed by quantitative PCR (N=1). B: Surface markers of tenocyte-like cells assessed by Flow Cytometry (N=1). COL: collagen; MKX: Mohawk homeobox; SCX: scleraxis; TNMD: Tenomodulin; P: passage; ND: not detected; CT: control with unstained cells.



Supplementary Table S2. Proteomic analysis of calcium deposits from 5 patients.

P: peptides; SC: Spectral Count; BSC : Basic Spectral Count; SSC: Specific Spectral Count.

Accession	Description	Gene name	Patient 1			Patient 2			Patient 3			Patient 4			Patient 5			Total SSC
			P	BS C	SS C	P	BS C	SS C	P	BS C	SS C	P	BS C	SS C	P	BS C	SS C	
AOA024R462	Fibronectin 1, isoform CRA_n	FN1	72	136	136	63	110	110	74	132	132	87	221	221	75	169	169	768
CO3	Complement C3	C3	76	138	138	44	73	73	52	80	80	86	183	183	49	80	80	554
APOA1	Apolipoprotein A-I	APOA1	25	84	78	28	110	101	29	107	100	28	88	82	31	136	125	486
ANT3	Antithrombin-III	SERPINC1	27	60	60	21	38	38	26	53	53	26	68	68	24	49	49	268
PLMN	Plasminogen	PLG	32	40	40	24	29	29	29	38	38	39	64	64	38	63	63	234
CO6A3	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	30	36	36	19	22	22	27	39	39	50	64	64	32	39	39	200
APOA4	Apolipoprotein A-IV	APOA4	15	24	24	24	46	46	22	29	29	21	25	25	20	33	33	157
CLUS	Clusterin	CLU	12	21	21	12	27	27	13	28	28	21	42	42	19	36	36	154
GELS	Gelsolin	GSN	20	38	38	15	26	26	20	29	29	13	18	18	24	39	39	150
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	COMP	22	35	33	11	19	16	14	19	16	30	60	57	20	27	25	147
PRG4	Proteoglycan 4	PRG4	14	30	30	10	13	12	11	13	12	26	75	71	12	21	21	146
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	13	36	36	8	16	16	13	38	38	8	23	23	11	30	30	143
ALBU	Serum albumin	ALB	69	775	40	60	672	15	66	823	40	56	395	8	66	659	27	130
APOB	Apolipoprotein B-100	APOB	14	14	14	19	26	26	5	5	5	62	73	73	3	3	3	121
AOA024R884	Tenascin C (Hexabrachion), isoform CRA_a	TNC	17	20	20	8	10	10	13	14	14	39	47	47	21	25	25	116
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	13	23	23	13	22	22	15	27	27	11	17	17	12	22	22	111
PCOC1	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOLCE	12	20	20	12	18	18	14	21	21	13	25	25	13	25	25	109
B4DPP8	cDNA FLJ53075, highly similar to Kininogen-1		12	15	15	9	13	13	13	21	21	19	29	29	16	27	27	105
AOA384MDQ7	Epididymis secretory sperm binding protein		32	87	22	37	111	28	32	107	14	24	59	11	33	97	16	91
B4E1Z4	cDNA FLJ55673, highly similar to Complement factor B		15	19	19	12	13	13	14	16	16	15	19	19	13	18	18	85
CERU	Ceruloplasmin	CP	21	29	29	5	6	6	10	11	11	19	24	24	8	12	12	82
FGFP2	Fibroblast growth factor-binding protein 2	FGFBP2	11	16	16	9	16	16	9	16	16	11	17	17	12	16	16	81
VTNC	Vitronectin	VTN	5	10	10	7	9	9	5	8	8	14	41	41	6	11	11	79
CILP1	Cartilage intermediate layer protein 1	CILP	10	11	11	10	12	12	8	10	10	24	29	29	15	16	16	78
CO9	Complement component C9	C9	10	13	13	5	5	5	8	10	10	19	38	38	7	11	11	77
VTDB	Vitamin D-binding protein	GC	9	13	13	9	13	13	9	16	16	13	17	17	14	18	18	77
APOE	Apolipoprotein E	APOE	6	7	7	10	11	11	8	9	9	18	32	32	14	17	17	76
FIBB	Fibrinogen beta chain	FGB	11	13	13	8	11	11	11	13	13	28	35	35	3	3	3	75
THRB	Prothrombin	F2	12	15	15	3	5	5	5	8	8	21	37	37	6	9	9	74
F5GY80	Complement component C8 beta chain	C8B	11	17	17	6	10	10	6	8	8	16	19	19	11	12	12	66
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	7	14	14	6	9	9	5	7	7	10	24	24	8	12	12	66
TENX	Tenascin-X	TNXB	8	8	8	14	15	15	12	13	13	14	14	14	12	12	12	62

AOA024R617	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	29	69	4	33	87	4	31	11	19	25	59	11	35	10	20	58
CRAC1	Cartilage acidic protein 1	CRTAC1	10	12	12	7	7	7	5	5	5	14	21	21	8	10	10	55
Q6PIL8	IGK@ protein	IGK@	5	19	11	6	24	13	6	23	11	6	22	12	5	17	7	54
ALS	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	IGFALS	9	12	12	5	5	5	7	7	7	12	17	17	7	12	12	53
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein	LBP	9	12	12	2	3	3	5	6	6	8	17	17	7	13	13	51
HTRA1	Serine protease HTRA1	HTRA1	12	14	14	4	6	6	6	8	8	10	16	16	4	5	5	49
ANGT	Angiotensinogen	AGT	7	8	8	7	11	11	6	7	7	7	11	11	8	11	11	48
B4E1B2	cDNA FLJ53691, highly similar to Serotransferrin		4	5	5	8	8	8	10	12	12	10	13	13	9	10	10	48
TTHY	Transthyretin	TTR	8	12	12	4	5	5	8	14	14	9	9	9	8	8	8	48
CO8A	Complement component C8 alpha chain	C8A	8	10	10	4	5	5	5	5	5	16	18	18	8	9	9	47
CO8G	Complement component C8 gamma chain	C8G	4	10	10	2	5	5	3	6	6	8	15	15	6	11	11	47
FIBG	Fibrinogen gamma chain	FGG	8	8	8	5	6	6	7	7	7	17	20	20	3	3	3	44
CO1A2	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	9	10	10	5	5	5	9	9	9	7	7	7	9	11	11	42
FIBA	Fibrinogen alpha chain	FGA	4	4	4	3	4	4	6	8	8	16	21	21	5	5	5	42
IPSP	Plasma serine protease inhibitor	SERPINA5	7	8	8	8	11	11	7	9	9	6	7	7	7	7	7	42
KAIN	Kallistatin	SERPINA4	8	11	11	5	6	6	6	7	7	7	9	9	7	9	9	42
SPRC	SPARC	SPARC	7	10	10	6	7	7	7	8	8	1	1	1	10	14	14	40
CO5	Complement C5	C5	5	5	5	6	7	7	1	1	1	19	22	22	4	4	4	39
ITI4	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	ITI4	4	4	4	5	7	7	2	2	2	14	18	18	6	6	6	37
CO3A1	Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	4	4	4	5	6	6	6	9	9	5	6	6	10	11	11	36
HEP2	Heparin cofactor 2	SERPIND1	7	7	7	3	4	4	4	6	6	11	13	13	5	6	6	36
INHBA	Inhibin beta A chain	INHBA	3	3	3	3	4	4	6	6	6	8	9	9	11	14	14	36
Q6N093	Uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)	DKFZp686I04196	10	18	10	7	10	2	13	25	9	12	25	10	10	18	5	36
APOA2	Apolipoprotein A-II	APOA2	3	7	7	5	7	7	5	7	7	4	8	8	3	6	6	35
Q6MZQ6	Uncharacterized protein DKFZp686G11190	DKFZp686G11190	12	25	5	11	22	7	13	31	7	12	32	8	13	31	7	34
APOC1	Apolipoprotein C-I	APOC1	3	3	3	4	9	9	4	6	6	5	8	8	3	6	6	32
BGH3	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFB1	7	8	8	4	4	4	3	3	3	8	10	10	7	7	7	32
CCD80	Coiled-coil domain-containing protein 80	CCDC80	5	6	6	1	1	1	2	2	2	10	16	16	4	6	6	31
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14	5	9	9	2	2	2	4	5	5	4	6	6	7	9	9	31
Q8NEJ1	Uncharacterized protein		3	7	4	4	9	4	5	16	9	5	9	6	4	11	8	31
CHAD	Chondroadherin	CHAD	6	10	10	4	5	5	1	1	1	6	10	10	3	4	4	30
HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	HABP2	1	1	1	2	3	3	5	8	8	9	13	13	5	5	5	30
TSP1	Thrombospondin-1	THBS1	6	7	7	3	3	3	5	5	5	6	7	7	8	8	8	30
PRELP	Prolargin	PRELP	5	6	6	2	2	2	4	5	5	9	12	12	4	4	4	29
APOL1	Apolipoprotein L1	APOL1	2	2	2	3	4	4	4	4	4	8	10	10	7	8	8	28
CO7	Complement component C7	C7	3	3	3				3	3	3	14	18	18	4	4	4	28
LUM	Lumican	LUM	4	6	6	1	1	1	6	9	9	5	6	6	4	5	5	27
SAMP	Serum amyloid P-component	APCS	5	6	6	3	4	4	4	5	5	6	8	8	4	4	4	27
A2AP	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2	7	7	7	3	3	3	5	5	5	4	5	5	6	6	6	26
AMBP	Protein AMBP	AMBP	4	5	5	1	1	1	4	5	5	5	8	8	5	7	7	26
CO6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	3	4	4	2	2	2	4	5	5	6	9	9	6	6	6	26

		1						
ENOA	Alpha-enolase	ENO1	5 6 6	3 3 3	4 4 4	9 10 10	2 3 3	26
MXRA5	Matrix-remodeling-associated protein 5	MXRA5	2 2 2			¹ ₇ 22 22	2 2 2	26
SODE	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3	5 6 6	3 3 3	3 3 3	4 7 7	5 7 7	26
PGS2	Decorin	DCN	5 6 6	4 5 5	2 2 2	8 11 11	1 1 1	25
PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	1 1 1	1 4 4	2 3 3	5 12 12	2 5 5	25
VIME	Vimentin	VIM		1 1 1	1 1 1	¹ ₂ 15 15	7 8 8	25
HBB	Hemoglobin subunit beta	HBB	7 12 4	3 4 2	7 11 4	5 6 2	¹ ₁ 22 12	24
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	3 4 4	3 3 3		8 9 9	5 7 7	23
FBLN1	Fibulin-1	FBLN1	2 2 2		1 1 1	¹ ₂ 16 16	3 3 3	22
ANXA1	Annexin A1	ANXA1	1 1 1	2 2 2	4 5 5	7 8 8	5 5 5	21
H14	Histone H1.4	HIST1H1E	4 5 5	2 3 3	2 3 3	3 4 4	4 6 6	21
HBA	Hemoglobin subunit alpha	HBA1	4 6 6	2 3 3	2 2 2	3 3 3	6 7 7	21
HPT	Haptoglobin	HP	5 6 4	3 4 3	9 11 7	5 7 6	2 3 1	21
IBP5	Insulin-like growth factor-binding protein 5	IGFBP5	3 3 3	1 3 3	3 4 4	6 7 7	4 4 4	21
LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	3 3 3	1 1 1	1 1 1	¹ ₀ 14 14	2 2 2	21
PGRP2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	PGLYRP2	2 2 2			8 13 13	5 6 6	21
TARSH	Target of Nesh-SH3	ABI3BP	2 3 3	1 1 1	2 2 2	9 13 13	1 2 2	21
AEBP1	Adipocyte enhancer-binding protein 1	AEBP1	2 2 2			¹ ₁ 16 16	2 2 2	20
FHR1	Complement factor H-related protein 1	CFHR1	6 6 2	5 7 1	9 13 4	8 9 3	¹ ₀ 19 9	19
A0A024R498	Serpin peptidase inhibitor, clade E (Nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2, isoform CRA_b	SERPINE2	2 2 2			¹ ₁ 13 13	3 3 3	18
ANXA5	Annexin A5	ANXA5	4 4 4	1 1 1	4 4 4	7 7 7	2 2 2	18
CBPB2	Carboxypeptidase B2	CPB2	3 3 3	3 3 3	1 1 1	6 9 9	2 2 2	18
MMP3	Stromelysin-1	MMP3	1 1 1	1 1 1	4 4 4	7 8 8	4 4 4	18
APOD	Apolipoprotein D	APOD	1 1 1	3 4 4	2 2 2	6 6 6	4 4 4	17
CO6A2	Collagen alpha-2(VI) chain	COL6A2	2 2 2	1 1 1	3 3 3	7 9 9	2 2 2	17
FHR2	Complement factor H-related protein 2	CFHR2	5 5 3	4 5 2	7 11 6	4 5 2	7 8 4	17
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	4 5 5			9 11 11	1 1 1	17
ANXA2	Annexin A2	ANXA2	3 3 3	1 2 2		6 7 7	4 4 4	16
CH3L1	Chitinase-3-like protein 1	CHI3L1	7 7 7	1 1 1	1 1 1	5 5 5	2 2 2	16
IC1	Plasma protease C1 inhibitor	SERPINC1		3 5 5	2 2 2	7 7 7	2 2 2	16
IGK	Immunoglobulin kappa light chain		6 11 3	7 14 4	7 15 4	7 12 2	7 13 3	16
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2	1 1 1	1 1 1	2 2 2	8 10 10	2 2 2	16
MIME	Mimcan	OGN	4 6 6	2 2 2	2 3 3	2 3 3	2 2 2	16
TR11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	TNFRSF11B	3 4 4	1 1 1	3 3 3	2 3 3	5 5 5	16
A0A075B622	T cell receptor alpha joining 56 (Fragment)	TRAJ56	1 4 4	1 5 5	1 3 3	1 2 2	1 1 1	15
B2R5G8	Serum amyloid A protein		4 4 1	4 5 1	3 3 1	5 15 8	5 9 4	15
TRFM	Melanotransferrin	MELTF		2 2 2	1 1 1	3 3 3	9 9 9	15
APOC3	Apolipoprotein C-III	APOC3	1 1 1	2 5 5	2 3 3	2 2 2	2 3 3	14
CILP2	Cartilage intermediate layer protein 2	CILP2	2 2 2	1 1 1	1 1 1	6 7 7	3 3 3	14
IGHG3	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	IGHG3	8 15 3	9 11 2	¹ ₂ 21 4	¹ ₁ 22 3	9 18 2	14
LYSC	Lysozyme C	LYZ	2 2 2		3 3 3	3 4 4	5 5 5	14
MMP2	72 kDa type IV collagenase	MMP2	1 1 1			8 11 11	2 2 2	14
QSOX1	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	2 2 2		1 1 1	6 6 6	5 5 5	14
A0A0X9UWL5	GCT-A5 light chain variable region (Fragment)		1 1 1	2 3 3	3 4 4	2 3 3	2 2 2	13
FNDC1	Fibronectin type III domain-containing protein 1	FNDC1	1 1 1		3 3 3	5 6 6	3 3 3	13

KPYM	Pyruvate kinase PKM	PKM					1 1	13	13									13
A0A0G2J PR0	Complement C4-A	C4A	2 9	37	3	1 2	15	1	6	7	4 5	71	5	1 7	20	3		12
A0A0X9U SM3	GCT-A4 heavy chain variable region (Fragment)		2	3	3	3	4	3	2	3	2	3	3	1	4	5	3	12
FMOD	Fibromodulin	FMOD	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	5	5	2	3	3	12
RNAS4	Ribonuclease 4	RNASE 4	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	5	5	12
APOH	Beta-2-glycoprotein 1	APOH				1	1	1	1	1	1	3	5	5	4	4	4	11
B1ALD9	Periostin	POSTN	8	8								2 6	37	7	1 3	17	4	11
CO4B	Complement C4-B	C4B	3 0	36	2	1 1	14		7	8	1	4 6	73	7	1 6	18	1	11
GPX3	Glutathione peroxidase 3	GPX3	1	1	1							6	8	8	2	2	2	11
ITIH1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	ITIH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	5	5	3	3	3	11
PGBM	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	6	7	1	2	2	1	7	10	1	1 4	14	7	7	12	1	11
THBG	Thyroxine-binding globulin	SERPIN A7	2	2	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	2	2	2	11
A0N5G3	Rheumatoid factor G9 light chain (Fragment)	V-lambd a-3				1	1	1	3	5	5	1	1	1	2	3	3	10
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	A2M	3	3	3							7	7	7				10
AT2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A 2							2	2					1 3	16	10	10
CCL18	C-C motif chemokine 18	CCL18	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	3	10
CO5A1	Collagen alpha-1(V) chain	COL5A 1										7	9	9	1	1	1	10
CSPG2	Versican core protein	VCAN	1	1	1	2	2	2	1	1	1	5	6	6				10
TIMP2	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2							3	3	3	2	2	2	3	5	5	10
ABCF1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	ABCF1	1	3	3	1	2	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	9
ATPB	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5F 1B										2	2	2	7	7	7	9
F6KPG5	Albumin (Fragment)		6 8	73 7	2	5 9	66 0	3	6 5	78 6	3	5 3	38 7		6 3	63 3	1	9
KLKB1	Plasma kallikrein	KLKB1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	5	5	5				9
L0R5A1	Alternative protein CSF2RB	CSF2R B	1	1	1	1	3	3	1	2	2	1	1	1	1	2	2	9
PCOC2	Procollagen C-endopeptidase enhancer 2	PCOLC E2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	5	5	5				9
Q6NS95	IGL@ protein	IGL@	3	4	1	3	6	1	5	11	4	3	4	1	4	5	2	9
Q96K68	cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080, highly similar to Homo sapiens SNC73 protein (SNC73) mRNA		3	6	2	3	4	2	4	6	2	6	6	2	4	4	1	9
SAA4	Serum amyloid A-4 protein	SAA4	4	4	1	3	4		3	3	1	6	10	3	6	9	4	9
A0A125Q YY9	IBM-B2 heavy chain variable region (Fragment)		1	1	1	1	1	1	2	4	4	1	1	1	1	1	1	8
A2KBB9	Anti-(ED-B) scFV (Fragment)		3	4	2	4	4	1	4	4	1	5	6	2	5	6	2	8
ACTS	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	2	2		4	4	1	4	4		6	11	2	1 0	13	5	8
AMPN	Aminopeptidase N	ANPEP										7	8	8				8
AT2A1	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	ATP2A 1							5	5	3				9	11	5	8
B4DPR2	cDNA FLJ50830, highly similar to Serum albumin		5 3	62 6	7	4 2	55 2		4 8	66 0		3 8	31 5		4 7	52 3	1	8
ENPP1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1	ENPP1										8	8	8				8
HEMO	Hemopexin	HPX				1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	3	3	8
PGS1	Biglycan	BGN	1	1	1							6	6	6	1	1	1	8
PLTP	Phospholipid transfer protein	PLTP	1	1	1	1	1	1				4	4	4	2	2	2	8
ZPI	Protein Z-dependent protease inhibitor	SERPIN A10	2	2	2				1	1	1	3	5	5				8
1433Z	14-3-3 protein zeta/delta	YWHA Z	1	1		1	1	1	1	1	1	5	6	4	1	1	1	7

AOA0X9T D47	MS-D1 light chain variable region (Fragment)		1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	1	1	7
C1S	Complement C1s subcomponent	C1S										5	5	5	1	2	2	7
CO2A1	Collagen alpha-1(II) chain	COL2A1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	4	7
CO5A2	Collagen alpha-2(V) chain	COL5A2										5	6	6	1	1	1	7
D3DXT7	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a	COL1A1	3	5	5				1	1	1				1	1	1	7
MOES	Moesin	MSN	1	1	1							5	5	5	1	1	1	7
NUCB1	Nucleobindin-1	NUCB1	1	1	1				1	1	1	3	3	3	2	2	2	7
SEPP1	Selenoprotein P	SELENOP							3	3	3	2	2	2	2	2	2	7
TETN	Tetranectin	CLEC3B	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2	7
TPIS	Triosephosphate isomerase	TPI1	1	1	1							3	6	6				7
APOF	Apolipoprotein F	APOF							1	1	1	2	3	3	1	2	2	6
CFAD	Complement factor D	CFD							2	2	2	1	1	1	2	3	3	6
COFA1	Collagen alpha-1(XV) chain	COL15A1										4	6	6				6
FA9	Coagulation factor IX	F9	2	2	2	1	1	1				2	2	2	1	1	1	6
IGD	Immunoglobulin delta heavy chain											4	4	4	2	2	2	6
IL11	Interleukin-11	IL11	2	2	2				2	2	2	1	1	1	1	1	1	6
LTBP1	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	LTBP1										4	5	5	1	1	1	6
MATN2	Matrilin-2	MATN2	1	1	1							3	4	4	1	1	1	6
PAI1	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1										3	3	3	3	3	3	6
PLOD1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1										5	6	6				6
PRDX1	Peroxiredoxin-1	PRDX1	1	1	1				1	1	1	3	3	3	1	1	1	6
Q9UL78	Myosin-reactive immunoglobulin light chain variable region (Fragment)		2	2	1	3	3	1	3	3	1	2	3	2	2	2	1	6
RET4	Retinol-binding protein 4	RBP4	1	1	1				2	2	2				2	3	3	6
TBA1A	Tubulin alpha-1A chain	TUBA1A	1	1	1	1	1	1				3	3	3	1	1	1	6
TSG6	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein	TNFAIP6	1	1	1							3	3	3	2	2	2	6
TSP4	Thrombospondin-4	THBS4	2	2		3	3		1	3		8	9	5	3	3	1	6
VDAC1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	VDAC1							1	1	1	1	1	1	4	4	4	6
5NTD	5'-nucleotidase	NT5E										5	5	5				5
AOA1B1C YC8	Vitamin D binding protein (Fragment)	Gc	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1				5
ACTN4	Alpha-actinin-4	ACTN4	1	1								1	1	1	1	1	5	5
ANG1	Angiogenin	ANG							1	1	1	2	2	2	2	2	2	5
C1R	Complement C1r subcomponent	C1R										5	5	5				5
CADH1	Cadherin-1	CDH1	1	1	1							3	3	3	1	1	1	5
CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide	CAMP	1	1	1				1	1	1	1	1	1	1	2	2	5
CD109	CD109 antigen	CD109										5	5	5				5
DAF	Complement decay-accelerating factor	CD55				1	1	1				2	2	2	2	2	2	5
DKK3	Dickkopf-related protein 3	DKK3							1	1	1	1	1	1	3	3	3	5
EF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	1	1	1							3	3	3	1	1	1	5
H4	Histone H4	HIST1H4A	1	1	1				1	1	1	2	2	2	1	1	1	5
HV349	Immunoglobulin heavy variable 3-49	IGHV3-49	1	1	1	1	1	1				2	3	3				5
IGHG4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4	IGHG4	6	11		5	6		9	16	3	8	14	2	6	12		5
ITB1	Integrin beta-1	ITGB1										5	5	5				5
LTBP2	Latent-transforming growth factor beta-	LTBP2										4	5	5				5

	binding protein 2							
SAP	Prosaposin	PSAP				2 3 3	1 2 2	5
THY1	Thy-1 membrane glycoprotein	THY1		2 2 2	1 1 1		2 2 2	5
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	5
TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3	TIMP3				5 5 5		5
TM198	Transmembrane protein 198	TMEM198	1 1 1	1 1 1	2 2 2		1 1 1	5
A0A120HG46	GCT-A10 heavy chain variable region (Fragment)		2 2 2	1 1 1	1 1 1		1 1	4
A0A2P9AAK1	ATP-dependent DNA ligase	BQ8482_110076	1 1 1			1 1 1	1 2 2	4
ACTG	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	5 5	3 3	4 4	¹ / ₃ 20 4	7 10	4
ADT1	ADP/ATP translocase 1	SLC25A4					2 4 4	4
C1QC	Complement C1q subcomponent subunit C	C1QC				1 2 2	2 2 2	4
CATD	Cathepsin D	CTSD				4 4 4		4
CFAH	Complement factor H	CFH	² / ₉ 34	² / ₉ 35	³ / ₆ 46 2	³ / ₀ 34	³ / ₆ 48 2	4
CO6	Complement component C6	C6	9 10	6 6	¹ / ₃ 15 1	¹ / ₀ 14 2	¹ / ₀ 12 1	4
COCA1	Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1				1 1 1	3 3 3	4
COEA1	Collagen alpha-1(XIV) chain	COL14A1				3 4 4		4
COIA1	Collagen alpha-1(XVIII) chain	COL18A1	1 1 1		1 1 1	1 1 1	1 1 1	4
CRP	C-reactive protein	CRP	1 1 1		1 1 1	2 2 2		4
FSTL1	Follistatin-related protein 1	FSTL1		1 1 1	1 1 1	1 1 1	1 1 1	4
GDIR1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI A	1 1 1		1 1 1	1 1 1	1 1 1	4
GSTP1	Glutathione S-transferase P	GSTP1	1 1 1			2 2 2	1 1 1	4
GTR1	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	SLC2A1	1 1 1			1 1 1	2 2 2	4
HBD	Hemoglobin subunit delta	HBD	2 3		1 1	1 1	7 10 4	4
HPTR	Haptoglobin-related protein	HPR	2 2	1 1	4 4	3 3 2	3 4 2	4
IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu	IGHM	1 1 1	1 1 1	3 3 1	5 5 1		4
LEG1	Galectin-1	LGALS1				4 4 4		4
SPON1	Spondin-1	SPON1				3 3 3	1 1 1	4
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH				4 4 4		4
1433G	14-3-3 protein gamma	YWHA G	1 1			4 5 3		3
A0A024RC55	Milk fat globule-EGF factor 8 protein, isoform CRA_a	MFGE8	5 6	4 5	5 5	¹ / ₅ 21 3	7 10	3
A0A024RDT5	Periostin, osteoblast specific factor, isoform CRA_a	POSTN	8 8			² / ₃ 32 2	¹ / ₀ 14 1	3
A0A193CHRO	10E8 heavy chain variable region (Fragment)		1 1	1 1	1 1	3 3 1	4 4 2	3
A0A2U8J8J2	Ig heavy chain variable region (Fragment)	IgH	1 1 1		1 1 1	1 1 1	1 1	3
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1			1 1 1	2 2 2		3
A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG				2 3 3		3
A2J1M8	Rheumatoid factor RF-IP12 (Fragment)		1 1 1			1 1 1	1 1 1	3
AFAM	Afamin	AFM			2 2 2		1 1 1	3
ANXA4	Annexin A4	ANXA4				3 3 3		3
APOM	Apolipoprotein M	APOM	4 4 2	1 1	2 2	4 7	3 4 1	3
ASPN	Asporin	ASPN				3 3 3		3
ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5F1A				1 1 1	2 2 2	3
BASI	Basigin	BSG				3 3 3		3
CALM1	Calmodulin-1	CALM1		1 1 1	1 2 2			3
CD5L	CD5 antigen-like	CD5L			2 2 2	1 1 1		3

CD81	CD81 antigen	CD81					3	3	3		3						
CFAI	Complement factor I	CFI					1	1	1	1	2	2	3				
CH3L2	Chitinase-3-like protein 2	CHI3L2					3	3	3				3				
CXL13	C-X-C motif chemokine 13	CXCL13					2	3	3				3				
DSG1	Desmoglein-1	DSG1		2	2	2	1	1	1				3				
FBLN3	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1					2	2	2	1	1	1	3				
HV374	Immunoglobulin heavy variable 3-74	IGHV3-74	2	2	1	1	1	1		3	3	1	3				
IBP3	Insulin-like growth factor-binding protein 3	IGFBP3					1	2	2	1	1	1	3				
IQGA1	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	IQGAP1					3	3	3				3				
ITA5	Integrin alpha-5	ITGA5					3	3	3				3				
ITAV	Integrin alpha-V	ITGAV					2	3	3				3				
KAD1	Adenylate kinase isoenzyme 1	AK1					2	3	3				3				
OAF	Out at first protein homolog	OAF	1	1	1		1	1	1	1	1	1	3				
PLAK	Junction plakoglobin	JUP								3	3	3	3				
PPIC	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	PPIC					1	2	2	1	1	1	3				
Q59EG0	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein variant (Fragment)		6	7	1	1	1	7	10	1	7	7	7	12	1	3	
Q9UL83	Myosin-reactive immunoglobulin light chain variable region (Fragment)					3	4	1	1	2	2	1	1	1	2	3	
RL40	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	UBA52				1	2	2					1	1	1	3	
S10A7	Protein S100-A7	S100A7											2	3	3	3	
S29A1	Equilibrative nucleoside transporter 1	SLC29A1								3	3	3				3	
S6BGE0	IgG H chain		8	16	1	6	12	1	6	16	6	19	8	19	1	3	
SRPX2	Sushi repeat-containing protein SRPX2	SRPX2	1	1	1					2	2	2				3	
TRY1	Trypsin-1	PRSS1				1	1	1		1	1	1	1	1	1	3	
TRY3	Trypsin-3	PRSS3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				3	
AOA0X9UWK7	MS-D4 heavy chain variable region (Fragment)									2	2	1	1	1	1	2	
AOA0X9V9B3	MS-F1 light chain variable region (Fragment)								1	1	1	1	1	1		2	
AOA1L2BU40	Anti-staphylococcal enterotoxin E variable region lambda chain (Fragment)												1	2	2	2	
AOA2P9AXT4	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	BQ8482_90344								1	1	1	1	1	1	2	
AOA2R8Y4P5	Required for meiotic nuclear division protein 1 homolog (Fragment)	RMND1											1	2	2	2	
AOA2U8J8Q6	Ig heavy chain variable region (Fragment)	IgH				1	1	1		1	1	1				2	
AOA2U8J8T1	Ig heavy chain variable region (Fragment)	IgH	1	1	1					2	2	1	1	1		2	
AOA2U8J936	Ig heavy chain variable region (Fragment)	IgH								1	1	1	1	1	1	2	
A2NB45	Cold agglutinin FS-1 L-chain (Fragment)								2	2	2					2	
A8K5T0	cDNA FLJ75416, highly similar to Homo sapiens complement factor H (CFH), mRNA		29	34		31	37	2	35	44	30	34	34	46		2	
A8K8Z4	cDNA FLJ78071, highly similar to Human MHC class III complement component C6 mRNA		10	11	1	6	6		12	14	9	12	10	12	1	2	
AAAT	Neutral amino acid transporter B(0)	SLC1A5								1	2	2				2	
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	5	5		3	3		4	4	12	17	1	8	11	1	2
ACTN1	Alpha-actinin-1	ACTN1	1	1						8	8	2				2	
ANGL2	Angiopoietin-related protein 2	ANGPTL2								2	2	2				2	
ANXA6	Annexin A6	ANXA6								2	2	2				2	
AQP1	Aquaporin-1	AQP1								2	2	2				2	
ARF1	ADP-ribosylation factor 1	ARF1								2	2	1	1	1	1	2	

B2MG	Beta-2-microglobulin	B2M				1	2	2				2					
B2R8I2	cDNA, FLJ93914, highly similar to Homo sapiens histidine-rich glycoprotein (HRG), mRNA		1 0	20	1	6	6	1	8	15	1 3	22	1 1	21	2		
B4DJ26	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAR amidotransferase), isoform CRA_c	PFAS				1	2	2						2			
C1QB	Complement C1q subcomponent subunit B	C1QB	1	1	1	1	1	1						2			
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	C4BPA									2	2	2		2		
CD9	CD9 antigen	CD9									2	2	2		2		
CLC11	C-type lectin domain family 11 member A	CLEC11A									2	2	2		2		
CLIC1	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1									2	2	2		2		
CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4	CLIC4									2	2	2		2		
CNTRL	Centriolin	CNTRL									1	1	1	1	1	2	
COF1	Cofilin-1	CFL1	1	1	1									1	1	1	2
CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	CSPG4									2	2	2			2	
CYC	Cytochrome c	CYCS	1	1	1				1	1	1					2	
CYTC	Cystatin-C	CST3	1	1	1				1	1	1					2	
EF2	Elongation factor 2	EEF2									2	2	2			2	
FA10	Coagulation factor X	F10	1	1	1	1	1	1								2	
FABPH	Fatty acid-binding protein, heart	FABP3									1	1	1	1	1	1	2
FBN1	Fibrillin-1	FBN1									1	1	1	1	1	1	2
FHR3	Complement factor H-related protein 3	CFHR3	2	2		1	1		1	1	1	1	1	3	3	1	2
FILA2	Filaggrin-2	FLG2												1	2	2	2
GDI2	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2									2	2	2			2	
H2B1B	Histone H2B type 1-B	HIST1H2BB				1	1	1			1	1	1			2	
HRG	Histidine-rich glycoprotein	HRG	1 0	20	1	5	5		8	15	1 4	23	1	1 1	21		2
HSPB1	Heat shock protein beta-1	HSPB1									1	1	1	1	1	1	2
IGF2	Insulin-like growth factor II	IGF2									2	2	2			2	
ISK5	Serine protease inhibitor Kazal-type 5	SPINK5									1	2	2			2	
KPRP	Keratinocyte proline-rich protein	KPRP				1	1	1						1	1	1	2
MA1A1	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA	MAN1A1									2	2	2			2	
MAMC2	MAM domain-containing protein 2	MAMDC2									1	2	2			2	
MED30	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 30	MED30									1	1	1	1	1	1	2
MGST3	Microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3									1	1	1	1	1	1	2
MMRN2	Multimerin-2	MMRN2							1	1	1			1	1	1	2
MRCKB	Serine/threonine-protein kinase MRCK beta	CDC42BPB	1	1	1						1	1	1			2	
NB5R3	NADH-cytochrome b5 reductase 3	CYB5R3									2	2	2			2	
NBL1	Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1	NBL1									1	2	2			2	
NEUS	Neuroserpin	SERPINI1												2	2	2	2
PA2GA	Phospholipase A2, membrane associated	PLA2G2A	1	1	1						1	1	1			2	
PGCA	Aggrecan core protein	ACAN									2	2	2			2	
PLOD2	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2									2	2	2			2	
PLSL	Plastin-2	LCP1	1	1	1						3	3	1			2	
PLST	Plastin-3	PLS3									4	4	2			2	
PPIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	1	1	1						1	1	1			2	
Q6U2L6	C4B (Fragment)	C4B	1	1	1									1	1	1	2
Q9UL85	Myosin-reactive immunoglobulin kappa chain variable region (Fragment)					2	3				2	2	1	2	3	1	2
Q9Y355	Apolipoprotein A1 (Fragment)		4	6		6	10	1	4	7	6	7	1	4	11		2

QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	UQCRC 2						1	2	2	2				
S10A8	Protein S100-A8	S100A 8						2	2	2	2				
S6BAM6	IgG H chain		7	15	5	11	6	16	7	20	1	8	19	1	2
SEM3C	Semaphorin-3C	SEMA3 C						1	1	1		1	1	1	2
SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2	SFRP2						2	2	2					2
SIL1	Nucleotide exchange factor SIL1	SIL1						2	2	2					2
SRCRL	Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D	SSC5D						1	1	1		1	1	1	2
SRPX	Sushi repeat-containing protein SRPX	SRPX						2	2	2					2
TAGL2	Transgelin-2	TAGLN 2						2	2	2					2
TBB2A	Tubulin beta-2A chain	TUBB2 A						2	2	2					2
TITIN	Titin	TTN						1	1	1		1	1	1	2
TLN1	Talin-1	TLN1						2	2	2					2
TM109	Transmembrane protein 109	TMEM 109						1	1	1		1	1	1	2
TUT7	Terminal uridylyltransferase 7	TUT7					1	1	1		1	1	1		2
VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	VAT1						2	2	2					2
VINC	Vinculin	VCL						2	2	2					2
WISP2	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2	WISP2										2	2	2	2

C. Résultats complémentaires

En microscopie électronique, nous avons observé que la poudre calcique extraite de l'épaule des patients était constituée d'éléments sphériques associées à une gangue (Figure 8A). Pour l'apatite de synthèse, on ne retrouvait pas ces éléments sphériques (Figure 8B). On peut supposer que cette différence de morphologie est liée à l'ensemble des protéines associées aux cristaux d'apatite.

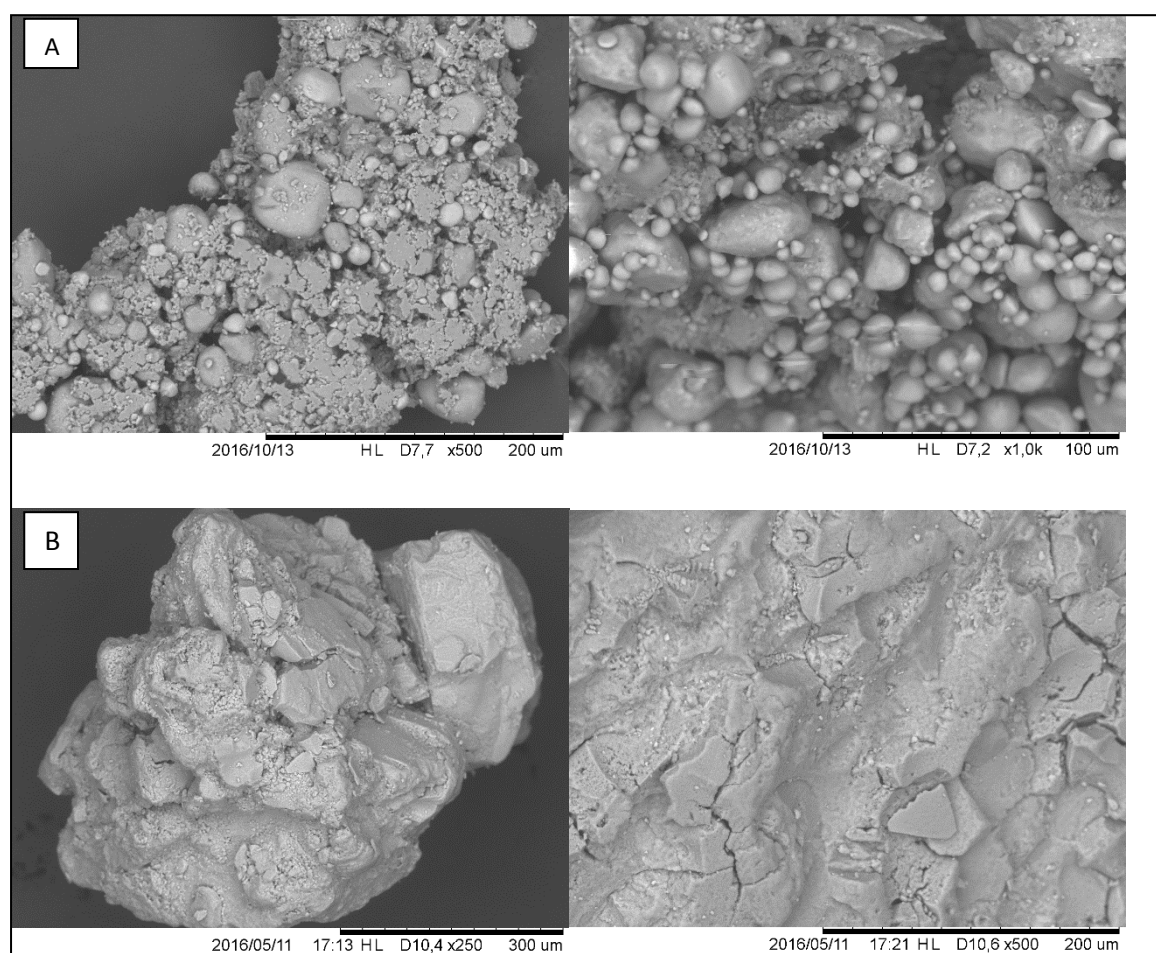


Figure 8. **A:** Aspect d'une calcification de patient (image représentative) en microscopie électronique à balayage. **B:** Aspect en microscopie électronique de l'apatite de synthèse.

Les deux tableaux suivants reprennent des résultats plus complets de l'analyse par spectrométrie de masse que ceux intégrés dans l'article (Figure 7C de l'article) en ce qui concerne les processus biologiques ou les groupes de composants cellulaires. Nous les avons classés par groupes fonctionnels.

Tableau 1. Résultats sélectionnés de l'analyse des processus biologiques selon la Gene Ontology (GO).

Analysis Type:	PANTHER Overrepresentation Test (Released 20181113)
Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2019-01-01
Analyzed List:	Client Text Box Input (Homo sapiens)
Reference List:	Homo sapiens (all genes in database)
Test Type:	FISHER
Correction:	BONFERRONI
Bonferroni count:	8749

GO biological process complete	fold Enrichment	p-value
Extracellular structure organization (GO:0043062)	12,96	5,69E-51
Extracellular matrix organization (GO:0030198)	12,13	1,77E-39
Regulated exocytosis (GO:0045055)	7,09	1,13E-34
Exocytosis (GO:0006887)	6,29	1,67E-31
Secretion by cell (GO:0032940)	5,46	5,23E-31
Vesicle-mediated transport (GO:0016192)	3,76	5,81E-30
Wound healing (GO:0042060)	7,32	1,85E-23
Response to wounding (GO:0009611)	6,49	1,00E-22
Collagen fibril organization (GO:0030199)	26,33	1,01E-14
Acute inflammatory response (GO:0002526)	16,59	9,24E-12
Regulation of response to wounding (GO:1903034)	9,99	1,64E-11
Inflammatory response (GO:0006954)	4,91	3,96E-10
Regulation of anatomical structure morphogenesis (GO:0022603)	3,31	7,51E-10
Supramolecular fiber organization (GO:0097435)	4,98	1,51E-09
Skeletal system development (GO:0001501)	4,64	4,12E-09
Anatomical structure morphogenesis (GO:0009653)	2,41	9,02E-09
Tissue development (GO:0009888)	2,54	5,16E-08
Cartilage development (GO:0051216)	6,57	3,02E-05
high-density lipoprotein particle remodeling (GO:0034375)	35,63	6,06E-07
Cartilage development involved in endochondral bone morphogenesis (GO:0060351)	15,65	3,84E-05
Glycosaminoglycan catabolic process (GO:0006027)	12,14	6,65E-05
Extracellular matrix disassembly (GO:0022617)	11,57	1,04E-04
Chondrocyte differentiation (GO:0002062)	9,5	1,62E-04
Connective tissue development (GO:0061448)	5,43	1,66E-04
Positive regulation of wound healing (GO:0090303)	12,94	1,88E-04
Glycosaminoglycan metabolic process (GO:0030203)	6,68	2,09E-04
Regulation of inflammatory response (GO:0050727)	4,39	3,51E-04
Regulation of vesicle-mediated transport (GO:0060627)	3,48	3,99E-04
Chondrocyte development (GO:0002063)	14,08	5,11E-04
Positive regulation of response to wounding (GO:1903036)	11,22	6,26E-04
Regulation of phosphate metabolic process (GO:0019220)	2,15	8,19E-04
Regulation of phosphorus metabolic process (GO:0051174)	2,14	8,35E-04
Growth plate cartilage development (GO:0003417)	16,82	8,65E-04

Endochondral bone morphogenesis (GO:0060350)	9,61	2,28E-03
Growth plate cartilage chondrocyte differentiation (GO:0003418)	19,63	2,30E-03
Endochondral bone growth (GO:0003416)	13,46	3,83E-03
Bone development (GO:0060348)	5,23	4,05E-03
Ossification (GO:0001503)	4,56	4,31E-03
Bone growth (GO:0098868)	12,52	6,23E-03
Glycosaminoglycan biosynthetic process (GO:0006024)	7,4	6,28E-03
Chondrocyte differentiation involved in endochondral bone morphogenesis (GO:0003413)	16,24	6,85E-03
Chondrocyte morphogenesis (GO:0090171)	22,43	8,86E-03
Growth plate cartilage chondrocyte morphogenesis (GO:0003429)	22,43	8,86E-03
Chondrocyte morphogenesis involved in endochondral bone morphogenesis (GO:0003414)	22,43	8,86E-03
Collagen metabolic process (GO:0032963)	9,61	9,14E-03
Growth plate cartilage morphogenesis (GO:0003422)	21,25	1,15E-02
Regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:2001236)	5,54	1,32E-02
Bone morphogenesis (GO:0060349)	6,61	1,75E-02
Tissue remodeling (GO:0048771)	7,08	2,90E-02
Chondrocyte development involved in endochondral bone morphogenesis (GO:0003433)	17,56	2,94E-02
Regulation of apoptotic signaling pathway (GO:2001233)	3,36	3,79E-02

Processus biologiques en lien avec le maintien de la matrice extracellulaire (collagène, glycosaminoglycanes et autres)

Processus biologiques en lien avec l'exocytose et la synthèse de vésicules

Processus biologiques en lien avec la réponse inflammatoire

Processus biologiques en lien avec le chondrocyte et le cartilage

Processus biologiques en lien avec l'os et l'ossification endochondrale

Processus biologiques en lien avec l'apoptose et les lipoprotéines

Processus biologiques en rapport avec la cicatrisation et la réparation tissulaire

Processus biologiques en lien avec le métabolisme du phosphore

Autres processus biologiques

Tableau 2. Résultats sélectionnés de l'analyse des composants cellulaires selon la Gene Ontology (GO).

Analysis Type:	PANTHER Overrepresentation Test (Released 20181113)
Annotation Version and Release Date:	GO Ontology database Released 2019-01-01
Analyzed List:	Client Text Box Input (Homo sapiens)
Reference List:	Homo sapiens (all genes in database)
Test Type:	FISHER
Correction:	BONFERRONI
Bonferroni count:	1423

GO cellular components complete	fold Enrichment	P-value
Extracellular region part (GO:0044421)	5,17	9,69E-156
Extracellular space (GO:0005615)	5,37	1,47E-154
Extracellular region (GO:0005576)	4,34	7,36E-146
Extracellular vesicle (GO:1903561)	6,45	3,00E-115
Extracellular exosome (GO:0070062)	6,49	7,49E-115
Collagen-containing extracellular matrix (GO:0062023)	19,02	1,72E-93
Extracellular matrix (GO:0031012)	14,98	1,62E-89
Vesicle (GO:0031982)	3,92	6,77E-88
Secretory vesicle (GO:0099503)	5,28	6,39E-30
High-density lipoprotein particle (GO:0034364)	39,88	8,03E-16
Lipoprotein particle (GO:1990777)	27,61	7,69E-14
Extracellular matrix component (GO:0044420)	20,6	2,59E-11
Collagen trimer (GO:0005581)	12,57	4,99E-10
Triglyceride-rich plasma lipoprotein particle (GO:0034385)	33,65	1,29E-08
Very-low-density lipoprotein particle (GO:0034361)	33,65	1,29E-08
Fibrillar collagen trimer (GO:0005583)	42,82	5,32E-06
Complex of collagen trimers (GO:0098644)	24,79	9,95E-05
Intermediate-density lipoprotein particle (GO:0034363)	53,84	7,63E-03
Low-density lipoprotein particle (GO:0034362)	24,03	9,11E-03
Integral component of membrane (GO:0016021)	0,58	3,71E-03
Intrinsic component of membrane (GO:0031224)	0,64	4,90E-02

	Composants cellulaires en lien avec la matrice extra-cellulaire
	Composants cellulaires des vésicules sécrétées
	Composants cellulaires lipidiques (lipoprotéines)

D. Discussion complémentaire

Une analyse complémentaire des résultats du screening par protéomique est fournie dans les Tableaux 1 et 2. On y retrouve un enrichissement significatif en protéines du métabolisme osseux et du cartilage et en particulier des voies de l'ossification endochondrale et du cartilage de croissance comme rapporté dans l'article. On retrouve également, de manière attendue, une large proportion de protéines entrant dans la constitution de la matrice extra-cellulaire. Cependant, il est intéressant de noter d'autres processus biologiques sur-représentés concernant notamment l'exocytose et le transport de vésicules mais également l'apoptose ou la réponse inflammatoire.

Concernant l'enrichissement en protéines associées aux vésicules, ceci suggère peut-être la présence de vésicules matricielles dans le phénomène de calcification tendineuse. Ces vésicules matricielles représentent un site de nucléation des cristaux d'apatite et participent à la minéralisation de l'os, du cartilage et de la dentine. Elles concentrent en leur sein le calcium et le phosphore issus du milieu extracellulaire et possèdent des enzymes-clés de la minéralisation (TNAP, ENPP1 et Phospho-1) (50,51). Leur présence a été démontrée dans le tendon bien que leur densité n'était pas plus importante dans les zones calcifiées par rapport au reste du tendon (25). Dans les calcifications vasculaires, il a été mis en évidence des particules ressemblant à des vésicules matricielles qui pourraient participer au phénomène de minéralisation pathologique (50,51). De même, dans le cartilage, il existe des petites vésicules extracellulaires produites par les chondrocytes qui sont le site de formation de cristaux de calcium pathologiques qui vont se déposer dans la matrice cartilagineuse (52).

Un autre élément intéressant est la présence d'un enrichissement en protéines associées à l'apoptose et en lipoprotéines et composants de la membrane cellulaire. En effet, il a été suggéré que les phospholipides issus de débris cellulaires pourraient avoir un rôle dans les calcifications pathologiques (28). En effet, des complexes comprenant calcium, phosphate et phospholipides sont capables d'induire des dépôts d'apatite à la fois *in vitro* et *in vivo* (28,29). Dans le cartilage, il est établi que les calcifications proviennent en partie de corps apoptotiques issus des chondrocytes dont la composition est proche des vésicules matricielles avec une activité enzymatique TNAP et ENPP1 (53). En outre, les cristaux eux-

mêmes peuvent induire l'apoptose des chondrocytes (54) qui est alors pourvoyeuse de corps apoptotiques qui peuvent être le site de formation de nouveaux cristaux.

Enfin, il existait également un enrichissement en protéines associées à l'inflammation. Dans le tendinopathie calcifiante, la phase finale de la pathologie est intensément inflammatoire, les cristaux étant capable d'induire une inflammation bursale lors de la rupture de la calcification. Cependant, dans les études histologiques, dont la nôtre, aucune cellule inflammatoire n'est observée autour des dépôts. Cependant, il est possible que certaines cytokines pro-inflammatoires puissent avoir un rôle dans la minéralisation. En effet, il a été montré que les cellules souches mésenchymateuses étaient capables de produire des cristaux d'apatite lorsqu'elles étaient exposées à l'IL1 β sans pour autant qu'elles se différencient en ostéoblastes (55). Il existe également un rôle établi du TNF α et de l'IL1 β dans l'apparition des calcifications vasculaires via une stimulation de l'expression de TNAP par les cellules musculaires lisses des vaisseaux (55). Il n'y a pas de données disponibles dans la littérature sur l'effet de la stimulation IL-1 ou TNF sur la minéralisation des ténocytes. Il a cependant été montré que la stimulation par l'IL1 β des cellules souches tendineuses altérait leur capacité de différenciation en ténocytes réduisant le niveau d'expression de Scleraxis, ténomoduline, collagène de type I et collagène de type III (56).

Au total, nous pouvons synthétiser les résultats de cette partie et les éléments qui restent à clarifier selon le schéma suivant (Figure 9).

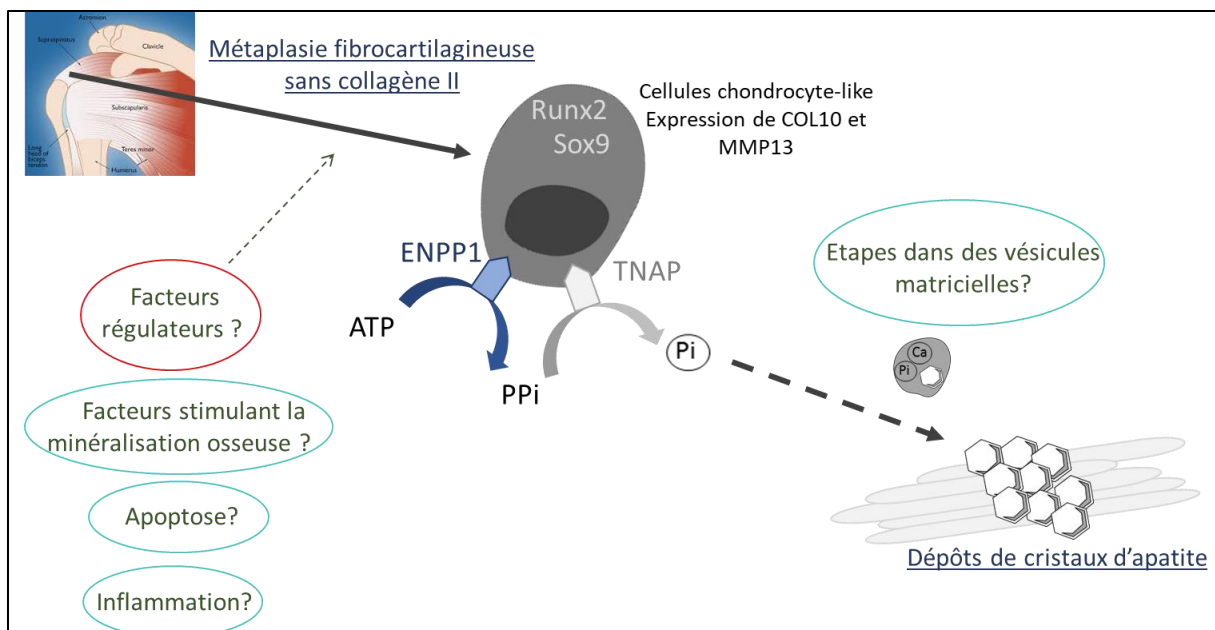


Figure 9. Schéma de synthèse des données obtenues dans la première partie en histologie, immunohistologie, in vitro et par spectrométrie de masse. ATP : adénosine triphosphate, PPI : pyrophosphate inorganique, Pi : phosphate inorganique.

La partie suivante concernera la recherche de facteurs régulateurs pouvant être impliqués dans la constitution des dépôts. Pour cela, nous avons sélectionné dans l'analyse protéomique et la bibliographie des candidats à étudier et faisant partie des facteurs impliqués dans la minéralisation osseuse pour savoir quels rôles ils pouvaient avoir dans cette minéralisation pathologique.

Partie II

Résultats/Partie II

A. Introduction complémentaire

Comme indiqué dans l'introduction, peu de choses ont été décrites concernant les protéines associées aux calcifications. Pourtant, il y a probablement parmi ces protéines des éléments essentiels pour expliquer l'apparition, la croissance ou le maintien de la calcification. Parmi elles, on peut identifier des protéines appartenant à différents processus biologiques comme le suggère l'analyse en protéomique précédemment décrite.

Parmi ces protéines, nous avons identifié des éléments favorisant la minéralisation comme le Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF ou Serpine F1) par exemple. En effet, le PEDF est impliqué dans la minéralisation de la matrice osseuse puisque la mutation de son gène est responsable de l'ostéogénèse imparfaite de type VI. Il a également été montré qu'il pouvait augmenter la minéralisation des cellules souches mésenchymateuses humaines in vitro (57).

Par opposition, on note également la présence de facteurs connus comme étant des inhibiteurs de la minéralisation comme l'activine A ou l'ostéoprotégérine. Les activines sont des membres de la super-famille du TGF β . L'activine A, composé de deux sous-unités inhibine β A, est capable d'inhiber la minéralisation des ostéoblastes humains in vitro (58). En outre, l'ostéoprotégérine (OPG) qui a un rôle déterminant dans le remodelage osseux par sa balance avec RANK-Ligand a montré qu'elle était un facteur protecteur de l'apparition des calcifications vasculaires (59).

De plus, des éléments de la matrice extra-cellulaire pouvant favoriser la fixation du calcium sur les fibres tendineuses ont été identifiés comme par exemple l'ostéonectine (SPARC), ou la périostine (POSTN) (60).

Enfin, d'autres éléments non présents dans l'analyse protéomique nous ont paru intéressants à étudier tels que l'ostéopontine puisqu'elle a été décrite par d'autres équipes dans la tendinopathie calcifiante (20,33). La Bone Morphogenic protein-2 (BMP-2), elle, a

montré dans une étude qu'elle était capable d'induire une différenciation ostéoblastique des cellules souches dérivées du tendon (46).

L'objectif de cette deuxième partie était, dans un premier temps, de quantifier par technique ELISA plusieurs protéines issues des résultats de protéomique (PEDF, OPG, Activine A, POSTN) ou issues de la littérature (BMP-2 et ostéopontine). Une fois ces protéines dosées, nous avons regardé si leurs quantités étaient associées à certaines caractéristiques cliniques. Pour terminer, nous avons étudié de manière plus approfondie le PEDF qui est présent en grande quantité dans les calcifications et qui est décrit comme un facteur pro-minéralisant.

B. Matériels et Méthodes

1. Extraction et dosage des protéines présentes dans les calcifications

Soixante-six calcifications de patients ont été étudiées. Ces patients faisaient partie de l'étude CALCECHO publiée en 2019 dans *Annals of Rheumatic diseases* ajoutée en annexe (Annexe 3). Dans cet essai clinique, tous les patients ont bénéficié d'un lavage percutané de leur calcification sous échographie et ont donné leur consentement pour la conservation et l'étude du matériel calcique retiré. Ils ont été randomisés en deux groupes qui se différenciaient par le traitement reçu à la fin du geste (infiltration de méthylprednisolone ou de placebo (sérum physiologique)).

L'extraction des protéines a été effectuée de la même manière que décrite dans l'article de la partie I dans une solution contenant les éléments rapportés dans le Tableau 3 sous agitation à 4°C pendant 2 heures.

	Composants	Concentration
RIPA buffer	Chlorure de sodium	150 mM
	Tris pH 7,4	1%
	Nonidet P-40	1%
	Sodium déoxycholate	0,25%
	Sodium fluoride	1 mM
Inhibiteurs de protéases et phosphatases	Leucopeptine	0,4 µg/ml
	Aprotinine	0,4 µg/ml
	Phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF)	5 µM
	Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	0,5 mM

Tableau 3. Protocole d'extraction des protéines associées aux cristaux d'apatite au sein des calcifications de patients.

Après cette étape, les protéines totales ont été dosées par méthode BCA (Bicinchoninic Acid Assay). Les échantillons ont été dilués au 1/5 et au 1/10 dans du RIPA buffer avant d'ajouter 200µl d'acide bicinchoninique au 1/50. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la densité optique était lue à 570nm et les résultats étaient rapportés à une gamme de BSA (Bovine Serum Albumine).

Concernant les principales caractéristiques de ces patients, elles sont reprises dans le Tableau 4.

Caractéristiques des patients (N=66)	
Age, moyenne +/- écart-type	48,9 ans +/- 9,7
Sexe féminin, N (%)	45 (68%)
Atteinte du côté dominant	39 (59%)
Profession impliquant des mouvements répétitifs	31 (47%)
Durée des douleurs, moyenne	30 mois
Douleur au repos, moyenne +/- écart-type (EVA/100)	28,5 +/- 24,5
Douleur lors des activités, moyenne +/- écart-type (EVA/100)	68 +/- 14
Score fonctionnel DASH/100, moyenne +/- écart-type	45 +/- 14
Taille de la calcification, moyenne +/- écart-type	18,2 mm +/- 5,9
Type de calcification à la radiographie, N (%)	N=64
Type A	26 (40%)
Type B	38 (60%)
Type de calcification à l'échographie, N (%)	N=65
Nodulaire	4 (6%)
Homogène	35 (54%)
Fragmentée	26 (40%)
Présence d'une bursite à l'échographie, N (%)	18 (27%)

Tableau 4. Principales caractéristiques des patients dont les calcifications ont été étudiées. EVA: Echelle visuelle Analogique; questionnaire DASH: Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand. Les aspects radiographiques et échographiques sont illustrés dans les Figures 10 et 11.



Figure 10. Classification radiographique des calcifications selon la société française d'arthroscopie : type A= dense, homogène à contours nets et type B : dense, cloisonnée à contours nets.

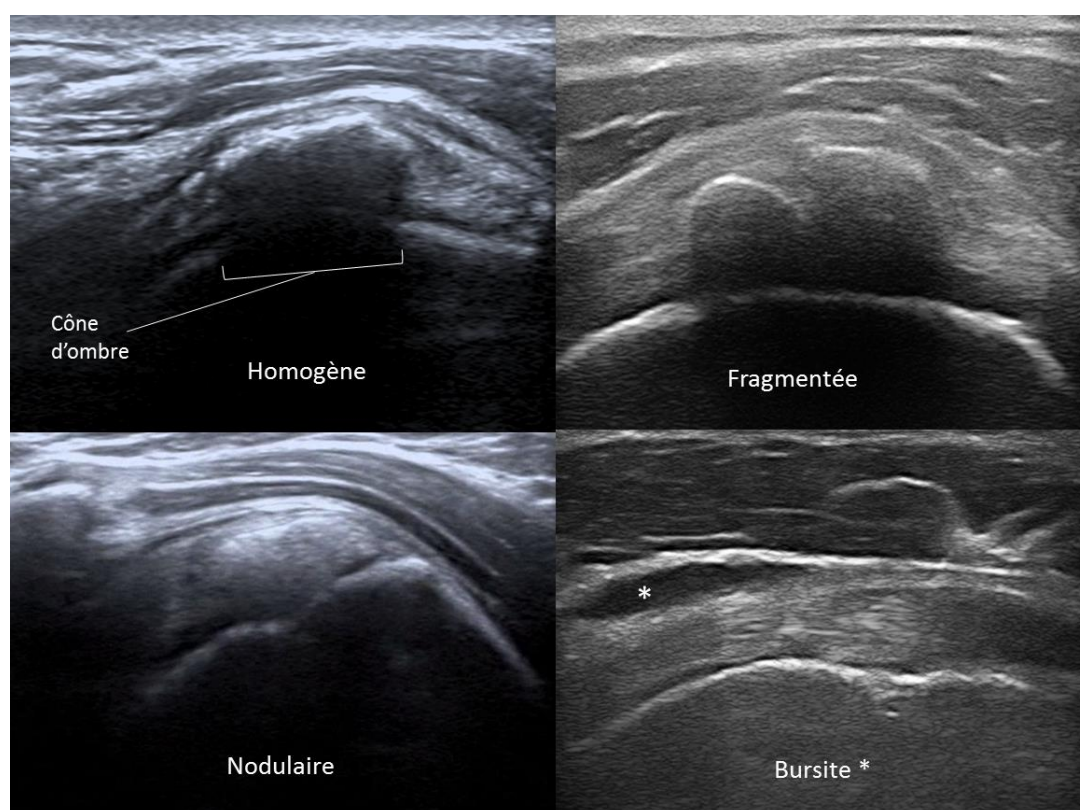


Figure 11. Aspects des calcifications en échographie.

2. Dosage des protéines d'intérêt par ELISA

Les échantillons ont été dilués au 1/10 pour le dosage de l'OPG, de la périostine, de l'activine A et de l'ostéopontine et au 1/250 pour le PEDF pour le dosage ELISA (R&D systems). La quantité obtenue a été rapportée à la quantité totale de protéines extraites et exprimée en pg par μ g de protéines totales.

Des corrélations ont été recherchées entre les valeurs des dosages et l'intensité des douleurs et la taille de la calcification par un test de Pearson. Les valeurs des dosages ont été comparées en fonction de l'aspect radiographique, de l'aspect échographique, de la durée de la calcification, de la présence d'une bursite associée et de la réponse au traitement par un test de Mann-Whitney. Une corrélation entre l'EVA et le DASH à M3 et les dosages protéiques a également été recherchée dans les deux groupes de patients (Test de Pearson). Un p inférieur à 0,05 a été considéré significatif.

Pour évaluer la réponse au traitement par ponction-fragmentation-lavage (PFL), les dossiers ont été repris et les patients ont été considérés en échec de la PFL lorsqu'ils gardaient à 12 mois des douleurs intenses, ou lorsqu'une deuxième PFL ou une chirurgie de l'épaule avaient été nécessaires.

3. Etude du PEDF en immunohistochimie dans les tendons calcifiés

Les tendons calcifiés étudiés antérieurement ont été marqués en IHC avec un anticorps anti-PEDF humain (Hôte : lapin ; Abcam 180711). Les étapes de marquage étaient les suivantes :

- Démasquage antigénique : EDTA à 60° pendant 20 heures
- Inhibition des peroxydases endogènes par H_2O_2 pendant 25 minutes
- Blocage des sites aspécifiques par Goat serum 2%, BSA 1%
- Incubation de l'anticorps anti-PEDF (dilution de 1/10000) pendant 2 heures à température ambiante
- Incubation de l'anticorps secondaire Goat anti-rabbit (Dako, E0432) au 1/400 pendant 1 heure à température ambiante

- Incubation de la streptavidine-HRP (Dabo, P0397) au 1/800 pendant 1 heure à température ambiante.
- Révélation par de la DAB (ThermoScientific, TA-125-QHDX).
- Contre-coloration à l'hématoxyline

4. Etude de l'effet du PEDF sur la minéralisation in vitro

Pour ces expérimentations, le modèle de minéralisation 2D décrit dans l'article a été utilisé avec le milieu associant dexaméthasone, β -glycérophosphate et acide ascorbique 2P pendant 21 jours. Du PEDF recombinant humain (R&D, réf 1177-SF) a été ajouté dès le premier jour de culture à des concentrations croissantes allant de 250 à 1000 ng/ml. La minéralisation a ensuite été quantifiée par coloration au rouge alizarine. L'expression de PEDF au niveau ARN et au niveau protéique par les ténocytes en culture a également été étudiée pour rechercher une induction de son expression par le milieu ostéogénique. L'expression au niveau génique a été évaluée par RT-qPCR (Forward : TGTGCAGGCTTAGAGGGACT ; reverse : GGCTCCAATGCAGAGGAGTAG) comme décrit précédemment et le PEDF a été dosé par ELISA (Human Serpin F1/PEDF DuoSet ELISA, R&D) dans les surnageants de culture à différents temps (J9, J16 et J21).

C. Résultats

1. Quantification des différentes protéines et recherche de corrélation avec les éléments cliniques

L'extraction protéique a permis d'obtenir des concentrations totales entre 31 µg/ml et 730 µg/ml (en moyenne, 266 µg/ml). Les concentrations des 6 protéines ont été les suivantes (moyenne [écart-type]): PEDF = 245 ng/ml [387] ; OPG = 29ng/ml [29] ; POSTN = 899 pg/ml [240] ; Activine A = 4 332 pg/ml [9 998] et OPN 4509 pg/ml [15 640]. Nous les avons rapportées à la concentration protéique totale et exprimées en pg/µg de protéines totales (Tableau 5). Le PEDF était la protéine la plus retrouvée parmi celles étudiées et représentait en moyenne 0,1% des protéines totales extraites des calcifications. La BMP2 n'a pas été retrouvée malgré plusieurs dilutions sur 5 échantillons différents. Il est possible que sa concentration soit inférieure au seuil de détection de l'ELISA (46,9 pg/mL). Ainsi, elle ne sera pas étudiée par la suite. Il est intéressant de noter la présence d'ostéopontine alors que celle-ci n'avait pas été détectée dans l'analyse protéomique.

PEDF (pg/µg protéines totales)	OPG (pg/µg protéines totales)	POSTN (pg/µg protéines totales)	ACTIVINE A (pg/µg protéines totales)	OPN (pg/µg protéines totales)	BMP-2 (pg/µg protéines totales)
1097,4 +/- 1100	135 +/- 115	6,9 +/- 12	19,6 +/- 45,2	49,6 +/- 223,1	ND

Tableau 5. Moyenne des concentrations des protéines d'intérêt rapportée à la quantité totales de protéines présentes dans les échantillons. N=66 pour toutes les protéines sauf BMP-2 (N=5). ND: non détectée.

Concernant la présentation clinique, il n'y avait pas de corrélation retrouvée entre l'intensité des douleurs et le taux des différentes protéines (résultats non présentés).

Concernant les caractéristiques à l'imagerie, le type A ou B en radiographie n'était pas associé à des concentrations différentes des 5 protéines étudiées (Figure 12) et il n'y avait pas non plus de corrélation avec la taille de la calcification (résultats non présentés).

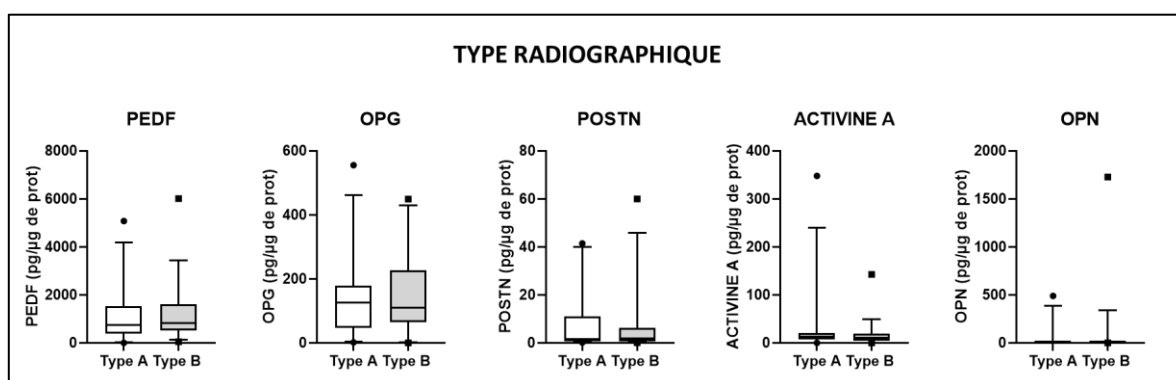


Figure 12. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction du type de calcification en radiographie (type A et type B illustrés en figure 10). Protéines exprimées en pourcentage des protéines totales.

Par contre, on retrouvait des différences lors de l'analyse des différents aspects en échographie. En effet, les calcifications d'aspect nodulaire donc moins denses étaient significativement plus enrichies en POSTN que les calcifications fragmentées ($p=0,03$) ou homogènes ($p=0,003$) et plus enrichies également en OPN que les calcifications fragmentées ($p=0,04$) ou homogènes ($p=0,01$) (Figure 13).

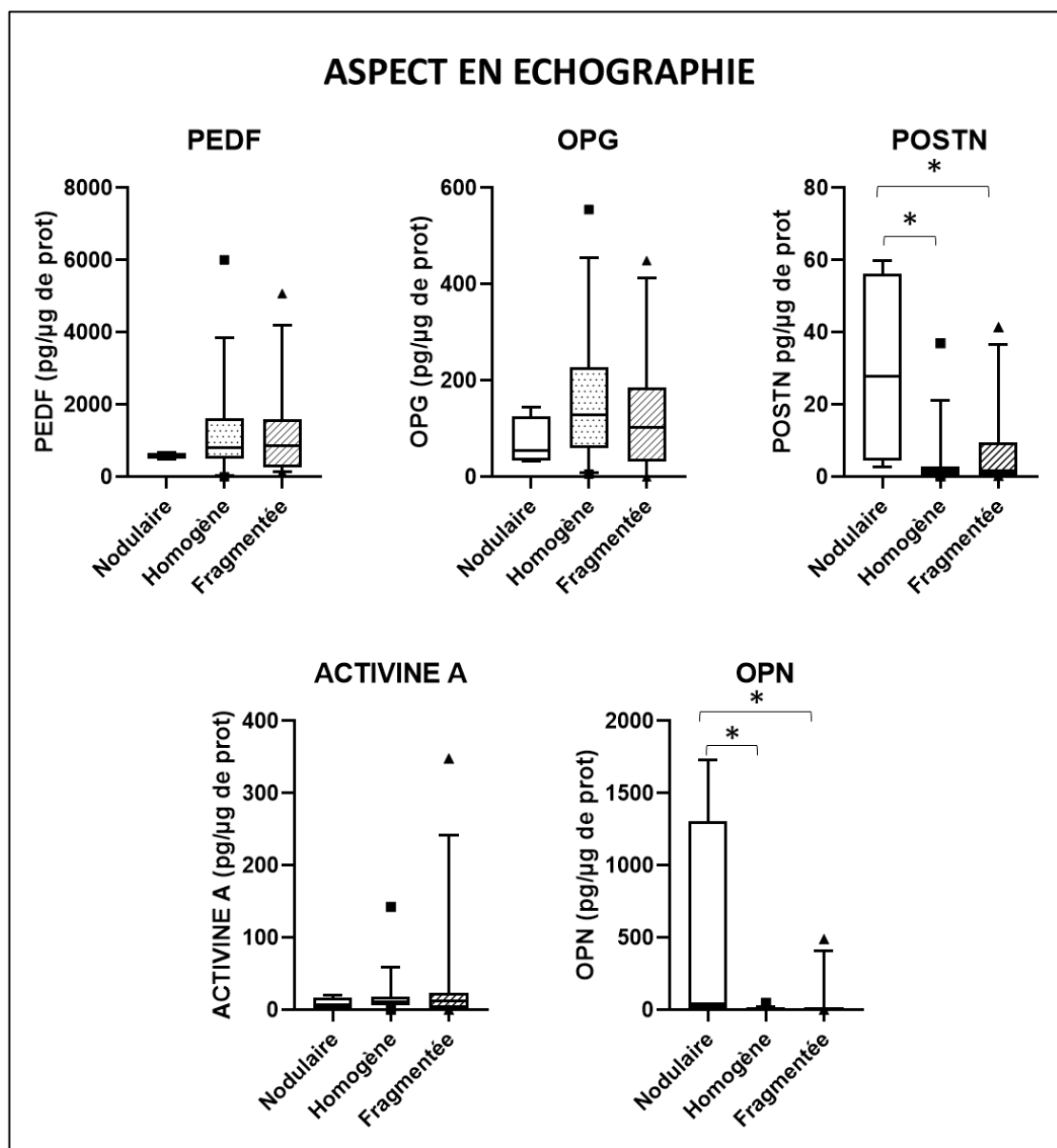


Figure 13. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction du type de calcification en échographie (aspects illustrés en figure 11). Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. $*=p<0,05$

On retrouve la même notion avec les calcifications sans cône d'ombre qui sont plus riches en POSTN ($p=0,04$) et en OPN bien que l'on n'atteigne pas la significativité pour cette dernière ($p=0,09$). On retrouve également les mêmes tendances si on prend en compte la durée de la calcification même si la significativité n'est pas obtenue (Figure 14).

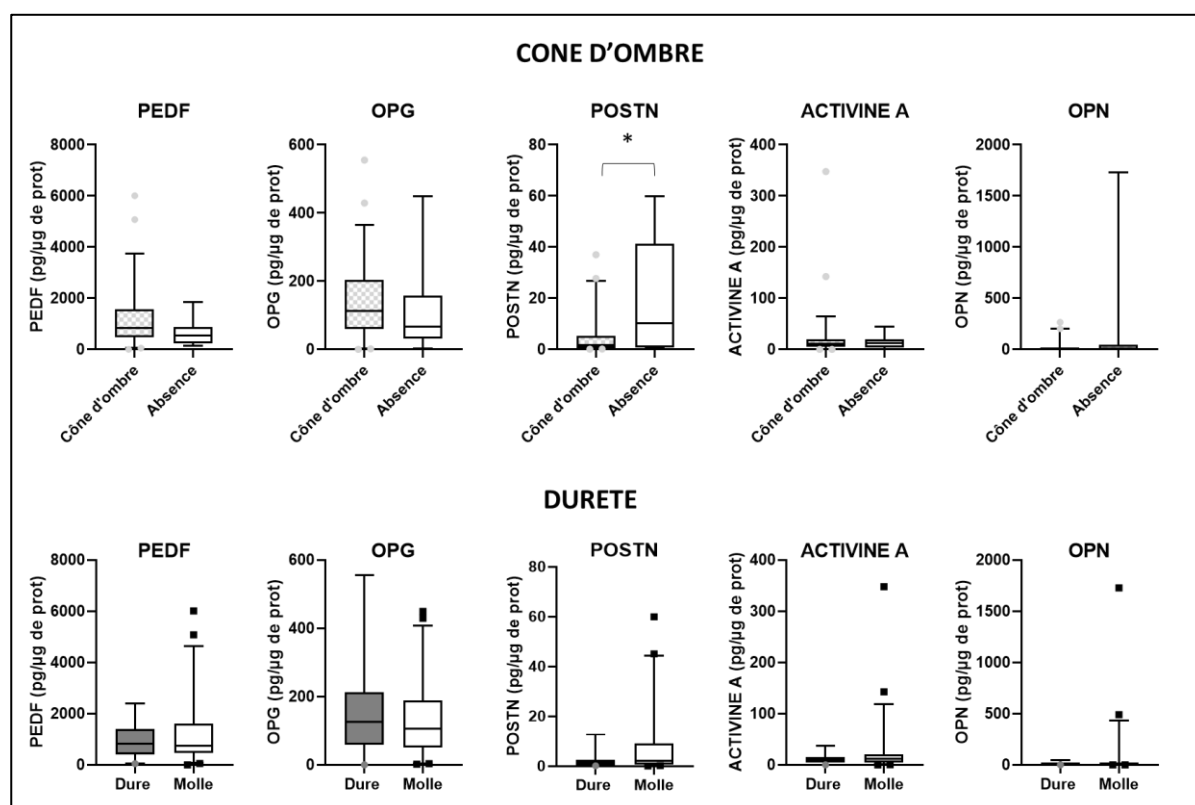


Figure 14. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction de la présence ou non d'un cône d'ombre en échographie et de la consistance de la calcification perçue par l'opérateur lors du geste de ponction-fragmentation-lavage. Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. $*=p<0,05$

Concernant la bursite, les taux d'OPG ($p=0,02$) et d'activine A ($p=0,04$) étaient plus faibles lorsqu'une bursite était présente à la surface de la calcification (Figure 15).

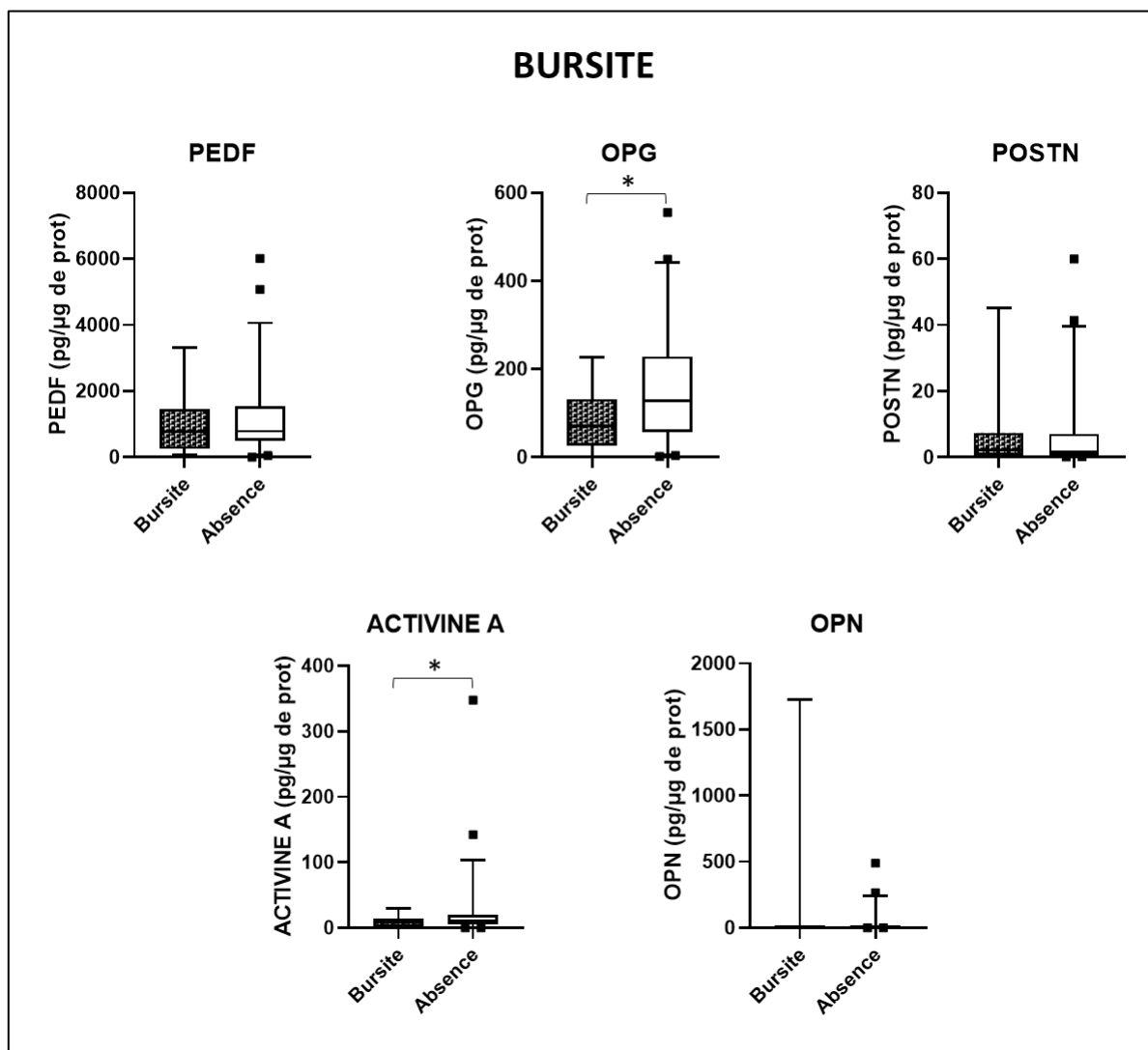


Figure 15. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction de la présence ou non d'une bursite en échographie. Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. $*=p<0,05$

Par rapport à la réponse au traitement, les calcifications ayant bien répondu à la PFL sous échographie étaient significativement plus enrichies en POSTN ($p=0,02$) (Figure 16). La réponse clinique a été évaluée à M12 car ceci permettait d'évaluer l'ensemble des patients sans tenir compte du traitement reçu à la fin du geste (corticoïdes ou placebo). En effet, 6 et 12 mois après la PFL, le niveau de douleur et de gêne fonctionnelle étaient similaires dans les 2 groupes (cf Annexe 3). A M3, il existait une corrélation négative entre le taux de POSTN ($r=-0,38$, $p=0,04$) et le DASH uniquement dans le groupe corticoïdes ; c'est-à-dire qu'un score fonctionnel plus bas (donc un meilleur résultat clinique) était associé à un taux plus élevé de POSTN.

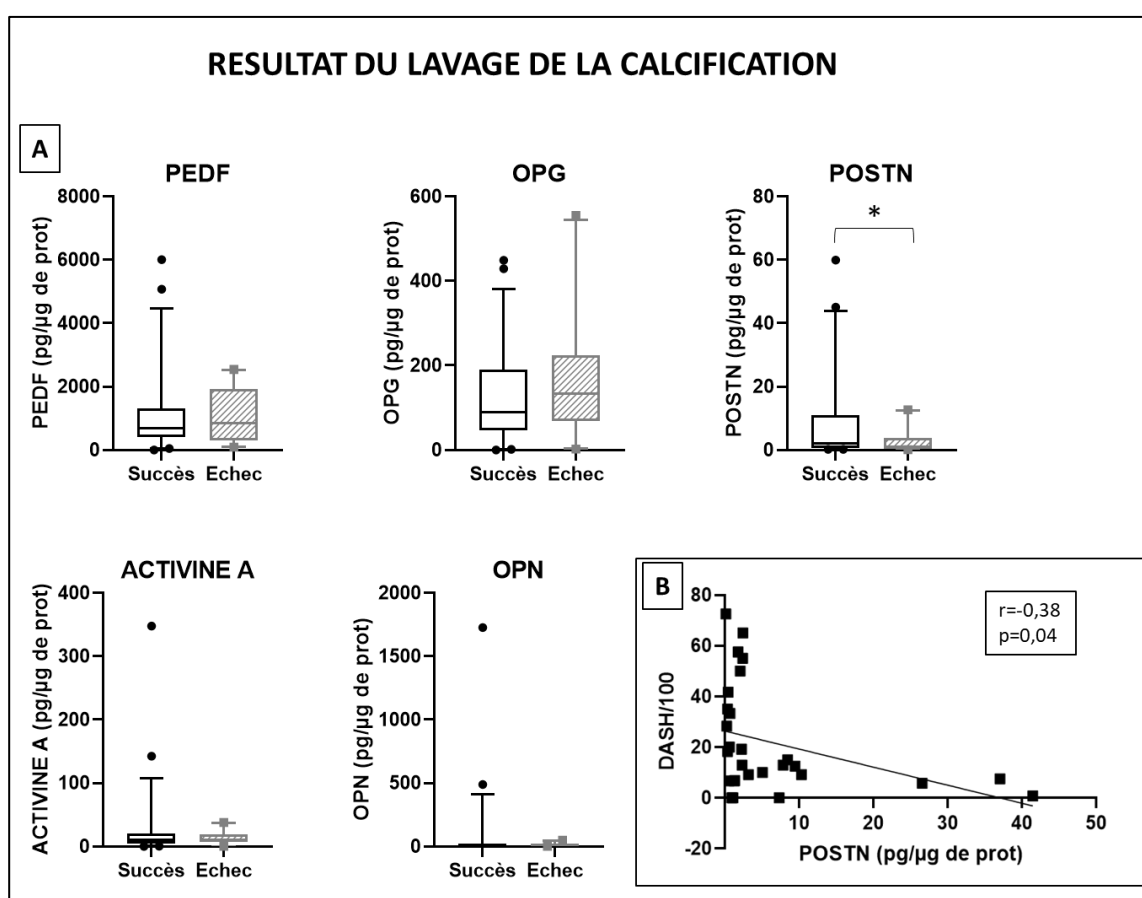


Figure 16. A. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction du résultat du lavage et de l'évolution clinique. L'échec au traitement était défini par la persistance de douleurs intenses ou la nécessité d'un deuxième geste sur la calcification que ce soit un deuxième lavage ou une chirurgie. **B.** Corrélation entre le DASH à M3 et le taux de périostine dans le groupe corticoïdes. Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. $*=p<0,05$.

2. Expression de PEDF au sein des tendons calcifiés

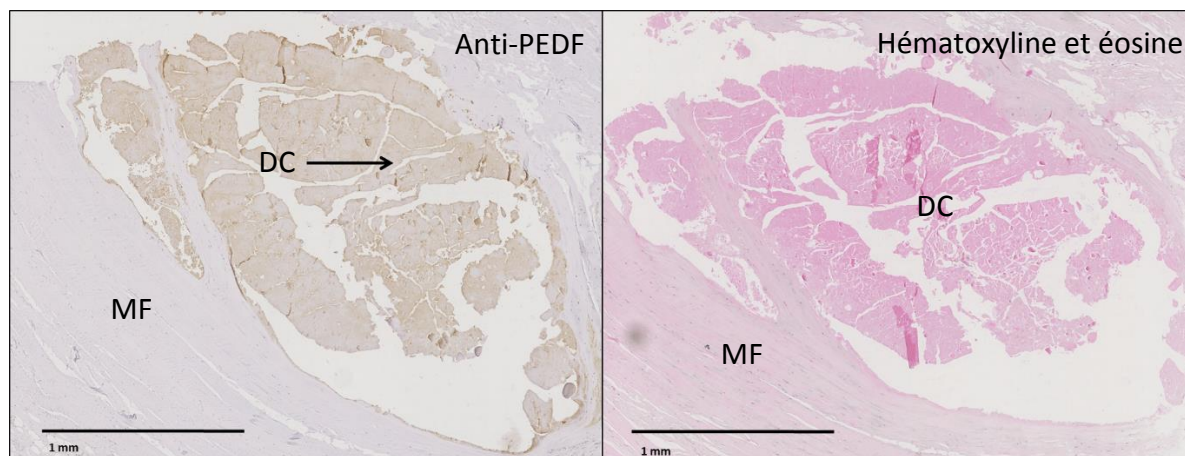


Figure 17. Marquage par anticorps anti-PEDF à gauche d'un tendon calcifié (image représentative). Flèche : dépôt calcique (DC). Après révélation, les structures marquées sont de couleur marron. MF : métaplasie fibrocartilagineuse.

L'analyse en immunohistochimie a retrouvé une fixation de l'anticorps anti-PEDF au sein de la calcification (Figure 17) et également au niveau des cellules de type chondrocytaire alors qu'il n'y avait pas de marquage PEDF au niveau des ténocytes présents entre les fibres tendineuses (Figure 18).

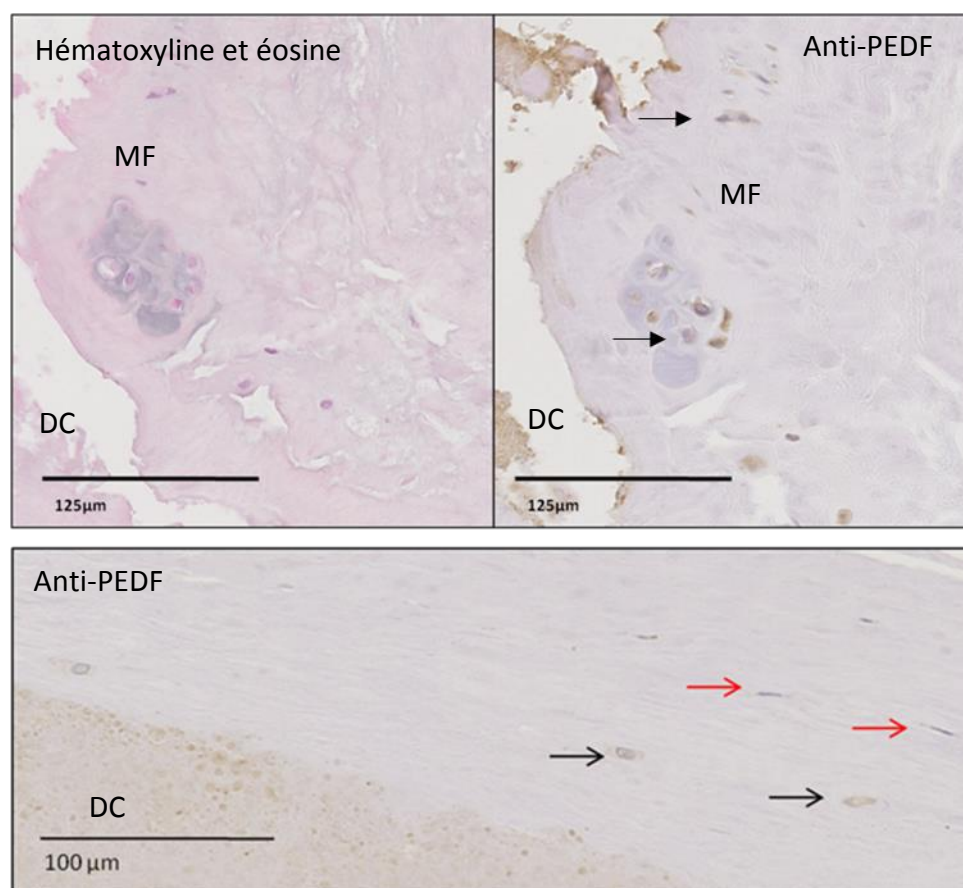


Figure 18. Marquage par anticorps anti-PEDF d'un tendon calcifié (images représentatives centrées sur la zone de type fibrocartilagineuse autour des dépôts). Après révélation, les structures marquées sont de couleur marron. Flèches noires: cellules de type chondrocytaire ; flèches rouges : ténocytes. DC : dépôts calciques, MF : métaplasie fibrocartilagineuse.

3. Effet du PEDF sur la minéralisation in vitro

L'ajout de PEDF humain recombinant à nos conditions de minéralisation *in vitro* n'a pas eu d'effet sur la minéralisation obtenue qui est restée équivalente à celle observée en milieu ostéogénique seul. La manipulation a été réalisée avec 3 patients différents (Figure 19).

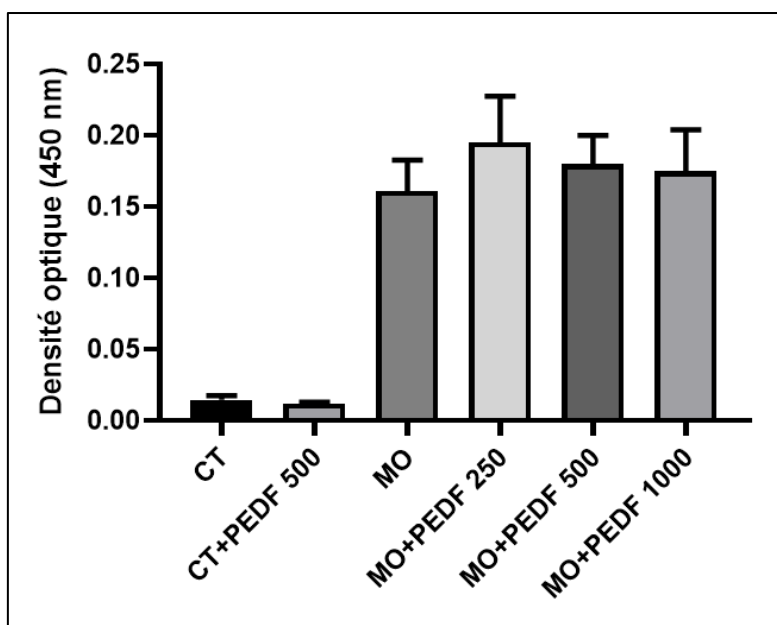


Figure 19. Evaluation de la minéralisation des ténocytes humains induite en milieu contrôlé (CT) et ostéogénique (MO) en présence de PEDF à des concentrations croissantes. PEDF en ng/ml. Quantification du dépôt après solubilisation du rouge alizarine à l'acide formique et lecture de la densité optique à 450 nm.

4. Expression et sécrétion du PEDF par les ténocytes en culture

Nous avons constaté que la quantité de PEDF sécrétée dans le milieu de culture était croissante au cours des 21 jours, et significativement plus importante dans le milieu ostéogénique avec des concentrations allant jusqu'à 200 ng/ml. Il n'y avait pas de différence entre les deux milieux à J9 (Figure 20 A). Par contre, en qPCR, nous n'avons pas constaté de régulation du PEDF au niveau de l'expression génique (Figure 20 B). Il est possible que l'augmentation du PEDF sécrété soit uniquement en rapport avec la prolifération des cellules qui était plus importante dans le milieu ostéogénique ou qu'un mécanisme post-transcriptionnel soit impliqué.

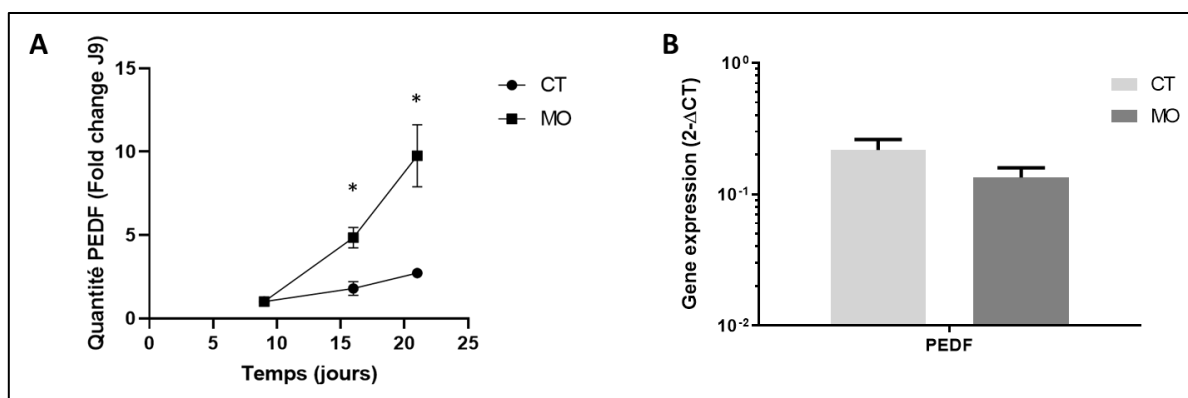


Figure 19. A : Quantification par ELISA du PEDF dans les surnageants de culture au cours des 21 jours. Expression en Fold Change par rapport à J9 de culture. **B :** Expression du PEDF au niveau génique quantifié par qPCR à J21. CT = milieu contrôle ; MO = milieu ostéogénique. N=3. *= $p < 0,05$.

D. Discussion

L'analyse des protéines en ELISA nous a permis de quantifier les protéines dans nos échantillons. La BMP-2 n'a pas été détectée alors que l'ostéopontine était présente bien que non identifiée dans le screening par spectrométrie de masse.

Concernant la présence d'associations entre dosages protéiques et caractéristiques cliniques des patients, cette étude exploratoire a mis en évidence quelques éléments qui nécessitent d'être explorés de manière plus approfondie. Le premier élément est la mise en évidence d'un enrichissement en périostine et ostéopontine des calcifications les moins denses et l'observation qu'un enrichissement en POSTN semblait associé à une meilleure réponse clinique. La périostine, d'abord découverte dans l'os, est également présente dans les tissus riches en collagène et soumis en permanence aux contraintes mécaniques : ligament parodontal, valves cardiaques et tendons (52). Au cours du développement osseux, la périostine est exprimée dans les cellules souches mésenchymateuses et les cellules exprimant la phosphatase alcaline. Puis, son expression décroît à l'âge adulte mais elle est réexprimée après les lésions myocardiques, musculaire ou les fractures. Il est intéressant de noter que les souris déficientes en périostine ont une corticale osseuse amincie (avec un mauvais assemblage des fibres de collagène) mais également, des dépôts minéraux ectopiques (53), suggérant donc un rôle inhibiteur de cette protéine sur la minéralisation extra-osseuse. Il sera intéressant par la suite de la tester sur nos cultures de ténocytes pour voir s'il existe un rôle inhibiteur dans ce contexte.

Concernant l'ostéopontine, c'est une glycoprotéine fortement exprimée dans les tissus minéralisés. Dans l'os, elle est parmi les protéines non collagéniques les plus abondantes. Elle possède des sites de fixation du calcium et interagit avec les cristaux d'apatite avec une haute affinité (61). Dans le métabolisme osseux, l'ostéopontine a un rôle de régulation des ostéoclastes et un rôle d'inhibition de la formation et de la croissance des cristaux d'apatite *in vitro* (61). Cependant, il a été montré que selon son degré de phosphorylation, elle pouvait au contraire augmenter la nucléation de l'apatite *in vitro* (62). Dans les cas des calcifications pathologiques, l'ostéopontine aurait également un rôle notamment au niveau des calcifications artérielles avec un marquage au sein des dépôts et à

leur périphérie (63), ou encore au niveau des calcifications rénales ou des valves cardiaques. Dans les calcifications tendineuses, elle a été identifiée par deux équipes (20,33). Dans le premier article (20), les auteurs suggèrent que l'ostéopontine pourrait avoir un rôle dans le déclenchement de la résorption en recrutant des cellules multinucléées ressemblant à des ostéoclastes. Cette hypothèse est également étayée par l'étude de Takeuchi et *al.* qui a montré la présence d'ostéopontine dans des cellules multinucléées présentes autour des dépôts, ces cellules étant également TRAP positives (33). Nous pourrions donc étudier si elle peut avoir un rôle direct de régulation de la minéralisation des ténocytes, l'effet sur les cellules potentiellement résorptrices étant plus difficile à explorer.

Concernant la bursite, nous avons retrouvé cette fois-ci une association avec une présence moins importante d'activine A et d'ostéoprotégérine. L'Activine A fait partie de la voie des activines/inhibines. Les activines font partie de la super-famille du TGF β associant diverses sous-unités. Les activines ont des fonctions biologiques diverses et sont impliquées dans la différenciation neuronale, le remodelage osseux, l'hématopoïèse et la reproduction. Les activines et inhibines sont composées de sous-unités inhibine α , β A et β B. L'homodimérisation des sous unités β A résulte en la formation d'activine A (58). In vitro, il a été montré que l'activine A était capable d'inhiber fortement la minéralisation des ostéoblastes humains (58). Elle était également capable d'inhiber la minéralisation des cellules musculaires lisses vasculaires. Cette inhibition de la minéralisation était restaurée par l'adjonction de follistatine, inhibiteur de l'Activine A. L'activine A n'avait pas d'impact sur l'expression des marqueurs ostéoblastiques au sein des MSC (Runx2, OPN, COL1 et ostéocalcine) mais réduisait l'expression de TNAP et modifiait la matrice extra-cellulaire expliquant la réduction de la minéralisation (64). Cet effet inhibiteur de la minéralisation est également étayé par la présence d'une masse osseuse augmentée chez la souris et le singe en cas de blocage de l'Activine A (64). Concernant le rôle de l'activine A dans la régulation de l'inflammation, des effets pro- ou au contraire anti-inflammatoires ont été rapportés (65). L'hypothèse retenue est que, selon le stade de l'inflammation, son rôle est différent avec un rôle promoteur lors de l'initiation de l'inflammation et un rôle inhibiteur une fois l'inflammation établie. Dans le cadre de la tendinopathie calcifiante, il n'y a aucune donnée

la concernant mais on voit que les pistes, à la fois d'action sur la minéralisation et de régulation de l'inflammation, seront intéressantes à explorer.

L'OPG appartient au système OPG/RANK/RANK-L qui détermine le remodelage et la masse osseuse. L'OPG est un inhibiteur de la résorption osseuse via son action régulatrice sur les ostéoclastes en prévenant l'interaction RANK/RANK-L qui est responsable de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes (66). Les souris déficientes en OPG présente une ostéoporose et il est intéressant de noter qu'elles présentent également des calcifications vasculaires, suggérant un rôle inhibiteur de la minéralisation ectopique et donc protecteur de l'apparition de calcifications vasculaires (67). Ce rôle inhibiteur pourrait être en partie expliqué par sa capacité d'inhiber l'activité de la phosphatase alcaline (68). Cependant, les données chez l'homme retrouvent au contraire une association entre taux d'OPG élevés et apparition de calcifications vasculaires et mortalité par événements cardio-vasculaires. L'hypothèse possible est que le taux soit augmenté par mécanisme d'auto-défense contre le processus de calcification vasculaire (66). Il n'y a pas de donnée sur le rôle de l'OPG dans les calcifications d'autres natures.

Enfin, concernant le PEDF, bien qu'il n'y ait pas d'association avec les différentes données cliniques, il était la protéine en quantité la plus abondante parmi celles que nous avons étudiées. De plus, il joue un rôle important dans la minéralisation osseuse en la favorisant. Sa présence dans le tendon avait été retrouvée dans une étude protéomique précédente (4). Par contre, il n'y a que très peu de données sur son rôle au sein du tendon (69). Son rôle essentiel dans la minéralisation osseuse est illustré par l'apparition d'une ostéopathie fragilisante en cas de mutation de son gène. Il s'agit d'une ostéogenèse imparfaite de type VI caractérisée par une anomalie de minéralisation alors que le matrice collagénique est normale (70,71). Au niveau du cartilage de croissance, son expression par les chondrocytes est d'autant plus forte que l'on s'approche de la zone d'ossification (72). *In vitro*, son rôle pro-minéralisant a été montré sur des cellules souches mésenchymateuses humaines (57) via une augmentation d'activité de la phosphatase alcaline. L'expression de phosphatase alcaline est au contraire réduite dans les cellules souches isolées des souris déficientes en PEDF (73). Il a également un rôle de facteur pro-minéralisant sur les myoblastes humains entraînant l'apparition de foyers de minéralisation ectopique lors de

son injection intra-musculaire chez la souris (74). Compte tenu de ces éléments, nous avons étudié sa présence au niveau des tendons calcifiés qui a bien été confirmée à la fois au niveau des dépôts calciques et au niveau des cellules de type chondrocytaire. Cependant, la stratégie d'adjonction de PEDF recombinant à nos cultures n'a pas eu d'effet significatif sur la minéralisation obtenue. Après l'avoir dosé dans nos surnageants de culture, nous avons constaté qu'il était déjà présent à des concentrations de l'ordre de 200 ng/ml. De ce fait, il est possible que le PEDF rajouté en surplus n'ait eu aucun effet compte tenu de sa présence déjà abondante dans le milieu. Pour explorer son rôle, la stratégie suivante sera de l'inhiber tout au long de la culture en milieu ostéogénique. Pour cela, des anticorps neutralisants pourront être utilisés (75,76) ou des techniques d'ARN interférence.

Conclusion et perspectives

Au total, cette étude nous a permis de confirmer l'hypothèse que les calcifications se forment après une étape de métaplasie de type chondrocytaire au sein du tendon avec une expression par les cellules d'enzymes impliquées dans la minéralisation (TNAP et ENPP1). *In vitro*, les ténocytes extraits de la coiffe était capable dans un milieu de différenciation ostéogénique de se différencier en cellules minéralisantes avec un phénotype de chondrocyte hypertrophique. Comme dans les autres phénomènes de minéralisation, nous avons observé que la phosphatase alcaline était indispensable à ce phénomène de minéralisation. Concernant les facteurs de régulation du phénomène, le screening par spectrométrie de masse des poudres calciques extraites des patients nous donnent des axes de recherche à approfondir. Dans un premier temps, nous avons porté notre intérêt sur les protéines appartenant aux mécanismes de minéralisation dans l'os. Parmi-elles-ci, certaines sont connues comme étant stimulatrices de la minéralisation comme le PEDF, et d'autres comme étant inhibitrices comme la périostine ou l'activine A. Concernant le PEDF, son utilisation dans notre modèle de minéralisation *in vitro* n'a pas montré d'effet pro-minéralisant mais nous allons maintenant utiliser une stratégie d'inhibition de son effet par anticorps bloquants. Pour les autres protéines étudiées, notre modèle de minéralisation 2D des ténocytes humains *in vitro* nous permettra de pouvoir rechercher leurs effets biologiques dans ce contexte puisque celui-ci a une bonne reproductibilité et a permis d'induire une minéralisation constante.

D'autres mécanismes que ceux impliqués dans la minéralisation osseuse seront également intéressants à explorer comme l'apoptose ou l'inflammation comme suggéré par l'analyse en protéomique puisqu'il existe un enrichissement significatif en protéines appartenant à ces axes. Dans ce cadre, nous pourrons tester l'effet de l'induction de l'apoptose des ténocytes sur la minéralisation ou l'effet d'une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires.

Un autre axe d'études ultérieures serait la mise en place d'un modèle animal de tendinopathie calcifiante ce qui manque à l'heure actuelle. Comme indiqué précédemment, les modèles disponibles concernent le tendon patellaire ou achilléen et engendrent des ossifications tendineuses, suggérant des mécanismes sous-jacents différents de ceux des

calcifications de l'épaule. Pour cela, l'étude des facteurs régulateurs pourrait nous apporter des pistes intéressantes.

Enfin, il reste à explorer les phénomènes inflammatoires induits par les cristaux au moment de la résorption. Pour cela, l'effet des cristaux d'apatite humains sur les monocytes-macrophages ainsi que sur les ténocytes seront intéressants à étudier. Pour le moment les données disponibles dans la littérature concernent l'effet des cristaux d'apatite de synthèse mais nous avons pu constater qu'ils étaient différents des cristaux humains de part leur composition protéique ainsi que leur taille. Nous avons effectué des manipulations préliminaires dans cette optique. Pour cela, des monocytes CD14⁺ et des macrophages M-CSF ont été stimulés pendant 24 heures par des cristaux de patients (Figure 21A et 21B). Nous avons observé que seuls les macrophages sécrétaient de l'IL-6 et du TNF α et uniquement après traitement au LPS (100ng/ml) avec une augmentation d'un facteur 2.

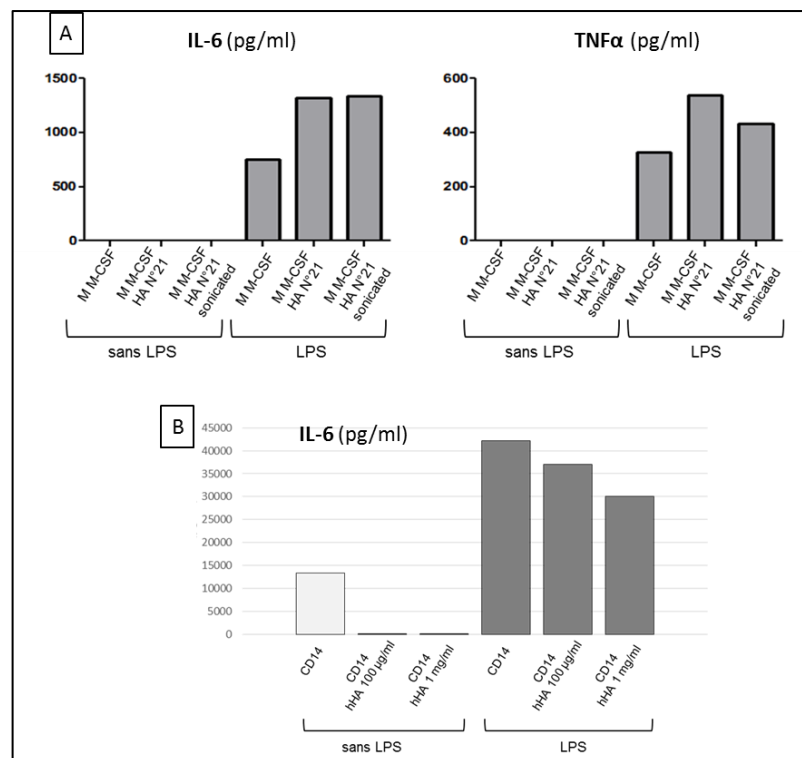


Figure 21. A. Effets *in vitro* des cristaux d'apatite humains sur la production d'IL-6 et de TNF α par des macrophages humains différenciés par le M-CSF. Dosage des cytokines par ELISA après 24 heures de stimulation par les cristaux (1 mg/ml) en présence ou non de LPS (100 ng/ml). **B.** Effets *in vitro* des cristaux d'apatite humains sur la production d'IL-6 par des monocytes humains CD14⁺ après 24 heures de stimulation (1 mg/ml) en présence ou non de LPS (100 ng/ml). M MCSF : macrophages différenciés en M-CSF.

Par ailleurs, pour l'étude des effets pro-inflammatoires des cristaux, un modèle de « air pouch » sera adéquat puisqu'il a été largement utilisé pour explorer les phénomènes inflammatoires induits par les cristaux d'acide urique dans la goutte. Ici aussi, une première expérimentation a été réalisée avec l'injection de cristaux d'apatite humains (2 mg/ml), de cristaux de synthèse (2 mg/ml) ou de PBS pour le groupe contrôle. Pour permettre une injection facile des cristaux en suspension, ils ont été soniqués. Après 6 heures ou 24 heures, les souris ont été euthanasiées et les exsudats de la poche ainsi que les membranes ont été recueillies (pour histologie et extraction d'ARN). Les résultats n'ont pas encore été analysés en dehors d'une première analyse en histologie à 24 heures. Nous avons observé que dans les groupes apatite, l'épaisseur de la membrane était épaissie mais n'avons pas encore étudiée les caractéristiques de l'infiltrat inflammatoire ni les cytokines sur-exprimées dans la membrane.

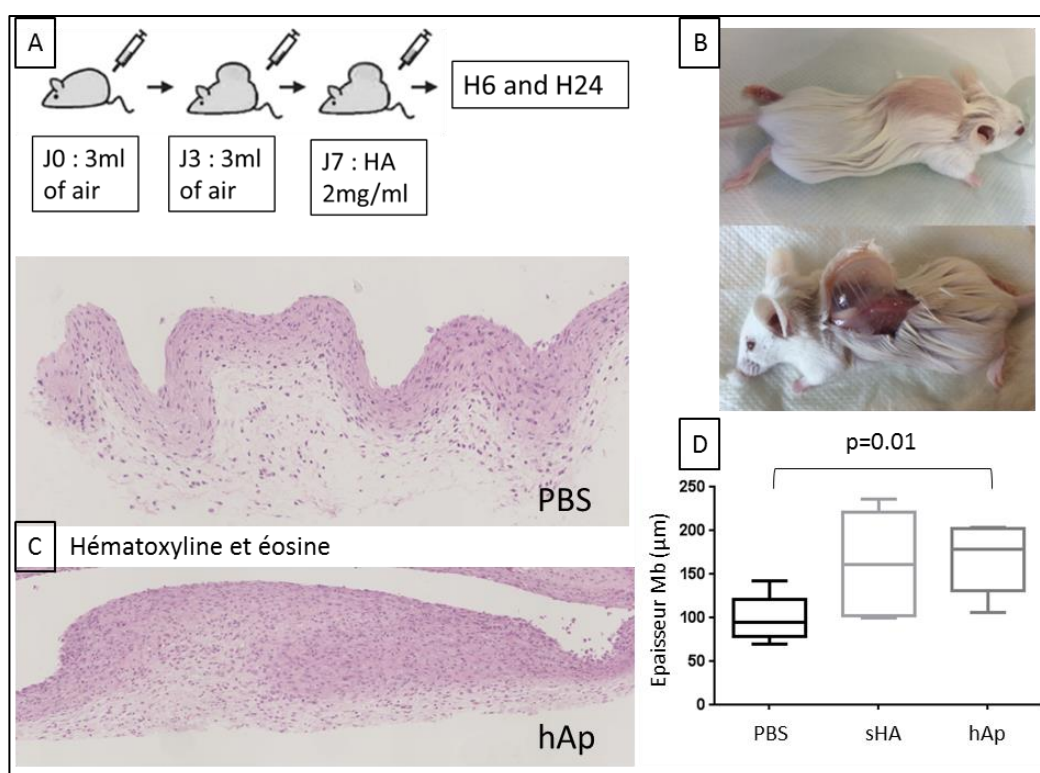


Figure 22. A. Schéma de l'expérimentation « air pouch » avec injection des cristaux d'hydroxyapatite (HA) à J7 après 2 injections d'air à J0 et J3 pour créer la poche. B. image de « air pouch » au moment de la dissection. C. Image en histologie des premières coupes montrant un épaississement de la membrane de la poche dans le groupe injectée avec des cristaux d'apatite humains (hAp) par rapport au groupe contrôle (PBS). D. Analyse de l'épaisseur des membranes 24 heures après l'injection. sHA : cristaux d'hydroxyapatite de synthèse, hAp : cristaux d'apatite humains.

En conclusion, cette thèse nous a permis d'avancer dans la compréhension de la tendinopathie calcifiante et ouvre de nouvelles pistes de recherche en ce qui concerne les mécanismes régulateurs de la pathologie.

Publications et communications

Publications

C Darrieutort-Laffite, P Arnolfo, T Garraud, A Adrait, Y Couté, G Louarn, V Trichet, P Layrolle, B Le Goff, F Blanchard. Rotator cuff tenocytes differentiate into hypertrophic chondrocyte-like cells to produce calcium deposits in an alkaline phosphatase-dependent manner. Under review Journal of Clinical Medicine.

Communications

Internationales

Congrès EULAR 2017 (European League Against Rheumatism), Madrid, 14-17 Juin: Histological characterization of rotator cuff calcific tendinopathy. C Darrieutort-Laffite, A Najm, T Garraud, P Layrolle, F Blanchard, B Le Goff. *Communication orale*.

2017 ACR/ARHP Annual Meeting, San Diego, CA, November 3-8: Rotator cuff calcific tendinopathy: chondrocyte-like cells surrounding calcific deposits express TNAP and ENPP1, two key enzymes of the mineralization process. C Darrieutort-Laffite, A Najm, T Garraud, P Layrolle, F Blanchard, B Le Goff. *Communication affichée*.

2018 ACR/ARHP Annual Meeting, Chicago, CA, October 19-24: Tenocytes extracted from rotator cuff tendons are able to induce mineral deposition in vitro and express genes related to a chondrocyte differentiation. C Darrieutort-Laffite, P Arnolfo, B Le Goff, F Blanchard. *Communication affichée*.

Nationales

Congrès 2017 de la Société Française de Rhumatologie, Décembre 2017 : Tendinopathies calcifiantes de la coiffe des rotateurs : les cellules chondrocytaires présentes autour des

dépôts sont-elles responsables de la minéralisation au sein du tendon ? C Darrieutort-Laffite, A Najm, T Garraud, P Layrolle, F Blanchard, B Le Goff. *Communication orale*.

19ème Congrès de la Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés, Lyon, 18-20 mai 2017 : Caractérisation histologique et étude de la composition minérale et protéique de calcifications de la coiffe des rotateurs. C Darrieutort-Laffite, A Najm, T Garraud, P Layrolle, Guy Louarn, Y Couté, F Blanchard, B Le Goff. *Communication affichée*.

Congrès 2018 de la Société Française de Rhumatologie, Décembre 2018 : Les ténocytes issus de tendons de la coiffe des rotateurs sont capables d'induire une minéralisation in vitro via une différenciation de type chondrocyte hypertrophique. C Darrieutort-Laffite, P Arnolfo, B Le Goff, F Blanchard. *Poster commenté*.

Financements

- Bourse de la Société Française de Rhumatologie pour financement d'un projet individuel « Etude du Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) dans les tendinopathies de la coiffe des rotateurs : expression et effet sur la minéralisation »: 20 000 €

Liste des figures

- Figure 1.** Anatomie de l'épaule et des muscles de la coiffe des rotateurs. On peut voir qu'il existe une continuité entre les tendons qui coiffent la tête humérale. La bourse sous-acromiale non représentée se situe entre les tendons (en-dessous) et le ligament acromio-coracoïdien et l'acromion (au-dessus) et permet le glissement des tendons lors des mouvements..... 7
- Figure 2.** Schéma de l'organisation des fibres tendineuses au sein des différentes unités constituant l'ensemble du corps tendineux. Schéma issu de la référence (2)..... 8
- Figure 3.** Voies de différenciation de l'ostéoblaste, du chondrocyte et du ténocyte à partir de la cellule souche mésenchymateuse et facteurs de transcription impliqués. SCX : Sclérox ; MKX : Mohawk Homeobox ; ALP : phosphatase alcaline ; COL1 : collagène de type I ; BSP : Bone SialoProtein ; OPN : ostéopontine ; COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein ; COL2 : collagène de type II, ACAN : aggrecane ; COL3 : Collagène de type III ; COL10 : Collagène de type X..... 10
- Figure 4.** Rôle de Mohawk Homeobox (Mkx) dans la différenciation et le maintien du phénotype ténocytaire..... 11
- Figure 5. A:** Représentation des dépôts calciques au sein des tendons de la coiffe. **B:** Radiographie de face d'un patient atteint d'une tendinopathie calcifiante de la coiffe. On voit une image dense et homogène de tonalité calcique située dans l'espace sous-acromial qui se projette en regard de l'insertion du supra-épineux..... 13
- Figure 6.** Résumé de la stratégie de prise en charge thérapeutique de la tendinopathie calcifiante de l'épaule..... 20
- Figure 7.** Synthèse des objectifs de la thèse à partir des différents échantillons humains disponibles. qPCR : quantitative polymerase chain reaction..... 22
- Figure 8. A:** Aspect d'une calcification de patient (image représentative) en microscopie électronique à balayage. **B:** Aspect en microscopie électronique de l'apatite de synthèse... 73

Figure 9. Schéma de synthèse des données obtenues dans la première partie en histologie, immunohistochimie, in vitro et en spectrométrie de masse. ATP : adénosine triphosphate, PPI : pyrophosphate inorganique, Pi : phosphate inorganique.....	79
Figure 10. Classification radiographique des calcifications selon la société française d'arthroscopie : type A= dense, homogène à contours nets et type B : dense, cloisonnée à contours nets.....	85
Figure 11. Aspects des calcifications en échographie.....	85
Figure 12. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction du type de calcification en radiographie (type A et type B illustrés en figure 10). Protéines exprimées pg/μg de protéines totales.....	89
Figure 13. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction du type de calcification en échographie (aspects illustrés en figure 11). Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. *=p<0,05.....	90
Figure 14. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction de la présence ou non d'un cône d'ombre en échographie et de la consistance de la calcification perçue par l'opérateur lors du geste de ponction-fragmentation-lavage. Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. *=p<0,05.....	91
Figure 15. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction de la présence ou non d'une bursite en échographie. Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. *=p<0,05..	92
Figure 16. Quantité des différentes protéines d'intérêt en fonction du résultat du lavage et de l'évolution clinique. L'échec au traitement était défini par la persistance de douleurs intenses ou la nécessité d'un deuxième geste sur la calcification que ce soit un deuxième lavage ou une chirurgie. B. Corrélation entre le DASH à M3 et le taux de périostine dans le groupe corticoïdes. Protéines exprimées pg/μg de protéines totales. *=p<0,05	93
Figure 17. Marquage par anticorps anti-PEDF à gauche d'un tendon calcifié (image représentative). Flèche : dépôt calcique (DC). Après révélation, les structures marquées sont de couleur marron. MF : métaplasie fibrocartilagineuse.....	94

- Figure 18.** Marquage par anticorps anti-PEDF d'un tendon calcifié (images représentatives centrées sur la zone de type fibrocartilagineuse autour des dépôts). Après révélation, les structures marquées sont de couleur marron. Flèches noires: cellules de type chondrocytaire ; flèches rouges : ténocytes. DC : dépôts calciques, MF : métaplasie fibrocartilagineuse..... 95
- Figure 19.** Evaluation de la minéralisation des ténocytes humains induite en milieu contrôle (CT) et ostéogénique (MO) en présence de PEDF à des concentrations croissantes. PEDF en ng/ml. Quantification du dépôt après solubilisation du rouge alizarine à l'acide formique et lecture de la densité optique à 450 nm..... 96
- Figure 20. A :** Quantification par ELISA du PEDF dans les surnageants de culture au cours des 21 jours. **B :** Expression du PEDF au niveau génique quantifié par qPCR à J21. CT = milieu contrôle ; MO = milieu ostéogénique. N=3. $*=p<0,05$ 97
- Figure 21. A.** Effets *in vitro* des cristaux d'apatite humains sur la production d'IL-6 et de TNF α par des macrophages humains différenciés par le M-CSF. Dosage des cytokines par ELISA après 24 heures de stimulation par les cristaux (1 mg/ml) en présence ou non de LPS (100 ng/ml). **B.** Effets *in vitro* des cristaux d'apatite humains sur la production d'IL-6 par des monocytes humains CD14+ après 24 heures de stimulation (1 mg/ml) en présence ou non de LPS (100 ng/ml). M MCSF : macrophages différenciés en M-CSF..... 103
- Figure 22. A.** Schéma de l'expérimentation « air pouch » avec injection des cristaux d'hydroxyapatite (HA) à J7 après 2 injections d'air à J0 et J3 pour créer la poche. **B.** image de « air pouch » au moment de la dissection. **C.** Image en histologie des premières coupes montrant un épaissement de la membrane de la poche dans le groupe injectée avec des cristaux d'apatite humains (hAP) par rapport au groupe contrôle (PBS). **D.** Analyse de l'épaisseur des membranes 24 heures après l'injection. sHA : cristaux d'hydroxyapatite de synthèse, hAp : cristaux d'apatite humains..... 104

Liste des tableaux

Tableau 1. Résultats sélectionnés de l'analyse des processus biologiques selon la Gene Ontology (GO).....	74
Tableau 2. Résultats sélectionnés de l'analyse des composants cellulaires selon la Gene Ontology (GO).....	76
Tableau 3. Protocole d'extraction des protéines associées aux cristaux d'apatite au sein des calcifications de patients.....	83
Tableau 4. Principales caractéristiques des patients dont les calcifications ont été étudiées. EVA: Echelle visuelle Analogique; questionnaire DASH: Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand. Les aspects radiographiques et échographiques sont illustrés dans les figures 10 et 11.....	84
Tableau 5. Moyenne des concentrations des protéines d'intérêt rapportée à la quantité totales de protéines présentes dans les échantillons. N=66 pour toutes les protéines sauf BMP-2 (N=5).....	88

Annexes

A. Annexe 1

Joint Bone Spine 85 (2018) 687–692



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en



Review

Calcific tendonitis of the rotator cuff: From formation to resorption



Christelle Darrieutort-Laffite^{a,b,*}, Frédéric Blanchard^b, Benoit Le Goff^{a,b}

^a Department of Rheumatology, Nantes University Hospital, 44093 Nantes cedex 1, France

^b Inserm U1238, PHY-OS, Bone Sarcomas and remodeling of calcified tissues, University of Nantes School of Medicine, 44093 Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 19 October 2017
Available online 28 November 2017

Keywords:
Calcific tendonitis
Shoulder
Apatite

ABSTRACT

Calcific tendonitis of the rotator cuff is due to apatite deposits in the shoulder tendons. Patients affected by calcific tendonitis have chronic shoulder pain and disability. Although the disease is frequent, about 10 to 42% of painful shoulders, mechanisms leading to this pathological mineralization are still largely unknown. Research reported in the 1990s suggested that the formation of calcific deposits is linked to cells looking like chondrocytes identified around calcium deposits within a fibrocartilage area. They were considered to be derived from tenocytes but more recently, tendon stem cells, able to differentiate into chondrocytes, were isolated. The pro-mineralizing properties of these chondrocytes-like cells, especially the role of alkaline phosphatase, are not currently clarified. The calcium deposits contain poorly crystalline carbonated apatite associated with protein. Among these proteins, only osteopontin has been consistently identified as a potential regulating factor. During the disease, spontaneous resorption can occur with migration of apatite crystals into the subacromial bursa causing severe pain and restriction of movement. In vivo and in vitro experiments, apatite crystals were able to induce an influx of leucocytes and a release of IL-1 β and IL-18 through the activation of the NLRP3 inflammasome. However, mechanisms leading to spontaneous resolution of this inflammation and disappearance of the calcification still need to be elucidated.

© 2017 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Calcific tendonitis (CT) is one of the most frequent causes of non-traumatic shoulder pain. CT is found in 10 to 42% of chronic painful shoulders [1–4]. Calcific deposits can also remain asymptomatic, found in 3% of non-painful shoulders [5]. Patients suffering from CT are generally aged between 30 and 60 years and women are more often affected than men. Bilateral involvement is common and CT is not linked to manual work [6]. Calcium deposits are more often located in the supraspinatus tendon. Factors associated with the development of symptoms are still unclear although the size and presence of a bursitis on imaging have been shown to be associated with the pain [7]. Calcium deposits may result in chronic pain with discomfort during daily and professional activities. During the evolution, an acute inflammatory episode may occur, leading to the disappearance of the calcification. Although frequent, the mechanisms leading to the deposition of calcium crystals within the tendon remain unclear. Moreover, factors associated with its spontaneous resorption are also unknown.

In this review, we will first discuss the data available on the mechanisms and cells involved in the formation of the calcium deposits. We will next analyze the different steps associated with their disappearance.

2. Calcific deposits formation

The hypothesis most frequently accepted was proposed by Uhthoff [8] who considered that the mineralization process starts with a metaplasia of tenocytes into chondrocytes and that the deposition is actively mediated by these chondrocyte-like cells.

2.1. Cells involved in the formation of the calcium deposits

Normal tendons are composed of collagen, elastic fibers and a ground substance. The main component of tendons is type I collagen, which accounts for approximately 60–85% of the dry weight of the tendons. The remaining ground substance acts like anhydrophilic gel, which surrounds the collagen. It contains proteoglycans, glycosaminoglycans (GAGs), structural glycoproteins and a wide variety of inorganic components (calcium, magnesium, manganese, copper, zinc, phosphore...) [9]. These elements are produced by tenocytes, which are elongated fibroblast-like cells that lie between the collagen fibers.

* Corresponding author. Service de rhumatologie, CHU de Nantes, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex 1, France.

E-mail address: christelle.darrieutort@chu-nantes.fr (C. Darrieutort-Laffite).

<https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2017.10.004>

1297-319X/© 2017 Société française de rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Calcific tendonitis is characterized by the presence of calcium deposits, which appear as amorphous areas located within the tendon fibers (Fig. 1). Several studies have described the presence of chondrocyte-like cells surrounding these deposits [8,10,11]. They have a rounded morphology and are located in lacuna as chondrocytes in the cartilage. The matrix surrounding these cells becomes metachromatic (toluidine blue and azure A positive staining), suggesting a fibrocartilaginous composition (GAGs). It also contains chondroitin-4-sulphate and chondroitin-6-sulphate, especially around the cells [11]. The lack of type II collagen [11,12] suggests that this “fibrocartilaginous area” differs from other forms of fibrocartilage. Few patients were reported to have an osseous metaplasia near the calcium deposit but this pattern seems rare and probably does not represent the main mechanism involved [8,11].

Uthoff and Uthoff and Loehr assumed that the presence of chondrocyte-like cells in the tendon was explained by a metaplasia of tenocytes into chondrocytes [8,12]. Factors able to drive this metaplasia are still unknown. Extracellular matrix of the tendon can be modified in response to load with formation of a fibrocartilaginous matrix at sites where the tendons are under compression [13]. This compression could occur when the supraspinatus tendon become impinged under the subacromial space during overhead activities. In line with this hypothesis, genes that are highly expressed in fibrocartilage (type II collagen and aggrecan) or in cartilage tissue (Sox9) are upregulated in the overused supraspinatus tendon [14]. Chondroid cells have also been observed within degenerative tendinous lesions [15]. However, overuse and degenerative phenomenon cannot be the only factors involved as CT is usually observed in young patients and is not associated with manual work.

Another hypothesis could be that these chondrocyte-like cells derive from mesenchymal stem cells. Several studies have demonstrated the existence of stem cells within the tendons (TSCs) [16]. TSCs are characterized by their multidifferentiation potential and are able to differentiate into adipocytes, chondrocytes, and osteocytes in vitro, and form tendon-like, cartilage-like, and bone-like tissues in vivo [17]. The hypothesis that TSCs might be able to drive the chondrocyte transformation in the tendon remains to be explored.

2.2. Cellular mechanisms involved in the mineralization process

Mineralization is an active and complex process involving protein and enzymes leading to crystal deposition. Matrix vesicles (MVs) are essential in the formation of cartilage, bone and dentin.

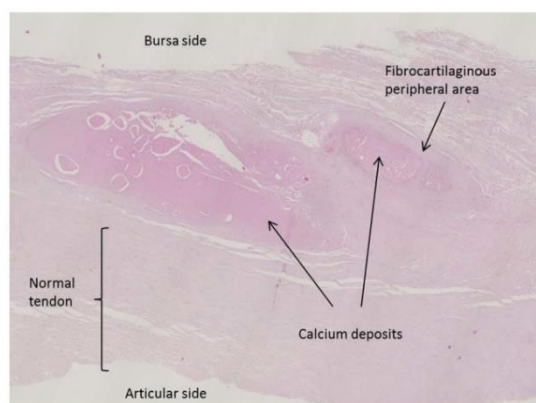


Fig. 1. Hematoxylin and eosin staining of a calcific tendonitis. The calcium deposits appear as amorphous areas located within the tendon fibers and surrounded by a fibrocartilaginous tissue.

These nano-vesicular structures, found in the extracellular matrix, are one of the sites of mineral nucleation that occurs in the organic matrix of the tissues. MVs are enriched in tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), phosphatidylserine, nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 (NPP1) and phospho-1. Ca^{2+} and PO_4^{3-} in the extracellular matrix are transported into MVs via MV transporters, annexins for Ca^{2+} and Pit-1/2 for PO_4^{3-} . Within MV, the ions interact with membrane phospholipids to form a nucleational core complex, resulting in the formation of nanocrystals [18]. In 1993, Archer et al. found that matrix vesicles were present in tendons but without any difference in their distribution between foci of calcification and normal tendon [11]. Uthoff found an intracellular activity of alkaline phosphatase in chondrocyte-like cells and in the matrix surrounding the cells (Gomori staining). He suggested that the coalescence of calcium crystals present in matrix vesicles (MVs) could form the calcification and considered the phenomenon as an incomplete endochondral ossification [8]. On the opposite, Archer et al. did not detect alkaline phosphatase enzymatic activity in areas containing the distinctive rounded cells. For them, the lack of collagen type II and alkaline phosphatase in the pathological regions suggests that the calcification process is not mediated through an endochondral transition [11].

Others data suggest a crucial role of phospholipids released by cellular debris in pathological calcifications. Indeed, studying various pathological calcifications (fibrocartilage, kidney stones, tendon, skin and arteries), Boskey et al. observed a high Ca-PL-P complexes content (calcium acidic phospholipid phosphate) in tissues containing hydroxyapatite [19]. These complexes are able to induce both in vitro and in vivo hydroxyapatite deposition [19,20]. The presence of these Ca-PL-P complexes indicates the presence of cellular and membrane debris in the deposits. In calcium pyrophosphate deposition (CPPD) disease, CPPD crystals are known to cause cell lysis, which can produce membrane debris able to provide sites for new crystal formation. Such a mechanism could be involved in the formation or the growth of apatite deposits.

Overall, chondrocyte-like cells have clearly been identified around calcifications and probably have a critical role in the calcification process. However, cellular mechanisms involved in the deposition of apatite crystals are not well established. Discrepancies exist about their ability to produce mineralizing enzymes such as alkaline phosphatase. The characterization of the mineral composition of the calcific deposits could be helpful to better understand these mechanisms.

2.3. Mineral composition of the calcific deposits

Analyses of the calcific deposits aspirated during US-guided lavage allow the characterization of their crystalline composition. Scanning electron microscopy shows a powder with organic matter and a poorly crystalline phase containing ellipsoidal objects of sizes ranging from 5 to 200 μm in diameter [21]. X-ray diffraction (XRD) shows poorly crystalline carbonated apatite with broader peaks than the synthetic hydroxyapatite (HAP) [22,23]. These samples are characterized by a Ca:P molar ratio about 1.7, close to the one observed in hydroxyapatite (1.67). With Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), two types of carbonates apatite have been identified: type A and type B according to the position of ion CO_3^{2-} [21]. The main difference with synthetic HAP is the absence of OH^- band and the presence of CO_3 groups in bands at 870, 1410 and 1450 cm^{-1} , related to protein groups [21,22,24]. In 2006, Hamada et al. found no difference between calcium deposits removed from acute inflammatory stage and from chronic stage [22]. In 2010, Chiou et al. studied mineral components of different ultrasound morphologies of deposits. Three types of IR spectra were found:

- one for arc or fragmented shapes;
- one for nodular shape;
- the last for the cystic shape.

These three spectra were closely similar but they found a poorer crystallinity in the “arc/fragmented shapes” group than in the “nodular shape” group. Furthermore, they found different distributions of A- and B-type carbonated apatite according to the US shape. The three crystalline phases were correlated with the US morphology of calcific deposits and with pain intensity. These data suggested different stages of maturation in the calcification process and could be helpful for clinicians to manage patients suffering from calcific tendonitis.

2.4. Protein composition of calcium deposits

The organic phase serves as a scaffold for calcific deposits. In bone, for instance, proper crystallization of calcium/phosphate salt needs the presence of collagen fibers. The mineral particles align themselves with their long axes parallel to the fibril axis of the collagen. The apatite crystals appear to deposit first within the holes between the individual collagen molecules and then to spread throughout the matrix. The collagen and associated protein play an important role in determining nucleation, growth and proliferation of these crystals. A better characterization of the protein composition of the calcification matrix could help to better understand the processes involved in the formation of the calcium deposits.

Raman and FTIR spectra analysis show the presence of protein associated with apatite crystals [24]. Osteopontin (OPN) is one among the proteins that have been identified in samples extracted from calcified samples [21]. It is a non-collagenous bone matrix protein associated with bone formation and mineralization. This protein belongs to the small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein (SIBLING). The SIBLING proteins are principally expressed in bone and dentin and are secreted into the extracellular matrix during osteoid formation and subsequent mineralization. In bone, osteopontin is an inhibitor of mineralization. Addition of OPN to cultures of osteoblast-like cells drastically reduces the amount of mineral formation [25]. Osteopontin was detected by immunohistochemistry only in cells adjacent to the calcified area and nor in normal tendons neither in cells away from the calcific deposit [26]. OPN is a substrate for the enzyme transglutaminase 2 (TG2), which catalyzes inter and intramolecular cross-linking affecting the biological activity of the protein. Tissue transglutaminase 2 (tTG2) as also shown to be overexpressed in calcific area [27]. In vascular calcification process, OPN was identified as a potent inhibitor of crystal growth. Hunter showed that vascular smooth muscle cells (VSMCs) derived from OPN-null mice exhibited higher levels of calcification than those from wild-type animals. These data suggest that the abundance of OPN at sites of ectopic vascular calcifications reflects upregulation of the protein in response to crystal formation [25].

Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) was also proposed as a regulator of tendinous calcification in *in vitro* studies. Indeed, BMP-2 was able to increase the osteogenic differentiation of tendon-derived stem cells [28]. However, Oliva et al. performed a screening by RT-PCR of genes involved in tissue remodeling and bone development in biopsies from calcified and non-calcified tendon areas [27]. They did not detect any increase of BMP-2 expression but showed a significant decrease of BMP-4 and BMP-6. Osteonectin, expressed in vascular calcification and identified as a procalcifying factor [29], was not increased in calcified areas.

Finally, Grases et al. [21] suggested that phytate could have a role in the development of tendinous calcium deposits. The main sources of phytate in the daily diet are cereals and legumes. In this study, they found a significantly lower urinary phytate concentration in patients with CT than in healthy individuals. Phytate

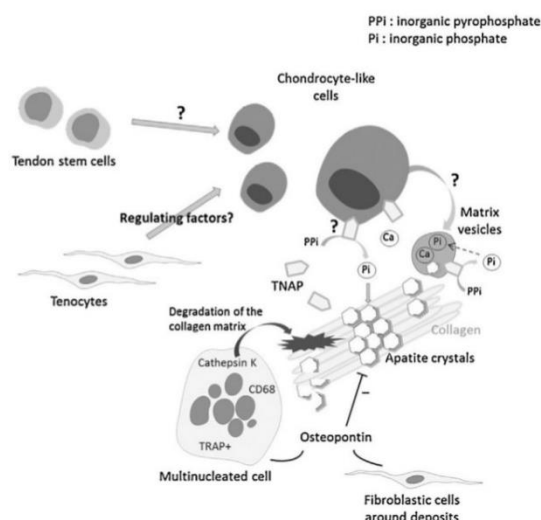


Fig. 2. Formative phase of the calcific deposits. Under unknown conditions, cells present in the tendon (tenocytes or tendon stem cells) undergo a chondrocytes metaplasia leading to rounded chondrocytes-like cells. These cells might be able to produce matrix vesicles and express tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) leading to formation of calcium crystals. They also produce an organic phase made of collagen and other matrix protein. The calcific deposit slowly grows until it elicits an inflammatory reaction characterized by the presence of osteoclast like multinucleated giant cells expressing cathepsin K. Ultimately, this reaction will lead to the resorption of the calcification.

is considered as an inhibitor of hydroxyapatite crystallization and a phytin-enriched diet was able to reduce soft tissue calcification in an animal model [30]. Phytate concentrations in blood and tissues are correlated with those in urine, suggesting that these patients have a tissue deficit in this crystallization inhibitor.

To summarize the first part of this review (Fig. 2), formation of the calcific deposits appears to be linked to chondrocyte-like cells. Their origin and pro-mineralizing properties remain to be clarified. The calcium deposits contain poorly crystalline carbonated apatite associated with protein. Among these proteins, only osteopontin has been consistently identified and additional studies are necessary to characterize the other proteins present in the calcific deposits.

3. Resorption of the calcium deposits

Natural historical course of calcific tendonitis can end by an acute phase associated with severe pain leading to the resorption of the calcific deposit. Factors leading to this phase are still unknown. In the chronic phase, amorphous calcific deposits are surrounded by a fibrocartilaginous tissue without inflammatory cells or vessels and thus can be hidden from the immune cells (personal non published observation). Fragmentation of the calcification or even bursal steroids injection can lead to its disappearance due to the disruption of the fibrous tissue and activation of a local inflammation. During resorption, patients consult for severe pain but the lower prevalence of CT in the elderly than in the population between 30 and 60 suggests that asymptomatic spontaneous resolution could exist.

3.1. Initiation of the resorption

Histological studies of calcific tendonitis retrieved during surgery have shown macrophages and multinucleated cells around broken-up calcium deposits, often accompanied by capillaries or

thin-walled vascular channels. These cells have phagocytic capacities and might be responsible for the initiation of the resorption [8,11]. Macrophages located within mineralized regions of tissue were seen to contain mineral [11]. Furthermore, the multinucleated giant osteoclast-like cells expressed TRAP and cathepsin K both involved in bone resorption [31]. They are also positive for osteopontin [26]. In mineralized tissues, OPN has an important role in osteoclast function. Osteoclasts deficient in OPN do not migrate and are unable to resorb bone [32]. We can assume that OPN could have a similar role in osteoclast-like cells observed around calcium deposits.

Then, diffusion of apatite crystals from the calcification into the subacromial bursa results in severe pain and restriction of movement. The factors that trigger this phase remain unknown.

We will discuss below the mechanisms by which apatite crystals can induce an inflammatory reaction leading to the resorption of the calcification (Fig. 3).

3.2. Pro-inflammatory effects of apatite crystals

3.2.1. *In vivo* pro-inflammatory effects of apatite crystals

The air pouch model is the most frequent animal model used to explore the inflammatory response induced by crystals. This model has been more largely used to explore monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation. The model has been first described in 1981 by Edwards et al. [33]. Mechanical disruption of the subcutaneous connective tissue in rats or mice by the repeated injection of air results in a cavity with a lining structure having many of the features of synovial membrane. This structure closely resembling synovium is formed after 6 days and provides a convenient model for studying the behavior of synovial lining tissue under a wide variety of easily administered stimuli.

Injection of apatite crystals in air pouch induces a local inflammation with massive cell infiltration throughout the pouch cavity and the membrane lining, accompanied by swelling of the

surrounding tissues and vascular dilation [34,35]. The exudate and the pouch lining are rich in polymorphonuclear cells and mononuclear phagocytic cells [34,36]. The inflammatory response is yet present 6 hours after crystals injection, maximal at 24 h and spontaneously decreases at 48 h [36]. In the exudates, IL-1 β , IL-6 and IL-18 are secreted in significant amounts. The inflammatory response depends on inflammasome. Indeed, apatite-induced neutrophil recruitment and cytokine production were abrogated in mice lacking NLRP3, ASC or caspase-1 such as leukocyte ingress and swelling of the synovium-like membrane [35]. Finally, TNF α was not significantly increased in the exudate after apatite injection [37]. Of note, all these studies have been performed with synthetic hydroxyapatite and the effect of patients carbonated form might induce a different response.

3.2.2. *In vitro* effects of apatite crystal on cells

To decipher the cellular mechanisms leading to the inflammatory response, these experiments have been pursued *in vitro*. Several authors have studied the impact of apatite crystals on the release of major pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF, IL-6) by monocytes-macrophages. In the oldest studies, hydroxyapatite-stimulated human monocytes inconstantly release IL-1 β [38–41]. Indeed, it was more recently highlighted that priming is essential for crystal induced IL-1 β secretion. This induced IL-1 β release is caspase-1 and NLRP3 dependent [42]. Apatite crystals can also increase IL-6 production by human monocytes *in vitro* with a dose dependent effect [39]. Finally, Di Giovine et al. showed that human blood mononuclear cells treated with apatite crystals could release significant amounts of TNF but this was not constant and appeared to be related to the individual donor [43].

Concerning macrophages, apatite crystals do not stimulate TNF- α secretion even after LPS-priming [35,44]. However, they stimulate high secretion of IL-1 β and IL-18 when using murine macrophages. As for monocytes, LPS-priming is essential to induce IL-1 β production. Using peritoneal macrophages derived from

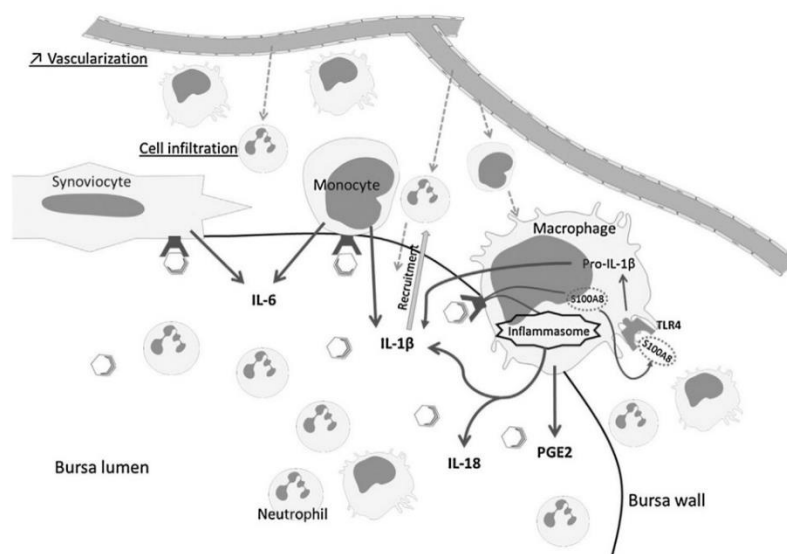


Fig. 3. Mechanisms involved in induction of inflammation by apatite crystal in the subacromial bursa. A massive cell infiltration, mainly composed of polymorphonuclear cells and mononuclear phagocytic cells, occurs throughout the pouch cavity and the membrane lining. In response to apatite stimulation, monocytes produce IL-1 β and IL-6 and macrophages secrete IL-1 β and IL-18 through the activation of the NLRP3 inflammasome. Apatite crystals also activate a signaling pathway leading to the induction of S100A8, identified as an endogenous activator of TLR-4, which can in turn feedback on cells to drive pro-IL-1 β production. Furthermore, macrophages can produce high concentrations of prostaglandin E2 (PGE2). Finally, other cells from the synovial tissue could be involved in the production of pro-inflammatory factors after stimulation by crystals: hydroxyapatite crystals induce IL-6 production by human synoviocytes.

NLRP3, ASC, and caspase-1 deficient mice, HA-induced IL-1 β and IL-18 secretion was markedly reduced, highlighting the critical role of the NLRP3 inflammasome in this response [35]. Interestingly, the same study has shown that different physical parameters of crystals exhibit different capacities to induce the inflammasome activation in vitro. Thus, needle-shaped crystals are the most effective to induce an inflammatory response [35]. Cunningham et al. showed that apatite crystals can also activate a signaling pathway leading to the induction of S100A8, identified as an endogenous activator of TLR-4, which can in turn feedback on cells to drive pro-IL-1 β production [44]. Finally, high concentrations of prostaglandin E2 were found in the supernatants of peritoneal mouse macrophages stimulated by apatite crystals [45].

Other cells from the synovial tissue could be involved in the production of pro-inflammatory factors after stimulation by crystals. Thus, hydroxyapatite crystals were able to induce IL-6 production by human synoviocytes in vitro. Conversely, IL-1 was not detectable in these cells [39].

Overall, the study of mechanisms involved in apatite-induced inflammation showed the crucial role of IL-1 β , produced after activation of the NLRP3 inflammasome pathway as observed with other in vitro crystals-induced response (monosodium urate or calcium pyrophosphate for instance). Priming of the cells by a first signal is also essential to induce a cellular response. Treatment targeting IL-1 (anakinra) has been evaluated to treat patients with acute refractory pain associated with calcification resorption [46].

3.3. Tendon healing

After the disappearance of the deposits, we do not observe tendon sequela [47]. On surgical samples, Uthoff et al., observed small areas representing the process of repair. They observed different patterns:

- granulation tissue with young fibroblasts and newly formed capillaries;
- well-formed scars with maturing fibroblasts.

In these areas, newly formed collagen fibrils were detected [12].

4. Conclusion

Mechanisms involved in the deposition of calcium in tendons are complex and not yet fully understood. Histological analysis of calcific tendonitis allowed the characterization of chondrocyte-like cells surrounding an amorphous crystal deposit. However, the origin of these cells and the cellular mechanisms involved in their mineralization capacities needs to be further explored. Their expression of alkaline phosphatase and the presence of matrix vesicles are controversial in the literature. Calcific deposits are composed of poorly crystallized carbonate apatite that is linked to an organic phase made of different protein. Osteopontin has been shown to be expressed in the organic phase but other protein need to be identified to better understand the mechanisms involved in the formative phase. The inflammation induced by the crystals and leading to their disappearance involved osteoclast-like multinucleated giant cells and cytokines from the IL-1 family such as IL-1 β and IL-18. The NLRP3 inflammasome seems to have a critical role in the resorption. The factors involved in the occurrence of the resolution phase and the different steps leading from the resorption of the calcium deposit to the tendon healing also need to be better characterized.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Friedman MS. Calcified tendinitis of the shoulder. *Am J Surg* 1957;94:56–61.
- [2] Harmon PH. Methods and results in the treatment of 2580 painful shoulders, with special reference to calcific tendinitis and the frozen shoulder. *Am J Surg* 1958;95:527–44.
- [3] Farin PU, Jaroma H. Sonographic findings of rotator cuff calcifications. *J Ultrasound Med* 1995;14:7–14.
- [4] Louwerens JK, Sieverelt IN, van Hove RP, et al. Prevalence of calcific deposits within the rotator cuff tendons in adults with and without subacromial pain syndrome: clinical and radiologic analysis of 1219 patients. *J Shoulder Elbow Surg* 2015;24:1588–93.
- [5] McLaughlin HL. Lesions of the musculotendinous cuff of the shoulder: III. Observations on the pathology, course and treatment of calcific deposits. *Ann Surg* 1946;124:354–62.
- [6] Speed CA, Hazleman BL. Calcific tendinitis of the shoulder. *N Engl J Med* 1999;340:1582–4.
- [7] Le Goff B, Berthelot JM, Guillot P, et al. Assessment of calcific tendonitis of rotator cuff by ultrasonography: comparison between symptomatic and asymptomatic shoulders. *Joint Bone Spine* 2010;77:258–63.
- [8] Uthoff HK. Calcifying tendinitis, an active cell-mediated calcification. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1975;366:51–8.
- [9] Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10:312–20.
- [10] McKendry RJ, Uthoff HK, Sarkar K, et al. Calcifying tendinitis of the shoulder: prognostic value of clinical, histologic and radiologic features in 57 surgically treated cases. *J Rheumatol* 1982;9:75–80.
- [11] Archer RS, Bayley JL, Archer CW, et al. Cell and matrix changes associated with pathological calcification of the human rotator cuff tendons. *J Anat* 1993;182:1–11.
- [12] Uthoff HK, Loehr JW. Calcific tendinopathy of the rotator cuff: pathogenesis, diagnosis and management. *J Am Acad Orthop Surg* 1997;5:183–91.
- [13] Benjamin M, Ralphs JR. Fibrocartilage in tendons and ligaments – an adaptation to compressive load. *J Anat* 1998;193:481–94.
- [14] Archambault JM, Jelinsky SA, Lake SP, et al. Rat supraspinatus tendon expresses cartilage markers with overuse. *J Orthop Res* 2007;25:617–24.
- [15] Rees JD, Wilson AM, Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:508–21.
- [16] Bi Y, Ehrichou D, Kirts TM, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 2007;13:1219–27.
- [17] Zhang J, Wang JH. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord* 2010;11:10.
- [18] Golub EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol* 2011;33:409–17.
- [19] Boskey AL, Bullough PG, Vigorita V, et al. Calcium-acidic phospholipid-phosphate complexes in human hydroxyapatite-containing pathologic deposits. *Am J Pathol* 1988;133:22–9.
- [20] Raggio CL, Boyan BD, Boskey AL. In vivo hydroxyapatite formation induced by lipids. *J Bone Miner Res* 1986;1:409–15.
- [21] Grases F, Muntaner-Gimbernau L, Vilchez-Mira M, et al. Characterization of deposits in patients with calcific tendinopathy of the supraspinatus. Role of phytate and osteopontin. *J Orthop Res* 2015;33:475–82.
- [22] Hamada J, Tamai K, Ono W, et al. Does the nature of deposited basic calcium phosphate crystals determine clinical course in calcific periarthritis of the shoulder? *J Rheumatol* 2006;33:326–32.
- [23] Gartner J, Simons B. Analysis of calcific deposits in calcifying tendinitis. *Clin Orthop Relat Res* 1990;(254):111–120.
- [24] Chiou HJ, Hung SC, Lin SY, et al. Correlations among mineral components, progressive calcification process and clinical symptoms of calcific tendonitis. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:548–55.
- [25] Hunter GK. Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation. *Calcif Tissue Int* 2013;93:348–54.
- [26] Takeuchi E, Sugamoto K, Nakase T, et al. Localization and expression of osteopontin in the rotator cuff tendons in patients with calcifying tendinitis. *Virchows Arch* 2001;438:612–7.
- [27] Oliva F, Barisani D, Grasso A, et al. Gene expression analysis in calcific tendinopathy of the rotator cuff. *Eur Cell Mater* 2011;21:548–57.
- [28] Rui YF, Lui PP, Ni M, et al. Mechanical loading increased BMP-2 expression which promoted osteogenic differentiation of tendon-derived stem cells. *J Orthop Res* 2011;29:390–6.
- [29] Ciceri P, Elli F, Cappelletti L, et al. Osteonectin (SPARC) expression in vascular calcification: in vitro and ex vivo studies. *Calcif Tissue Int* 2016;99:472–80.
- [30] Grases F, Prieto RM, Sanchis P, et al. Role of phytate and osteopontin in the mechanism of soft tissue calcification. *J Nephrol* 2008;21:768–75.
- [31] Nakase T, Takeuchi E, Sugamoto K, et al. Involvement of multinucleated giant cells synthesizing cathepsin K in calcified tendinitis of the rotator cuff tendons. *Rheumatology (Oxford)* 2000;39:1074–7.
- [32] Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol* 2004;26:179–84.

- [33] Edwards JC, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol* 1981;134:147–56.
- [34] Kowanko IC, Gordon TP, Rozenbils MA, et al. The subcutaneous air pouch model of synovium and the inflammatory response to heat aggregated gamma-globulin. *Agents Actions* 1986;18:421–8.
- [35] Jin C, Frayssinet P, Pelker R, et al. NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:14867–72.
- [36] Prud'hommeaux F, Schiltz C, Lioté F, et al. Variation in the inflammatory properties of basic calcium phosphate crystals according to crystal type. *Arthritis Rheum* 1996;39:1319–26.
- [37] Watanabe W, Baker DG, Schumacher Jr HR. Comparison of the acute inflammation induced by calcium pyrophosphate dihydrate, apatite and mixed crystals in the rat air pouch model of a synovial space. *J Rheumatol* 1992;19:1453–7.
- [38] Dayer JM, Evêquoz V, Zavadi-Grob C, et al. Effect of synthetic calcium pyrophosphate and hydroxyapatite crystals on the interaction of human blood mononuclear cells with chondrocytes, synovial cells and fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1987;30:1372–81.
- [39] Guerne PA, Terkeltaub R, Zuraw B, et al. Inflammatory microcrystals stimulate interleukin-6 production and secretion by human monocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1989;32:1443–52.
- [40] Di Giovine FS, Malawista SE, Nuki G, et al. Interleukin 1 (IL 1) as a mediator of crystal arthritis. Stimulation of T cell and synovial fibroblast mitogenesis by urate crystal-induced IL 1. *J Immunol* 1987;138:3213–8.
- [41] Di Giovine FS, Symons JA, Duff GW. Kinetics of IL1 beta mRNA and protein accumulation in human mononuclear cells. *Immunol Lett* 1991;29:211–8.
- [42] Pazár B, Ea HK, Narayan S, et al. Basic calcium phosphate crystals induce monocyte/macrophage IL-1 β secretion through the NLRP3 inflammasome in vitro. *J Immunol* 2011;186:2495–502.
- [43] Di Giovine FS, Malawista SE, Thornton E, et al. Urate crystals stimulate production of tumor necrosis factor alpha from human blood monocytes and synovial cells. Cytokine mRNA and protein kinetics and cellular distribution. *J Clin Invest* 1991;87:1375–81.
- [44] Cunningham CC, Mills E, Mielke LA, et al. Osteoarthritis-associated basic calcium phosphate crystals induce pro-inflammatory cytokines and damage-associated molecules via activation of Syk and PI3 kinase. *Clin Immunol* 2012;144:228–36.
- [45] Alwan WH, Dieppe PA, Elson CJ, et al. Hydroxyapatite and urate crystal induced cytokine release by macrophages. *Ann Rheum Dis* 1989;48:476–82.
- [46] Zufferey P, So A. A pilot study of IL-1 inhibition in acute calcific periarthritis of the shoulder. *Ann Rheum Dis* 2013;72:465–7.
- [47] Serafini G, Sconfienza LM, Lacelli F, et al. Rotator cuff calcific tendonitis: short-term and 10-year outcomes after two-needle us-guided percutaneous treatment – nonrandomized controlled trial. *Radiology* 2009;252:157–64.

B. Annexe 2

Revue du rhumatisme monographies 85 (2018) 102–107



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com


Les moyens et la stratégie thérapeutiques face à une calcification de la coiffe des rotateurs



Treatment strategies in calcific tendonitis of the rotator cuff

Christelle Darrieutort-Laffite, Benoît Le Goff*

Service de rhumatologie, Hôtel-Dieu, 1, place Alexis-Ricordeau, 44093 Nantes cedex 1, France

I N F O A R T I C L E

Historique de l'article :

Accepté le 4 janvier 2018

Disponible sur Internet le 9 février 2018

Mots clés :

Tendinopathies calcifiantes

Ondes de choc

Échographie

Traitement

Arthroscopie

R É S U M É

Les tendinopathies calcifiantes sont une cause fréquente de douleurs d'épaule volontiers chroniques et invalidantes. Différentes options thérapeutiques s'offrent à nous pour prendre en charge ces patients. Dans cette revue, les moyens et options stratégiques dans cette pathologie sont discutés et permettent de dégager certaines notions. Le traitement par kinésithérapie et anti-inflammatoires non stéroïdiens peut être tenté en première intention puisque le caractère symptomatique de la calcification peut être un marqueur de l'évolution vers la résorption. Cependant, la durée nécessaire à la disparition spontanée des symptômes peut être longue et difficilement prévisible. Ensuite, environ un tiers des patients pourront répondre sur le long terme à une infiltration de la bourse sous-acromio-deltoidienne, les autres récidivant souvent lorsque l'effet de la corticothérapie locale s'atténue. C'est à ce stade qu'une intensification du traitement peu se discuter. Les données actuelles semblent favoriser la ponction-lavage-fragmentation (PFL) de la calcification aux ondes de chocs. Cette dernière permet de manière plus rapide et fréquente la disparition de la calcification et de la douleur. Cette affirmation est à tempérer au vu de la qualité et quantité de données disponibles. Le guidage de la PFL se fait maintenant sous échographie et avec une technique à une aiguille qui est équivalente au lavage à 2 aiguilles. Enfin, la chirurgie est clairement indiquée en cas d'échec d'une prise en charge médicale complète, n'ayant jamais montré sa supériorité par rapport aux autres thérapeutiques.

© 2018 Société Française de Rhumatologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

A B S T R A C T

Calcific tendinitis of the rotator cuff is one of the most common causes of shoulder pain. The most efficient treatment for this disease is still debated. This review discusses efficacy of the different therapies currently available to help in the choice of the best therapeutic strategy. First, this disease can be treated by conservative treatment (physical therapy and nonsteroidal anti-inflammatory drugs) with good results. However, the improvement can be slow to occur and no clear factor has been identified to predictive the spontaneous disappearance of the calcific deposit. Subacromial corticosteroid injections have a short term effect but can also have long term efficiency in about a third of the patients. Needling and lavage of the calcification under ultrasound or extracorporeal shock wave therapy are the next available options. The former seems more efficient on pain and to decrease the size of calcium deposits than the latter and therefore might the treatment of choice for nonsurgical options of treatment in calcific tendinitis of the shoulder. However, more studies are needed to draw any definite conclusion on this topic. Needling and lavage can be performed with one needle and under ultrasonography with the same efficacy than with the 2-needle technic. Finally, arthroscopic debridement of calcific has not shown any significant difference with the other treatment. Therefore, it should be considered as a secondary and more invasive option for patients who failed medical treatment.

© 2018 Société Française de Rhumatologie. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : benoit.legoff@chu-nantes.fr (B. Le Goff).<https://doi.org/10.1016/j.monrhu.2018.01.002>

1878-6227/© 2018 Société Française de Rhumatologie. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

Les tendinopathies calcifiantes de la coiffe des rotateurs sont caractérisées par la présence de cristaux d'apatite carbonatée au sein des tendons. Ces dépôts peuvent être complètement asymptomatiques, retrouvés sur 3 à 10 % d'épaules non douloureuses [1]. Lorsqu'elles sont symptomatiques, elles sont responsables d'un tableau douloureux chronique de l'épaule, volontiers nocturnes et survenant par poussées, sur un fond de douleurs mécaniques chroniques secondaires à un conflit sous-acromial. Des études ont ainsi montré la présence de calcifications chez 17 % des patients avec des douleurs chroniques d'épaule [2]. La résorption peut survenir de manière spontanée, après une période plus ou moins longue de douleurs chroniques, parfois dans un tableau très bruyant d'épaule hyperalgique.

Lorsque la tendinopathie calcifiante devient symptomatique, plusieurs options thérapeutiques peuvent être envisagées. Tout d'abord, celle d'un traitement associant kinésithérapie/antalgiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Ensuite, le traitement peut être « mini-invasif » utilisant les ondes de choc ou des techniques percutanées à l'aiguille. Ces traitements ont pour but d'éliminer la calcification. La dernière possibilité est la chirurgie pouvant associer une évacuation de la calcification à une acromioplastie. Dans cette revue, nous discuterons de l'efficacité, des avantages et de la place relative de chacune de ces techniques dans la prise en charge des tendinopathies calcifiantes.

2. Efficacité des traitements médicaux

2.1. « Wait and see » policy

L'histoire naturelle des calcifications tendineuses passe par plusieurs phases [3,4]. Tout d'abord, une phase de formation au cours de laquelle le dépôt de calcium se constitue progressivement, généralement sans symptôme. Ensuite, pour des raisons encore mal élucidées, cette calcification devient symptomatique. Il a été montré que la taille de la calcification, la présence de Doppler à l'échographie et d'une bursite étaient associés au caractère symptomatique de la calcification [5]. Ceci évoque donc que les symptômes surviendraient lorsque cette calcification entraîne un conflit sous-acromial ou présente un début de résorption spontanée. Après la disparition, survient alors une phase de remodelage, permettant une « cicatrisation » du tendon et expliquant le caractère souvent lent de l'amélioration des symptômes malgré la disparition radiologique des calcifications.

Cette histoire naturelle montre qu'en l'absence d'intervention, une calcification devenant symptomatique peut parfaitement disparaître spontanément, justifiant donc la possibilité d'un traitement conservateur de première intention. Bosworth et Rupp et al. ont montré que le taux de résorption annuelle spontanée était estimé entre 6,4 et 32,0 % et survenait principalement sur des calcifications déjà floues à la radiographie standard [1,6]. De plus, les données épidémiologiques montrent aussi une diminution de prévalence avec l'âge après 60 ans. Il est donc possible, voire probable, qu'une part non négligeable des calcifications se résorbe avec le temps sans symptomatologie significative.

Une étude a suivi sur le long terme 87 patients pris en charge de manière conservatrice (kinésithérapie et AINS) [7]. Cette étude souffre d'un biais de sélection car seuls les patients peu symptomatiques étaient inclus dans cette cohorte observationnelle, les patients les plus gênés étant traités par ponction-fragmentation-lavage (PFL) à l'aiguille. Au total, une évolution favorable était notée dans le temps (évaluation entre 12 mois et 4 ans après le début des symptômes). L'EVA à l'activité passait ainsi de 6,3 (3–10) en moyenne à 2,6 (0–5) avec seulement 28 % des patients pour

lesquels l'évolution n'était pas favorable selon le score UCLA [8]. Concernant la radiographie, 62 % des calcifications diminuaient de taille ou disparaissaient. Dans cette étude, les auteurs n'ont pas retrouvé de facteurs permettant de prédire une évolution favorable que ce soit la morphologie initiale, la localisation ou la taille de la calcification.

Le traitement médical simple peut être proposé en première intention à un patient en lui expliquant que l'évolution naturelle de la maladie peut être favorable, mais dans un délai pouvant être long. Nous manquons de facteurs permettant de prédire l'évolution naturelle de la maladie et ainsi de choisir les patients à qui proposer cette stratégie.

2.2. Infiltration de corticoïdes

Une des hypothèses est que la calcification devient symptomatique lorsqu'elle entraîne un conflit sous-acromial ou présente des signes inflammatoires associés à sa résorption spontanée. L'injection d'un corticoïde dans la bourse sous-acromio-deltoidienne (BSAD) permettrait dans ce contexte de traiter une inflammation péricalcique ou bursale.

Une étude effectuée dans notre centre a montré la réalisation d'une infiltration de la BSAD réalisée sous contrôle radioscopique permettait une amélioration sur le court terme (2 semaines) chez 50 % des patients [9]. Cette efficacité se prolongeait à 2 ans dans 75 % des cas. Les patients répondaient moins bien aux corticoïdes s'ils avaient un travail manuel, une calcification de type A selon Molé et al. [10] et des arrêts de travail passés répétés.

Une étude randomisée contrôlée a comparé l'efficacité d'une infiltration sous-acromiale à la réalisation d'une PFL associée à une infiltration sous-acromiale [11]. Cette étude montre une amélioration significative de la douleur et de la fonction à 6 semaines dans le groupe infiltration seule, mais cette amélioration ne se maintient pas dans le temps avec une récurrence progressive des symptômes après 3 mois. Une PFL a été secondairement réalisée chez 65 % des patients.

Au total, l'efficacité des infiltrations de corticoïdes est avérée sur le court terme, mais avec un nombre non négligeable de patients qui vont présenter une récurrence des symptômes et nécessiter un traitement additionnel.

2.3. Ondes de choc

Les ondes de chocs sont des ondes acoustiques générant une augmentation locale de pression dans les structures qu'elles traversent. Elles sont aussi à l'origine d'une onde de cavitation responsable de la formation de microbulles dans les tissus [12]. Ces deux phénomènes seraient à l'origine d'une fragmentation mécanique de la calcification et une activation locale de sa résorption. Ce traitement est utilisé dans de nombreuses indications que les tendinopathies calcifiantes en rhumatologie, notamment dans le cadre des tendinopathies chroniques, aponévrosites plantaires sans preuve formelle de leur efficacité [13]. Différentes énergies peuvent être appliquées sur la zone à traiter et son intensité sera exprimée en mJ/mm^2 . Même si n'existe pas de consensus franc, une intensité inférieure à $0,08 \text{ mJ}/\text{mm}^2$ est considérée faible, de $0,08$ à $0,28 \text{ mJ}/\text{mm}^2$ modérée et supérieure à $0,28 \text{ mJ}/\text{mm}^2$ comme forte [14].

Les ondes de choc ont été les plus évaluées dans des essais randomisés contrôlés. Ces essais ont soit étudié l'effet des ondes de choc versus placebo, soit ondes de choc haute versus basse énergie. Le but de cette monographie n'est pas de faire une revue exhaustive de toutes ces études et une méta-analyse récente de 20 études randomisées contrôlées permet de répondre à ces questions [15].

Celle-ci montre une hétérogénéité importante dans les protocoles employés. Ainsi, l'énergie employée variait de 0,06 à 0,78 mJ/mm², le nombre d'impulsions de 1000 à 6000 et le nombre de séances de 1 à 5 [16]. Concernant l'efficacité de la technique, les études ayant comparé les ondes de chocs versus placebo ont montré une amélioration significative des symptômes dans le groupe traité par ondes de choc avec une disparition de la calcification chez 21 à 100 % des patients [15]. Cependant, les ondes de choc à basse énergie n'amélioraient que la fonction alors que l'utilisation d'ondes à haute énergie améliorait également la douleur et provoquaient une disparition plus fréquente de la calcification. Ceci est confirmé par des études ayant comparé entre elles les 2 intensités d'énergies [17,18]. La dose moyenne tolérée par le patient dans le groupe haute énergie était de 1210 mJ/mm² (610 à 1700). La tolérance de ces ondes de choc était bonne hormis une recrudescence douloureuse lors des sessions, des pétéchies ou ecchymoses sur la zone de traitement dans la moitié de cas dans le groupe haute énergie.

De rares cas d'ostéonécrose ont été publiés dans la littérature, mais le lien avec le traitement est difficile à affirmer [19,20].

2.4. Traitements percutanés à l'aiguille

La PFL a pour objectif d'extraire les dépôts cristallins du tendon à travers une ou 2 aiguilles. Elle a également comme effet de provoquer une activation locale de l'inflammation qui sur le moyen terme conduira à la disparition progressive de la calcification. C'est pour cela que certains auteurs ne réalisent pas d'aspiration/lavage de la calcification et seulement la fragmentation (*needling*) [21,22].

Différentes techniques sont possibles :

- 1 ou 2 aiguilles ;
- taille croissante de l'aiguille ;
- association ou non à une infiltration sous-acromiale de corticoïdes.

La technique initialement décrite était une méthode à 2 aiguilles permettant littéralement de « laver » la calcification pour en extraire la totalité du contenu calcique [9]. Aina et al. ont pour la première fois rapporté une technique à une seule aiguille, réalisée de manière échoguidée, avec évacuation de la calcification grâce à un effet piston et remontée du sel de calcium dans la seringue lors de l'injection du sérum physiologique [23]. Une étude récente a comparé l'efficacité de ces 2 méthodes [24]. Cette étude a inclus 211 patients. La procédure à 2 aiguilles utilisait 2 aiguilles 16G. Plusieurs passages de sérum physiologique dans des seringues de 20 mL ont été effectués jusqu'à ce que le liquide de lavage devienne clair. Dans l'autre groupe, une seule aiguille de 18G a été utilisée avec du sérum physiologique avec la technique décrite par Aina et al. Le geste était terminé dans les 2 cas par l'injection de 1 mL d'acétonide de triamcinolone (KENACORT®). Les auteurs n'ont pas retrouvé de différence significative dans la facilité d'extraction du calcium, l'efficacité clinique ou la fréquence des bursites post-geste quelle que soit la date de l'évaluation (1 mois, 3 mois, 1 an). Seul le temps de procédure était plus rapide dans le cas d'une calcification dure avec une technique à 2 aiguilles alors qu'elle était plus rapide avec une technique à une aiguille dans le cas de calcification molle. Cependant, ces différences étaient minimales, respectivement de 75 et 18 secondes. Ceci montre donc l'absence de différence entre les techniques à 1 et 2 aiguilles.

L'inconvénient de la technique à une aiguille est qu'elle se bouche dans environ 15 % des cas [24]. L'utilisation d'une aiguille à ponction lombaire pédiatrique ou du mandrin d'une aiguille noire permet de résoudre ce problème [25,26]. Concernant la taille des aiguilles utilisées, celles-ci varient de 16 à 25G. Il est évoqué un potentiel risque pour le tendon à utiliser des aiguilles de calibre plus important. L'étude d'Orlandi et al. n'a retrouvé aucune lésion

tendineuse à 1 an de la prise en charge d'une tendinopathie calcifiante même avec une technique avec 2 aiguilles de 16G [24].

Une option pour essayer d'extraire de manière plus importante pourrait être l'utilisation de produit permettant une dissolution plus rapide de la calcification. Une étude a montré l'intérêt de chauffer le sérum physiologique préalablement à 42°C qui permettait de raccourcir le temps de lavage de 3 minutes, la facilité d'extraction et la fréquence des bursites postgesses [27]. Une étude est en cours dans notre centre sur l'intérêt du lavage au thiosulfate de sodium pour faciliter la dissolution du calcium (NCT02538939). En effet, cette molécule est connue pour être efficace dans les calcinose sous-cutanées [28]. Dans l'idée d'utiliser un chélateur du calcium, une étude a associé de la mésothérapie avec administration 1 fois par semaine de 1 mL d'EDTA disodium, 1 mL 1 % de procaine et 3 mL d'eau injectable suivi de 15 minutes d'ultrasons dans un gel de 15 % solution of disodium EDTA 5 fois par semaine pendant 3 semaines. Les résultats ont montré une disparition de la calcification chez deux tiers des patients à 1 an contre 15 % dans le groupe témoin. Ces résultats n'ont jamais été reproduits et cette technique n'est pas rentrée dans les techniques actuellement utilisées [29].

Le dernier point technique à discuter est la nécessité ou non de réaliser une injection de corticoïde dans la bourse sous-acromiale après une ponction-lavage. Des auteurs avaient souligné l'importance de la réaction inflammatoire déclenchée par le geste plus que la quantité de calcium extraite [21,22]. Ainsi, il a été évoqué que les corticoïdes pourraient s'opposer à la réaction inflammatoire et ainsi retarder la disparition de la calcification [30]. Une étude est en cours pour permettre de répondre à cette question (NCT02403856).

Il a été rapporté que l'aspect de la calcification à la radiographie ou à l'échographie permettait de prédire le résultat de la PFL. Farin a ainsi retrouvé une association entre l'absence de cône d'ombre postérieur échographique et une évolution favorable après PFL [31]. De Witte et al. retrouvent également une meilleure évolution des calcifications floues à la radiographie [11]. De manière intéressante, l'aspect flou à la radiographie et l'absence de cône d'ombre à l'échographie sont aussi des facteurs d'évolution favorable chez des patients pris en charge par traitement conservateur [32]. A contrario, les grosses calcifications denses à la radiographie sont plus à risque d'échec thérapeutique [33]. Ceci n'est pas confirmé par toutes les études, notamment une étude ouverte prospective à 1 an d'une PFL ne retrouvant aucune association entre le succès et quelconque aspect radiographique de la calcification [34]. La présence d'une calcification dense ne doit donc pas remettre en cause la réalisation d'une PFL, mais impose de rester plus attentif à l'évolution du patient sur le moyen terme au vu du risque d'échec thérapeutique plus important. Une deuxième PFL pourrait être dans ce cas proposée.

3. Traitement chirurgical

Il existe 3 grandes options chirurgicales pour le traitement des tendinopathies calcifiantes :

- l'acromioplastie ;
- l'évacuation de la calcification ou la combinaison des 2 gestes.

L'acromioplastie consiste en un amincissement de l'acromion par une fraise rotative motorisée afin de diminuer le conflit. L'évacuation de la calcification se fait par différentes techniques, par exemple avec une petite curette et une canule d'aspiration après incision du tendon au bistouri. Ces gestes sont maintenant réalisés en arthroscopie, technique aussi efficace que la chirurgie ouverte avec de moindres complications [35,36].

Certaines questions restent en suspens. Tout d'abord se pose la question de l'intérêt d'effectuer une acromioplastie en association avec l'évacuation de la calcification. Deux études ont tenté de répondre à cette question. La première est une étude randomisée contrôlée et a comparé la réalisation d'une évacuation chirurgicale de la calcification en y associant ou non une acromioplastie [37]. Quatre-vingts patients ont été randomisés en 2 groupes. Aucune différence significative n'a été retrouvée à la fois au niveau de la douleur (EVA), de la fonction (DASH) ou du SF-12. Une autre étude, cette fois rétrospective de type cas/témoin, a montré que l'évolution clinique de patients ayant eu une acromioplastie était même moins bonne avec un délai de reprise du travail [38]. Une revue systématique de la littérature récente conclue à la nécessité de s'adapter à chaque situation et que l'acromioplastie ne doit s'envisager qu'en cas l'hypothèse d'un conflit aggravé par la morphologie de l'acromion et ne devrait en aucun cas être systématique [39]. Enfin, une rétrospective incluant 40 patients a comparé l'évolution clinique de patients traités par acromioplastie avec ou sans ablation de la calcification. Là encore, aucune différence retrouvée entre les 2 groupes [40]. De manière intéressante, le geste isolé d'acromioplastie est associé à une disparition sur le long terme de la calcification [41].

Au total, les différentes études ne permettent pas de trancher sur la meilleure technique chirurgicale à choisir.

4. Quelle stratégie de prise en charge proposer ?

Il existe peu d'étude ayant comparé de manière rigoureuse l'efficacité des différentes thérapeutiques citées ci-dessus. Ceci est, par ailleurs, difficile car il ne sera pas possible de respecter un aveugle dans un contexte de comparaison de traitement chirurgical et médical. Même une comparaison d'un traitement par ondes de choc versus traitement à l'aiguille reste limitée par l'impossibilité d'un maintien d'un aveugle. Quelques études et méta-analyses groupées permettent tout de même de dégager certaines notions.

La première question est celle de la place de la prise en charge associant kinésithérapie et AINS. Une étude intéressante a suivi sur le long terme une cohorte de patients ayant refusé une prise en charge par ponction lavage de leur calcification et l'a comparée à des patients ayant accepté le traitement [42]. Même si méthodologiquement très critiquable à cause du biais de sélection, cette étude montre que les patients s'améliorent de manière significative et plus rapide dans le groupe traité mais sans différence entre les 2 groupes sur le long terme (5 à 10 ans). Il n'y avait, hélas, pas d'évaluation intermédiaire entre 1 et 5 ans pour savoir plus exactement quand la différence s'estompeait.

Ensuite, vient la question de l'efficacité de l'infiltration sous-acromiale de corticoïdes seuls. Une étude randomisée contrôlée de bonne qualité méthodologique malgré de faibles effectifs a comparé infiltration sous-acromiale avec ou sans lavage de la calcification. Il n'existait pas de différence entre les 2 interventions à 3 mois, mais l'évolution à 1 an était meilleure dans le groupe PFL. Le groupe infiltration seule voyait leurs symptômes récidiver après 3 mois [11]. Sur le plan radiologique, le groupe PFL avait une diminution plus significative de la taille de la calcification. Le suivi à 5 ans de ces patients a été récemment publié ne retrouvant cette fois plus de différence entre les 2 groupes en intention de traiter [43]. À noter que 65 % des patients ayant eu une infiltration ont nécessité par la suite une PFL au cours de la première année de suivi. Ceci conforte les résultats de l'étude Maugars et al. qui a montré que la réalisation d'une infiltration sous-acromiale simple peut être proposée en première intention avant un geste de PFL, cette intervention étant cependant insuffisante chez certains patients avec nécessité de réalisation d'une PFL dans un second temps.

Concernant les techniques d'ondes de choc et de ponction lavage, quelle est la plus efficace ? Une seule étude a comparé la réalisation d'une PFL et d'ondes de choc. La technique de PFL n'était qu'une ponction itérative (*needling*) sans aspiration/lavage. La technique d'ondes de choc comprenait 3 sessions à 1 semaine d'intervalle (1000 impulsions, 0,36 mJ/mm²). Cette étude a montré une supériorité significative du traitement à l'aiguille sur la douleur (EVA à 1 an 1,4 vs 3,3), la fonction (*Simple shoulder test*) et sur la proportion de disparition de la calcification (72 versus 42 %) à la fin du suivi [21]. Une méta-analyse en réseau récente a inclus les résultats d'efficacité des principales études randomisées contrôlées [11,21,22,44–46]. Celle-ci conforte l'efficacité de la ponction-lavage versus les autres thérapeutiques, recommandant donc cette méthode en première intention [47].

La dernière question est celle de la place de la chirurgie par rapport aux thérapeutiques non invasives médicales que sont la PFL et les ondes de choc. Deux études comparant ondes de choc et chirurgie par arthroscopie ne retrouvaient aucune différence entre les 2 techniques [48,49]. De même, la comparaison entre chirurgie et ponction lavage sous radioscopie ne montrait pas de différence avec seulement une disparition plus rapide de la calcification après chirurgie (6 semaines), différence qui n'était plus retrouvée à 4 mois [9]. Une revue systématique récente de 22 études conclue également à l'absence de différence d'efficacité des traitements médicaux et chirurgicaux [50].

5. Conclusion

Au total, au vu des données discutées dans cette revue, une stratégie de prise en charge des patients porteurs de tendinopathies calcifiantes peut être proposée (Fig. 1).

Tout d'abord, un patient symptomatique peut avoir une évolution favorable de sa douleur sur le moyen terme, la douleur signant son évolution vers la résorption spontanée. Si la gêne fonctionnelle est modérée, l'option de la surveillance peut être proposée d'autant que les thérapeutiques telles que les ondes de chocs ou la PFL peuvent être accompagnées d'une recrudescence parfois prolongée des douleurs avant disparition de la calcification. Il nous manque encore des facteurs permettant de prédire l'évolution spontanément favorable de ces calcifications et le délai de cette amélioration attendue, une étude ayant montré que celle-ci était plus probable en cas de calcification floue à la radiographie.

L'infiltration sous-acromiale peut être proposée en deuxième intention, en prévenant le patient d'un risque de récurrence des douleurs à moyen terme lors de l'épuisement de l'effet des corticoïdes. Selon les séries, un tiers des patients ne nécessiteront pas d'autre thérapeutique, justifiant ainsi son utilisation [9,11].

En cas d'échec des thérapeutiques précédentes, il semble actuellement que la ponction lavage soit supérieure aux ondes de choc en ce qui concerne la disparition de la calcification et l'efficacité sur la douleur. Cette conclusion doit être tempérée par le fait qu'elle n'est issue que d'une étude randomisée contrôlée et d'une méta-analyse en réseau [21,47]. Les machines utilisées pour la génération d'ondes de choc ne sont pas disponibles de manière large alors que l'échographie fait maintenant partie de l'équipement de la plupart de rhumatologues. Le geste de PFL ne nécessite pas de matériel spécifique additionnel. De plus, ce geste a lieu en une fois alors que les ondes de choc nécessitent plusieurs séances. Ces avantages pratiques poussent également plus vers la réalisation de la PFL en première intention.

Enfin, la chirurgie est clairement indiquée en 2^e intention, après échec des thérapeutiques précédentes. En effet, il ne semble pas exister de différence entre chirurgie et traitement médical. Elle est associée à un coût supérieur, un arrêt de travail et une rééducation plus longue. Elle doit comporter l'évaluation de l'indication

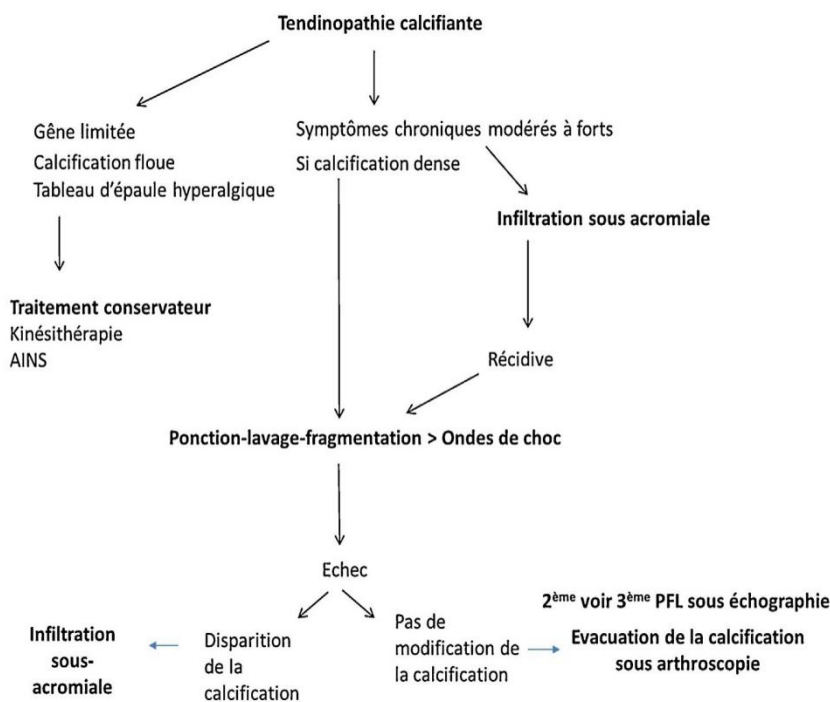


Fig. 1. Proposition d'algorithme pour la prise en charge thérapeutique des tendinopathies calcifiantes.

d'une acromioplastie associée au cas par cas en fonction de la morphologie de l'acromion. La balance bénéfice/risque des différentes thérapeutiques est également importante à prendre en compte dans la décision thérapeutique. Les ondes de chocs sont associées à des effets secondaires locaux. Dans une méta-analyse, des pétéchies étaient ainsi notées dans 62 à 100 % des cas, des douleurs avant ou après le traitement dans 8 à 100 % des cas, dont 20 % sévères nécessitant parfois l'arrêt du traitement [15]. Au cours des PFL, la fréquence des bursites après le geste est estimée à 7 %, on note 2 % de malaises vagues et la capsulite reste un événement rare (0,2 %) [51]. Au cours de la chirurgie, la prévalence des capsulites est plus élevée, estimée entre 1,3 à 18 % des cas [39,52]. De plus, les douleurs après le geste sont plus longues à disparaître qu'avec les traitements médicaux [9].

De nouvelles approches pourraient être développées pour améliorer la prise en charge des patients. Tout d'abord, des thérapeutiques ciblant de manière spécifique l'inflammation induite par les cristaux pourraient être une alternative aux AINS. L'anakinra, par exemple, montré son efficacité dans une étude ouverte incluant 5 patients présentant une épaule aiguë hyperalgique résistante aux AINS [53]. Dans le même esprit, la colchicine va être tentée dans les formes chroniques et résistantes de la maladie (NCT00983177). Ensuite, des questions de techniques se posent encore à propos du geste de PFL. Une étude va évaluer l'intérêt du lavage dans le geste dans l'hypothèse que la fragmentation seule soit suffisante pour induire une élimination de la calcification (NCT02776345). Enfin, des produits permettant de dissoudre de manière plus efficace sont aussi tentés. Des champs entiers de recherche clinique et fondamentale sont donc ouverts et restent à explorer.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Bosworth BM. Calcium deposits in the shoulder and subacromial bursitis. A survey of 12,122 shoulders. *JAMA* 1941;116:2477–82.
- [2] Uthoff HK, Loefer JW. Calcific tendinopathy of the rotator cuff: pathogenesis, diagnosis and management. *J Am Acad Orthop Surg* 1997;5:183–91.
- [3] Uthoff HK, Sarkar K, Maynard JA. Calcifying tendonitis: a new concept of its pathogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1976;118:164–8.
- [4] Oliva F, Via AG, Maffulli N. Physiopathology of intratendinous calcific deposition. *BMC Med* 2012;10:95.
- [5] Le Goff B, Berthelot JM, Guillot P, et al. Assessment of calcific tendonitis of rotator cuff by ultrasonography: comparison between symptomatic and asymptomatic shoulders. *Joint Bone Spine* 2010;77:258–63.
- [6] Rupp S, Seil R, Kohn D. Tendinosis calcarea of the rotator cuff. *Orthopäde* 2000;29:852–67.
- [7] Cho NS, Lee BG, Rhee YG. Radiologic course of the calcific deposits in calcific tendinitis of the shoulder: does the initial radiologic aspect affect the final results? *J Shoulder Elbow Surg* 2010;19:267–72.
- [8] Amstutz HC, Sew Hoy AL, Clarke IC. UCLA anatomic total shoulder arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1981;155:7–20.
- [9] Maugars Y, Varin S, Gouin F, et al. Treatment of shoulder calcifications of the cuff: a controlled study. *Joint Bone Spine* 2009;76:369–77.
- [10] Molé D, Kempf JF, Gleyze P, et al. Résultats du traitement arthroscopique des tendinopathies non rompues de la coiffe des rotateurs. 2^e partie : les calcifications de la coiffe des rotateurs. *Rev Chir Orthop* 1993;79:532e41.
- [11] de Witte PB, Selten JW, Navas A, et al. Calcific tendinitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial of ultrasound-guided needling and lavage versus subacromial corticosteroids. *Am J Sports Med* 2013;41:1665–73.
- [12] Shrivastava SK. Shock wave treatment in medicine. *J Biosci* 2005;30:269–75.
- [13] van der Worp H, van den Akker-Scheek I, van Schie H, et al. ESWT for tendinopathy: technology and clinical implications. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013;21:1451–8.
- [14] Rompe JD, Kirkpatrick CJ, Küllmer K, et al. Dose related effects of shock waves on rabbit tendon Achilles. A sonographic and histological study. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80:546–52.
- [15] Bannuru RR, Flavin NE, Vaysbrot E, et al. High-energy extracorporeal shock-wave therapy for treating chronic calcific tendinitis of the shoulder: a systematic review. *Ann Intern Med* 2014;160:542–9.
- [16] Verstraeten FU, Van den Kleef NJ, Jansen L, et al. High-energy versus low energy extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder: which is superior? A meta-analysis. *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:2816–25.
- [17] Ioppolo F, Tattoli M, Di Sante L, et al. Extracorporeal shock-wave therapy for supraspinatus calcifying tendinitis: a randomized clinical trial comparing two different energy levels. *Phys Ther* 2012;92:1376–85.

- [18] Albert JD, Meadeb J, Guggenbuhl P, et al. High-energy extracorporeal shock-wave therapy for calcifying tendinitis of the rotator cuff: a randomised trial. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89:335–41.
- [19] Daecke W, Kusnierczak D, Loew M. Long-term effects of extracorporeal shockwave therapy in chronic calcific tendinitis of the shoulder. *J Shoulder Elbow Surg* 2002;11:476–80.
- [20] Durst HB, Blatter G, Kuster MS. Osteonecrosis of the humeral head after extracorporeal shock-wave lithotripsy. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84-B:744–6.
- [21] Kim YS, Lee HJ, Kim YV, et al. Which method is more effective in treatment of calcific tendinitis in the shoulder? Prospective randomized comparison between ultrasound guided needling and extracorporeal shock wave therapy. *J Shoulder Elbow Surg* 2014;23:1640–6.
- [22] Krasny C, Enenkel M, Aigner N, et al. Ultrasound-guided needling combined with shock-wave therapy for the treatment of calcifying tendonitis of the shoulder. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87:501–7.
- [23] Aina R, Cardinal E, Bureau NJ, et al. Calcific shoulder tendinitis: treatment with modified US-guided fine-needle technique. *Radiology* 2001;221:455–61.
- [24] Orlandi D, Mauri G, Lacelli F, et al. Rotator Cuff calcific tendinopathy: randomized comparison of us-guided percutaneous treatments by using one or two needles. *Radiology* 2017;285:518–27.
- [25] Jelsing EJ, Maida E, Smith J. A simple technique to restore needle patency during percutaneous lavage and aspiration of calcific rotator cuff tendinopathy. *PMR* 2013;5:242–4.
- [26] Sconfienza LM, Viganò S, Martini C, et al. Double-needle ultrasound-guided percutaneous treatment of rotator cuff calcific tendinitis: tips & tricks. *Skeletal Radiol* 2013;42:19–24.
- [27] Sconfienza LM, Bandirali M, Serafini G, et al. Rotator cuff calcific tendinitis: does warm saline solution improve the short-term outcome of double-needle US-guided treatment? *Radiology* 2012;262:560–6.
- [28] Goossens J, Courbebaisse M, Caudron E, et al. Efficacy of intralesional sodium thiosulfate injections for disabling tumoral calcinosis: two cases. *Semin Arthritis Rheum* 2017;47:451–5.
- [29] Cacchio A, De Blasis E, Desiati P, et al. Effectiveness of treatment of calcific tendinitis of the shoulder by disodium EDTA. *Arthritis Rheum* 2009;61:84–91.
- [30] Re Jr LP, Karzel RP. Management of rotator cuff calcifications. *Orthop Clin North Am* 1993;24:125–32.
- [31] Farin PU. Consistency of rotator-cuff calcifications. Observations on plain radiography, sonography, computed tomography and at needle treatment. *Invest Radiol* 1996;31:300–4.
- [32] Yoo JC, Koh KH, Park WH, et al. The outcome of ultrasound-guided needle decompression and steroid injection in calcific tendinitis. *J Shoulder Elbow Surg* 2010;19:596–600.
- [33] del Cura JL, Torre I, Zabala R, et al. Sonographically guided percutaneous needle lavage in calcific tendinitis of the shoulder: short- and long-term results. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189:W128–34.
- [34] Ogon P, Suedkamp NP, Jaeger M, et al. Prognostic factors in nonoperative therapy for chronic symptomatic calcific tendinitis of the shoulder. *Arthritis Rheum* 2009;60:2978–84.
- [35] Sachs RA, Stone ML, Devine S. Open vs arthroscopic acromioplasty: a prospective, randomized study. *Arthroscopy* 1994;10:248–54.
- [36] Rubenthaler F, Ludwig J, Wiese M, et al. Prospective randomized surgical treatments for calcifying tendinopathy. *Clin Orthop Relat Res* 2003;410:278–84.
- [37] Clement ND, Watts AC, Phillips C, et al. Short-term outcome after arthroscopic bursectomy debridement of rotator cuff calcific tendonopathy with and without subacromial decompression: a prospective randomized controlled trial. *Arthroscopy* 2015;31:1680–7.
- [38] Marder RA, Heiden EA, Kim S. Calcific tendonitis of the shoulder: is subacromial decompression in combination with removal of the calcific deposit beneficial? *J Shoulder Elbow Surg* 2011;20:955–96.
- [39] Verstraeten FU, Fievez E, Janssen L, et al. Surgery for calcifying tendinitis of the shoulder: a systematic review. *World J Orthop* 2017;8:424–30.
- [40] Hofstee DJ, Gosens T, Bonnet M, et al. Calcifications in the cuff: take it or leave it? *Br J Sports Med* 2007;41:832–5.
- [41] Tillander BM, Norlin RO. Change of calcifications after arthroscopic subacromial decompression. *J Shoulder Elbow Surg* 1998;7:213–7.
- [42] Serafini G, Sconfienza LM, Lacelli F, et al. Rotator cuff calcific tendinitis: short-term and 10-year outcomes after two-needle us-guided percutaneous treatment – nonrandomized controlled trial. *Radiology* 2009;252:157–64.
- [43] de Witte PB, Kolk A, Overes F, et al. Rotator Cuff Calcific Tendinitis: Ultrasound-Guided Needling and Lavage Versus Subacromial Corticosteroids: Five-Year Outcomes of a Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med* 2017;45:3305–14. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546517721686>.
- [44] Gerdesmeyer L, Wagenpfeil S, Haake M, et al. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:2573–80.
- [45] Cacchio A, Paoloni M, Barile A, et al. Effectiveness of radial shock-wave therapy for calcific tendinitis of the shoulder: single-blind, randomized clinical study. *Phys Ther* 2006;86:672–82.
- [46] Hsu CJ, Wang DY, Tseng KF, et al. Extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder. *J Shoulder Elbow Surg* 2008;17:55–9.
- [47] Arirachakaran A, Boonard M, Yamaphai S, et al. Extracorporeal shock wave therapy, ultrasound-guided percutaneous lavage, corticosteroid injection and combined treatment for the treatment of rotator cuff calcific tendinopathy: a network meta-analysis of RCTs. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2017;27:381–90.
- [48] Rebuzzi E, Coletti N, Schiavetti S, et al. Arthroscopy surgery versus shock wave therapy for chronic calcifying tendinitis of the shoulder. *J Orthop Traumatol* 2008;9:179–85.
- [49] Rompe JD, Zoellner J, Nafe B. Shock wave therapy versus conventional surgery in the treatment of calcifying tendinitis of the shoulder. *Clin Orthop Relat Res* 2001;387:72–82.
- [50] Louwerens JK, Siersevelt IN, van Noort A, et al. Evidence for minimally invasive therapies in the management of chronic calcific tendinopathy of the rotator cuff: a systematic review and meta-analysis. *J Shoulder Elbow Surg* 2014;23:1240–9.
- [51] Lanza E, Banfi G, Serafini G, et al. Ultrasound-guided percutaneous irrigation in rotator cuff calcific tendinopathy: what is the evidence? A systematic review with proposals for future reporting. *Eur Radiol* 2015;25:2176–83.
- [52] Jacobs R, Debeer P. Calcifying tendinitis of the rotator cuff: functional outcome after arthroscopic treatment. *Acta Orthop Belg* 2006;72:276–81.
- [53] Zufferey P, So A. A pilot study of IL-1 inhibition in acute calcific periarthritis of the shoulder. *Ann Rheum Dis* 2013;72:465–7.

C. Annexe 3

Pain

CLINICAL SCIENCE

Are corticosteroid injections needed after needling and lavage of calcific tendinitis? Randomised, double-blind, non-inferiority trial

Christelle Darrieutort-Laffite,¹ Stephane Varin,² Guillaume Coiffier,³
Jean-David Albert,³ Lucie Planché,⁴ Yves Maugars,¹ Grégoire Cormier,²
Benoit Le Goff¹

Handling editor Josef S Smolen

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-214971>).

¹Department of Rheumatology, CHU Nantes, Nantes, France

²Department of Rheumatology, CHD Vendée, La Roche sur Yon, France

³Department of Rheumatology, CHU de RENNES, Rennes, France

⁴Biometrics and Statistic Platform, CHU Nantes, Nantes, France

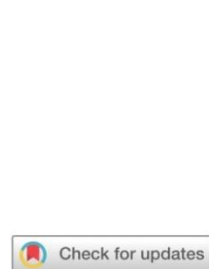
Correspondence to

Pr Benoit Le Goff,
Rheumatology, CHU Nantes,
Nantes 44000, France;
benoit.legoff@chu-nantes.fr

Received 21 December 2018

Revised 19 March 2019

Accepted 20 March 2019



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

To cite: Darrieutort-Laffite C, Varin S, Coiffier G, et al. *Ann Rheum Dis* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214971

ABSTRACT

Objective Steroid injections are common after an ultrasound-guided puncture and lavage (UGPL) of calcific tendinitis of the rotator cuff. However, steroids may prevent calcification resorption and negatively affect tendon healing. Our study was designed to determine whether saline solution was non-inferior to steroids in the prevention of acute pain reactions in the week following UGPL.

Methods This was a randomised, double-blinded, controlled non-inferiority trial with 12-month follow-up. We included 132 patients (66 in each group) with symptomatic calcification measuring more than 5 mm. Patients received 1 mL of saline or steroid (methylprednisolone 40 mg) in the subacromial bursa at the end of UGPL. Primary outcome was the maximal pain during the week following the procedure with a prespecified non-inferiority margin of 10 mm (0–100 visual analogue scale). Secondary outcomes included pain at rest and during activity, function (disabilities of the arm, shoulder and hand score) and radiological evolution of the calcification over the 12-month follow-up.

Results The estimated mean difference in the first week's maximal pain between these two groups was 11.76 (95% CI 3.78 to 19.75). Steroids significantly improved VAS pain at rest and during activities, as well as function at 7 days and 6 weeks. They did not change the rate of calcification resorption, which occurred in 83% and 74% of patients at 12 months in the saline and steroid groups.

Conclusion Non-inferiority of saline when compared with steroids could not be established. However, steroid injection improved pain in the 6 weeks following the procedure, and function in the 3 months after, with no significant effect on calcification resorption.

Trial registration number NTC02403856.

INTRODUCTION

Calcific tendinitis of the rotator cuff is one of the most common causes of shoulder conditions, affecting about 10%–42% of patients referred for a painful shoulder.^{1–4} Ultrasound-guided percutaneous lavage (UGPL or barbotage or irrigation) of calcific tendinopathy is indicated when conservative treatments (physiotherapy and non-steroidal anti-inflammatory drugs [NSAIDs]) have failed.⁵ A recent network meta-analysis has shown that

Key messages**What is already known about this subject?**

- Steroid injections are common after an ultrasound-guided puncture and lavage (UGPL) of calcific tendinitis of the rotator cuff.
- Steroids may prevent calcification resorption and negatively affect tendon healing.

What does this study add?

- Steroid injection improved pain in the 6 weeks following the procedure, and function in the 3 months after.
- Steroids have no significant effect on calcification resorption.
- Non-inferiority of saline when compared with steroids could not be established.

How might this impact on clinical practice or future developments?

- This study supports the use of steroids after puncture and lavage (UGPL) of calcific tendinitis of the rotator cuff.

UGPL may be the treatment of choice for calcific tendinopathy compared with other non-surgical options, such as extracorporeal shock wave therapy or subacromial bursa (SAB) steroid injections.⁶ Arthroscopic removal of the calcific deposit is considered to be a second-line therapy.⁷

Steroids are routinely injected into the SAB after UGPL to prevent the acute pain induced by the procedure. In a recent systematic review, Lanza *et al*⁸ found that this injection was performed in 14 out of the 15 studies they included in their analysis. However, certain authors argue that this injection may also have some deleterious effects. It has been shown both in vivo and in vitro that steroids may negatively affect the healing process of the tendon.⁹ They are known to lower the local immune response, potentially favouring the occurrence of local infections with a recently published case report of SAB infection following UGPL.¹⁰ Finally, steroids may prevent the inflammatory reaction crucial to the disappearance of the calcific deposit after the procedure.¹¹ Of note, all these potential harms remain hypothetical

Pain

and we lack large prospective series of patients treated with UGPL to better evaluate their prevalence.

It is therefore important to assess the benefit–risk balance of administering steroid injections after UGPL. Our hypothesis was that pain after the procedure would not be significantly worse without steroid injections. However, the absence of steroid injections may have significant advantages, such as a reduction in both tendon damage and the risk of infection, as well as accelerating the disappearance of the calcific deposit. Non-inferiority trials are usually chosen to determine whether a new treatment/procedure is not worse than a reference treatment on the premise that it has some other advantages such as reduced cost, less invasiveness, fewer adverse effects or greater ease of administration.¹² We thus conducted a randomised, double-blinded, controlled non-inferiority trial comparing UGPL performed with or without subacromial corticosteroid injection.

METHODS

Design overview

We conducted a 12-month double-blinded, controlled, multicentric, non-inferiority trial comparing UGPL performed with or without subacromial corticosteroid injections. All participating patients were informed about the trial and signed informed consent forms. No significant changes were made after trial commencement (ClinicalTrials.gov).

Setting and participants

The study was performed in three centres in France (Nantes, La Roche-sur-Yon and Rennes). Eligibility was assessed during the screening visit after clinical, ultrasound (US) and X-ray evaluation of the affected shoulder. Eligible patients were aged 18 years or older, reported pain in the shoulder for more than 3 months with worsening of symptoms with activities above shoulder level; had at least one of the three following impingement positive clinical tests (Yocum, Hawkins and Neer); presented a calcification >5 mm in size on the standard anteroposterior radiographs; and were able and willing to give consent and adhere to the study protocol. Exclusion criteria were other shoulder diseases (glenohumeral or acromioclavicular osteoarthritis, rotator cuff tear detected on the initial US evaluation, rheumatoid arthritis and frozen shoulder); previous percutaneous or surgical irrigation of the same calcification; SAB steroid injection in the previous month; type C calcification on X-ray according to Molé's classification¹³ (type A: well defined, dense and homogeneous; type B: well defined, dense but multiple/polylobular; type C: ill defined, non-homogeneous; type D: at tendon insertion/enthesopathy) as this type of calcification is associated with calcification resorption and a favourable spontaneous outcome¹⁴; and contraindication for the use of NSAIDs or paracetamol/acetaminophen.

Randomisation and intervention

Patients were randomly assigned to either steroids (reference) or saline (experimental) groups. Center-stratified block-permuted randomisation (1:1) was computer generated (CSoN-line). Syringes were prepared in a different room by a nurse and covered with a large sticking plaster to prevent the patient and the investigator from knowing which product was injected. All parties remained blinded to treatment allocation throughout the trial.

Patients were treated with a US-guided single needle technique. A 21 G paediatric spinal needle was used for the

procedure to prevent the needle from being clogged by calcific debris.¹⁵ When backflow of calcific material could be identified in the syringe, lavage of the deposit was performed with saline solution until the backflow became clear. At the end of the procedure, patients received a blinded injection of either 1 mL (40 mg) of methylprednisolone acetate or 1 mL of saline solution into the SAB depending on their group allocation. Patients were systematically treated with diclofenac (75 mg LP twice daily) and paracetamol (1000 mg, four times a day) for 48 hours, and then only if needed in the five following days. Routine use of the shoulder was allowed without restriction and all patients had 1 week off work.

Outcomes and follow-up

Patients were seen at the rheumatology clinic at screening, baseline, 7 days, 3 months and 12 months. Additional phone calls were made after 4 days, 6 weeks and 6 months to record any side effects and to remind patients to fill in their VAS for pain and their disabilities of the arm, shoulder and hand (DASH scores) and post them back to the investigator. Data were collected using standardised case report forms.

Primary outcome was the maximal pain experienced by the patient in the 7 days following the procedure.¹⁶ For this purpose, patients were given a booklet and had to fill in a week-long daily diary that asked them to rate their worst pain intensity on a 0–100 visual analogue scale (VAS) (0=no pain; 100=worst pain imaginable). Secondary outcomes were: (1) average pain at rest and during activities in the last 48 hours on a 0–100 NRS; (2) shoulder range of motion; (3) DASH score¹⁷; (4) surface of the calcific deposit evaluated on X-ray at baseline, 7 days, 3 months and 12 months using a semi-quantitative evaluation as follows: no change or minimal changes; decrease in size of the calcification of less than 50%; decrease in the calcification of between 50% and 90%; and a more than 90% decrease in size or disappearance of the calcification. X-ray were read in each centre by the physician in charge of the patient, blinded from the treatment allocation and in known time sequence. Occurrence of adverse events, including infection and tendon tear, was recorded at each visit throughout the study.

Statistical analysis

The study was designed and powered to detect whether UGPL performed without steroid injection was non-inferior for the primary outcome (maximal VAS of pain during the 7 days after the procedure) with regard to the same procedure performed with steroid injections. The non-inferiority margin was prespecified at 10 mm by choosing the minimal clinically important difference in the context of shoulder pain.¹⁸ The sample size of 136 patients was calculated to be enough (with a one-sided 97.5% CI and 80% power) to establish non-inferiority. The sample size calculation allowed for 5% loss to follow-up. For primary outcome, estimation of the 95% CI in the difference between the two groups was assessed using a mixed linear model taking into account centre as random effect. Non-inferiority would be accepted if the mean difference and the upper limit of this CI was less than the non-inferiority margin set at 10 mm. The analysis of non-inferiority was based both on the modified intent to treat and on per protocol populations. If the lower bound of the CI of the difference is greater than zero, saline would be considered significantly worse than steroids. Evolution in maximal pain during the 7 days after the procedure, the VAS at rest and during daily

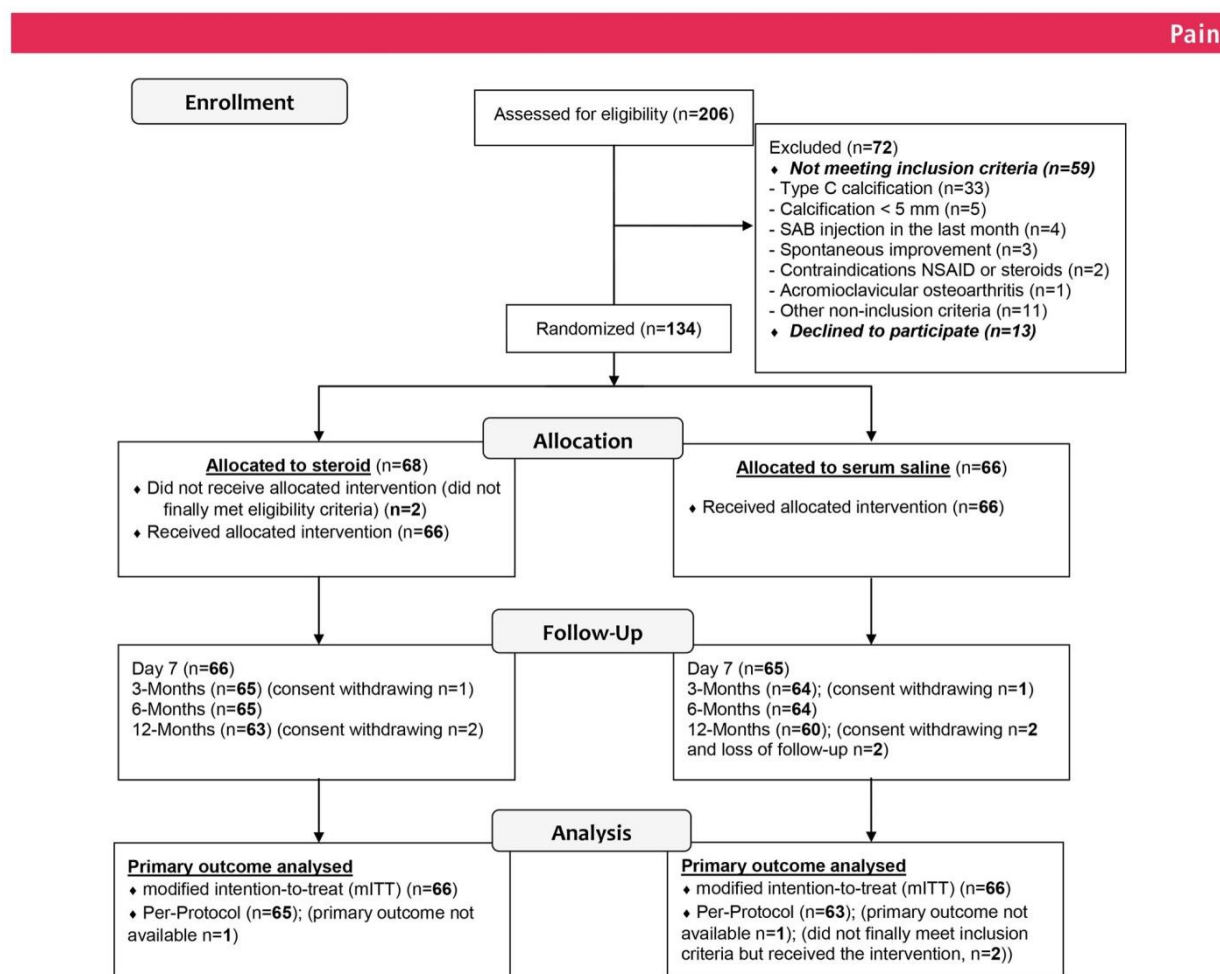


Figure 1 CONSORT flow chart. CONSORT, Consolidated Standards of Reporting Trials; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; SAB, subacromial bursa.

activities and the DASH score were compared between the two groups using a similar linear mixed model analysis. Resorption of the calcification was estimated in the two groups at 3 months and 12 months. Missing data for the primary outcome were managed as followed: if the pain was recorded from baseline to at least day 3, then the maximal pain was collected during this period. In the other cases, maximal VAS was imputed as a result of multiple imputations. Centre group and pain at baseline were included in the imputation model. Five data sets were imputed. If not specified, results are given as mean (95% CI).

RESULTS

Study population

Overall, 134 patients (65%) were randomised (figure 1). No patient was excluded because of tendon tear. Two randomised patients in the steroid group did not receive the procedure (no calcification but enthesophyte on X-ray for one patient; type C calcification for the other) and were not included in the modified intention to treat analysis (mITT) analysis. Sixty-five and 63 patients in the steroid and saline groups, respectively, were included in the per-protocol analysis. Most of the participants completed the 12-month follow-up (63 [95%] in the steroid group and 60 [90%] in the saline group). The trial stopped

in March 2018 after the 12-month follow-up visit of the last patient.

Baseline characteristics were balanced across treatment groups (table 1). They were mainly female (n=69, 67.4%), mean age 49.8 years (SD $\pm$ 9.7). Mean symptom duration was 32 months ($\pm$ 37.9). The tendon treated was most commonly the supraspinatus (n=114; 86.4%), and the calcification was type A in 54 cases (40.9%). All procedures were free from any immediate complications except for mild vagal reactions occurring in 12 patients (9%). The lavage was shortened in two cases per group (3%) because of a vasovagal reaction, but the patients still received the allocated intervention.

Primary outcome

Mean maximal pain during the first week was 71.5 (63.9–79.2) in the saline group versus 59.8 (52.2–67.4) in the steroid group in the mITT population and 72.7 (65.4–79.99) in the saline group versus 60.01 (52.8–67.21) in the steroid group in the per-protocol population (figure 2). The estimated mean difference between these two groups was 11.76 (3.78–19.75) in the mITT population and 12.69 (5.59–19.79) in the per-protocol population (table 2). As the mean difference was greater than 10 mm, with a lower bound of the 95% confidence below this prespecified margin, non-inferiority

Pain

Table 1 Demographic and baseline characteristics of the patients included in the mITT population

Characteristics	Total (n=132)	Steroid (n=66)	Control (n=66)
Mean age (SD)	49.8 (9.7)	47.3 (9.2)	52.2 (9.5)
Sex, female, n (%)	89 (67.4)	49 (74.2)	40 (60.6)
Physical occupational activities, n (%)	55 (42.6)	29 (44.6)	26 (40.6)
Currently off work, n (%)	31 (25.4)	14 (23)	17 (27.9)
Previous SAB steroid injection, n (%)	84 (63.6)	45 (68.2)	39 (59.1)
Affected side, right/left, n	79/53	35/31	44/22
Duration of symptoms, month (SD)	32.4 (37.9)	30.8 (34.4)	34.0 (41.3)
VAS (at rest), 0–100 mm, mean (SD)	32.2 (25.1)	32.3 (24.5)	32 (25.9)
VAS (at motion), 0–100 mm, mean (SD)	72 (16.2)	69.8 (18.3)	70.2 (14)
Nocturnal pain, yes, n (%)	108 (81.8)	53 (80.3)	55 (83.3)
DASH score, mean (SD)	46.2 (15.6)	48.6 (15.7)	43.8 (15.1)
X-ray			
Tendons affected			
Supraspinatus, n (%)	114 (86.4)	56 (84.8)	58 (87.9)
Infraspinatus, n (%)	12 (9.1)	7 (10.6)	5 (7.6)
Subscapularis, n (%)	6 (4.5)	3 (4.5)	3 (4.5)
Largest calcification size, mm (SD)	17.4±7.4	17.1±6.3	17.7±8.4
Molè classification (13)			
Type A, n (%)	54 (40.9)	24 (36.4)	30 (45.5)
Type B, n (%)	78 (59.1)	42 (63.6)	36 (54.5)
Ultrasound			
Ultrasound appearance			
Arc shaped with acoustic shadowing, n (%)	72 (54.5)	34 (51.5)	38 (57.5)
Fragmented with acoustic shadowing, n (%)	37 (28)	23 (34.8)	14 (21.2)
Fragmented without acoustic shadowing, n (%)	11 (8.3)	3 (4.5)	8 (12.1)
Nodular, n (%)	12 (9)	6 (9)	6 (9)
Bursitis, n (%)	37 (28)	18 (27)	19 (29)
Positive Doppler signal, n (%)	28 (21.2)	13 (19.7)	15 (22.7)
Grade 1, n (%)	21 (75)	9 (69.2)	12 (80)
Grade 2, n (%)	7 (25)	4 (30.8)	3 (20)
Grade 3, n (%)	0	0	0
Ultrasound-guided puncture and lavage			
Consistence of the calcific deposit, hard, n (%)	54 (41.5)	29 (45)	25 (34)
Aspiration of calcific deposit, yes, n (%)	107 (81)	53 (80)	54 (82)

DASH, disabilities of the arm, shoulder and hand; SAB, subacromial bursa; VAS, visual analogue scale; mITT, modified intention to treat.

was not established. However, as the lower bound remained above 0, we can conclude that saline was significantly inferior compared with steroids.

Secondary outcomes

Evolution in maximal daily pain during the first week is shown in [figure 3](#). Maximal pain decreased from 73.97 (64.29; 83.66)

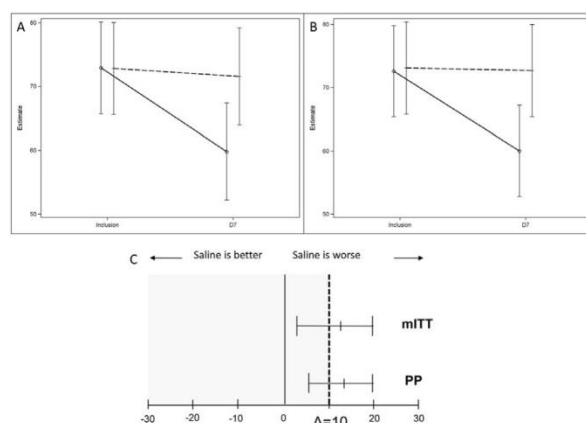


Figure 2 (A) Maximal pain experienced by the patient during the 7 days following UGPL in the mITT (A) and per protocol population (B). (C) Non-inferiority plot of steroid versus serum saline injections regarding the difference in maximal pain during the 7 days following UGPL (primary outcome). The non-inferiority margin is shown with dotted bold lines. The lower limit for each CI crosses the prespecified non-inferiority margin. Results of the mITT and per-protocol analysis are presented. Error bars represent the 95% CIs. mITT, modified intention to treat analysis; UGPL, ultrasound-guided percutaneous lavage.

and 73.95 (64.28; 83.63) before the procedure to 32.71 (22.89; 42.53) and 20.37 (10.62; 30.13) 7 days after UGPL in the saline and steroid groups, respectively (see online supplementary table S1). Linear mixed model analysis demonstrated a significant difference between the two groups in favour of steroids ($p<0.001$). Evolution in pain at rest and during daily activity over the 12-month follow-up is shown in [figure 4](#) and summarised in [table 2](#). After an initial decrease at day 7, pain at rest remained stable in the steroid group, whereas it increased slightly at 6 weeks in the saline group. It eventually dropped significantly in the two groups at 12 months. Pain during activities significantly decreased in the two groups at day 7 and 6 weeks with a significant difference in favour of the steroid group at these two time points ($p<0.001$). After stabilisation at 3 months, the pain gradually decreased in the two groups up to 12 months. The DASH score followed the same pattern with a significant decrease in the steroid group at 6 weeks and 3 months compared with the saline with a gradual decrease in the two groups up to 12 months ([table 2](#)). Evolution of shoulder range of motion in the two groups is available as supplementary data (see online supplementary table S2).

Radiological changes at 7 days, 3 months and 12 months are summarised in [table 3](#). No difference was observed between the two groups ($p=0.28$, generalised linear model adjusted for the centre and time).

During follow-up, six patients underwent a further UGPL (two in the steroid and four in the saline groups, a median (Q1–Q3) 4.8 (2.8–11.9) and 4.1 (3.3–4.7) months after inclusion, respectively). Sixteen patients (6 in the steroid and 10 in the saline groups) needed surgery on their shoulder a median (Q1–Q3) 7.5 (4.1–11.2) and 6.7 (5.8–7.5) months after inclusion. One case of frozen shoulder occurred in the saline group, but no case of infection or tendon tear was recorded.

DISCUSSION

Our study was a non-inferiority randomised trial designed to assess the usefulness of steroid injection after UGPL of rotator

Table 2 Estimated treatment differences in primary and secondary outcomes during the 12-month follow-up

	Steroids		Saline		
Analysis and follow-up	Patients	Mean score (95% CI)	Patients	Mean score (95% CI)	Mean difference (95% CI)
Primary outcome					
Maximal pain during the first week					
mITT population	n=66	59.8 (52.2 to 67.4)	n=66	71.5 (63.9 to 79.2)	11.76 (3.8 to 19.7)
Per-protocol population	n=65	60.01 (52.80 to 67.21)	n=63	72.70 (65.41 to 79.99)	12.69 (5.59 to 19.79)
Secondary outcome					
VAS activity					
Inclusion	n=66	72.78 (61.97 to 83.59)	n=66	73.26 (62.44 to 84.07)	0.48 (-8.51 to 9.46)
Day 7	n=65	27.39 (16.58 to 38.20)	n=66	49.06 (38.21 to 59.92)	21.67 (12.65 to 30.69)
W6	n=64	33.05 (22.09 to 44.01)	n=65	52.28 (41.33 to 63.23)	19.23 (9.92 to 28.54)
M3	n=64	44.03 (33.16 to 54.89)	n=65	51.91 (40.99 to 62.82)	7.88 (-1.28 to 17.04)
M6	n=64	38.49 (27.34 to 49.64)	n=65	40.39 (29.10 to 51.67)	1.90 (-7.99 to 11.80)
M12	n=60	27.57 (16.67 to 38.47)	n=63	31.14 (20.12 to 42.17)	3.57 (-5.75 to 12.89)
VAS at rest					
Inclusion	n=66	35.62 (23.47 to 47.77)	n=66	35.59 (23.44 to 47.75)	-0.03 (-8.17 to 8.11)
Day 7	n=65	14.78 (2.63 to 26.93)	n=66	26.07 (13.89 to 38.26)	11.29 (3.12 to 19.47)
W6	n=64	26.33 (14.07 to 38.59)	n=65	43.04 (30.79 to 55.29)	16.71 (8.28 to 25.15)
M3	n=64	21.55 (9.36 to 33.75)	n=65	28.16 (15.93 to 40.38)	6.60 (-1.70 to 14.90)
M6	n=64	31.63 (19.23 to 44.03)	n=65	31.59 (19.09 to 44.10)	-0.04 (-9.00 to 8.93)
M12	n=60	12.55 (0.33 to 24.77)	n=63	12.20 (-0.11 to 24.51)	-0.35 (-8.79 to 8.09)
DASH score					
Inclusion	n=66	50.94(42.70 to 59.19)	n=66	46.12 (37.88 to 54.36)	-4.82 (-11.7 to 2.06)
W6	n=64	30.32(22.04 to 38.61)	n=65	42.26 (33.95 to 50.58)	11.94 (4.92 to 18.96)
M3	n=64	31.95(23.64 to 40.26)	n=65	39.91 (31.60 to 48.23)	7.96 (0.91 to 15.01)
M6	n=64	33.02(24.60 to 41.43)	n=65	33.36 (24.95 to 41.77)	0.35 (-6.92 to 7.61)
M12	n=60	23.65(15.39 to 31.91)	n=63	22.33 (13.95 to 30.71)	-1.32 (-8.38 to 5.74)

DASH, disabilities of the arm, shoulder and hand; M, month; VAS, visual analogue scale; W, week; miTT, modified intention to treat analysis.

cuff calcifications. The potential harm caused by steroids with regard to tendon healing, as well as their negative effects on calcific deposit resorption, raised questions about their systematic use in daily practice. The non-inferiority of saline compared

with steroids in the prevention of acute pain reactions after UGPL could not be established. On the contrary, saline turned out inferior. Indeed, the lower bound of the 95% CI was above zero for the primary outcome as for other secondary outcomes such as pain or function. Whether that is clinically relevant is still under undetermined, as the lower boundary of the 95% CI falls within the prespecified non-inferiority margin selected for its clinical relevance. Finally, there was no difference in the radiographic evolution of the calcification at 7 days, 3 months and 12 months with the same rate of resorption in both groups.

No study has demonstrated the usefulness of steroid injections on the prevention of pain following UGPL. Our study is the first to focus on pain in the 7 days following UGPL. We observed a decrease in pain in both groups but with a significant difference in favour of steroids. Interestingly, there was no exacerbation of pain in the saline group. This shows that UGPL could also be performed without steroids if needed (contraindications, diabetes and patients' will) without an increased risk of pain exacerbation. Of note, our patients were systematically treated with NSAIDs the 2 days following the procedure, then again, if needed, during the first week. This treatment may have decreased the risk of pain exacerbation and should be given in case of no steroid use.

We observed a significant difference in pain intensity in the first 6 weeks and improvement in shoulder function in the steroid group during the 3 months following the procedure. Interestingly, a trend towards an exacerbation of pain was observed at 6 weeks in the saline and in the steroid group. An increase in pain after UGPL has already been described in other studies.^{5 19} del

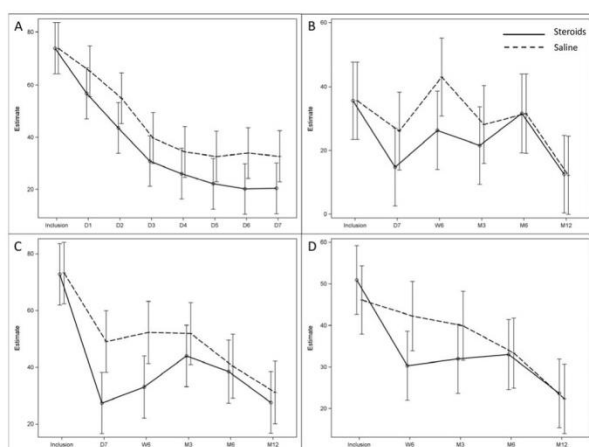


Figure 3 Evolution in maximal daily pain during the 7 days following UGPL (A) ($p<0.001$; linear mixed model analysis). Evolution in the VAS for pain at rest (B) and during activity (C) plus (D) the DASH score in the saline and steroid groups over the 12-month follow-up. Error bars represent the 95% CIs. DASH, disabilities of the arm, shoulder and hand; UGPL, ultrasound-guided percutaneous lavage; VAS, visual analogue scale.

Pain

Table 3 Radiological outcome at 7 days, 3 months and 12 months

	Patient, n	Steroids	Patient, n	Saline
Day 7				
No or minor changes, n (%)	65	24 (36.9)	63	17 (27.0)
Less than 50% decrease in size, n (%)		22 (33.8)		23 (36.5)
Between 50% and 90% decrease in size, n (%)		14 (21.5)		16 (25.4)
Disappearance or more than 90% decrease in size, n (%)		5 (7.7)		7 (11.1)
Month 3				
No or minor changes, n (%)	63	10 (15.9)	60	10 (16.7)
Less than 50% decrease in size, n (%)		14 (22.2)		11 (18.3)
Between 50% and 90% decrease in size, n (%)		10 (15.9)		15 (25.0)
Disappearance or more than 90% decrease in size, n (%)		29 (46.0)		24 (40.0)
Month 12				
No or minor changes, n (%)	62	4 (6.5)	59	2 (3.4)
Less than 50% decrease in size, n (%)		3 (4.8)		1 (1.7)
Between 50% and 90% decrease in size, n (%)		9 (14.5)		7 (11.9)
Disappearance or more than 90% decrease in size, n (%)		46 (74.2)		49 (83.1)

Cura *et al* showed that this recurrence occurred after a mean of 15 weeks (5–28 weeks) and lasted for a mean of 6 weeks (2–20 weeks). It is thought to be associated with the resorption of the calcification induced by the puncture of the calcific deposit. In our study, although steroids decreased the intensity of the pain, they did not prevent this painful phase. Strategies making possible faster removal of the calcific deposit may be of interest for preventing or shortening this recurrence of pain.

We observed the same rate of calcification resorption at 7 days, 3 months and 12 months after UGPL in both groups. We found that 95% and 89% of patients had a more than 50% decrease in the size of their calcification at 12 months in the saline and steroid groups, respectively. This shows that steroids do not interfere with the mechanisms leading to calcification resorption. Although the inflammatory reaction induced by apatite crystals is thought to be important, one injection of steroids in the SAB seems to have no significant effect on this process. This is of importance as some authors argued against steroid injections because of their potential negative effect on calcification resorption.¹¹

Our study has several limitations. We hypothesised that steroid injections were not necessary after the procedure and could be harmful to tendon healing and the resorption of the calcification. For this purpose, we designed a non-inferiority trial recommended when a new procedure is thought to be equivalent to the reference and may have other advantages.²⁰ We were unable to confirm this hypothesis as non-inferiority could not be established. We chose a stringent non-inferiority margin of 10 mm,

corresponding to the minimal relevant clinical threshold associated with an improvement in shoulder pain.¹⁸ However, no data are available to define what minimal threshold is clinically meaningful in the context of acute postprocedural pain. Another limitation is that steroids or saline were injected under real-time US guidance in the SAB, glucocorticoid (GC) injections are often seen in the US as hyperechoic effusions that could have been differentiated from the saline by the investigator. However, the air contained in the syringes also leads to hyperechoic artefacts when injected. Therefore, it was not possible to guess whether steroids or saline were injected. Finally, tendon tear and calcification can coexist. This has been described in 4% by US to 28% of the patients with arthrography.²¹ We excluded patients with tendon tear to avoid confounding as pain could be due to the tear or the calcific deposit itself. In our study, no patient has been found with both diseases. This can be explained by the young age of our patients or the lesser sensitivity of US. Our study also has several strengths. The double-blinded design decreased the risk of placebo or Hawthorne effects, known to influence pain assessment. The long-term follow-up and the low number of patients lost to follow-up allowed us to study the long-term effect of steroids on pain, function and also radiographic evolution.

Overall, our study shows that steroids are beneficial after UGPL, decreasing pain and disability in the short term without any effect on the rate of calcification resorption. Our findings support the current practice of steroid injections in patients with calcification of the rotator cuff.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr Claire Daien and Pr Alain Sarau for their help in the preparation of the final manuscript.

Contributors CD-L designed the study, included patients, analysed the data and wrote the manuscript. SV, GC, J-DA, YM and GC included patients and analysed the data. LP designed the study and analysed the data. BLG designed the study, included patients, analysed the data and wrote the manuscript.

Funding The study received funding and support from the French Ministry of Health PHRC-i (Programme Hospitalier de Recherche inter-régional).

Disclaimer The funding organisations had no role in how the study was conducted, manuscript preparation or the decision to submit the manuscript for publication.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Ethics approval The research protocol was approved by the local ethics committee (CPP) and the French National Agency for Medicines and Health Products Safety (Registration number RC15_0019).

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Data sharing statement Data are available upon reasonable request.

REFERENCES

- Farin PU, Jaroma H. Sonographic findings of rotator cuff calcifications. *J Ultrasound Med* 1995;14:7–14.
- Friedman MS. Calcified tendinitis of the shoulder. *Am J Surg* 1957;94:56–61.
- Harmon PH. Methods and results in the treatment of 2,580 painful shoulders, with special reference to calcific tendinitis and the frozen shoulder. *Am J Surg* 1958;95:527–44.
- Louwerens JKG, Sierevelt IN, van Hove RP, *et al*. Prevalence of calcific deposits within the rotator cuff tendons in adults with and without subacromial pain syndrome: clinical and radiologic analysis of 1219 patients. *J Shoulder Elbow Surg* 2015;24:1588–93.
- de Witte PB, Selten JW, Navas A, *et al*. Calcific tendinitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial of ultrasound-guided needling and lavage versus subacromial corticosteroids. *Am J Sports Med* 2013;41:1665–73.
- Airachakaran A, Boonard M, Yamaphai S, *et al*. Extracorporeal shock wave therapy, ultrasound-guided percutaneous lavage, corticosteroid injection and combined treatment for the treatment of rotator cuff calcific tendinopathy: a network meta-analysis of RCTs. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 2017;27:381–90.
- Louwerens JKG, Veltman ES, van Noort A, *et al*. The effectiveness of high-energy extracorporeal shockwave therapy versus ultrasound-guided Needling versus arthroscopic surgery in the management of Chronic calcific rotator cuff tendinopathy: a systematic review. *Arthroscopy* 2016;32:165–75.

- 8 Lanza E, Banfi G, Serafini G, *et al.* Ultrasound-guided percutaneous irrigation in rotator cuff calcific tendinopathy: what is the evidence? A systematic review with proposals for future reporting. *Eur Radiol* 2015;25:2176–83.
- 9 Maman E, Yehuda C, Pritsch T, *et al.* Detrimental effect of repeated and single subacromial corticosteroid injections on the intact and injured rotator cuff: a biomechanical and imaging study in rats. *Am J Sports Med* 2016;44:177–82.
- 10 Sconfienza LM, Randelli F, Sdao S, *et al.* Septic bursitis after ultrasound-guided percutaneous treatment of rotator cuff calcific tendinopathy. *Pm R* 2014;6:746–8.
- 11 Re LP, Karzel RP. Management of rotator cuff calcifications. *Orthop Clin North Am* 1993;24:125–32.
- 12 Schumi J, Wittes JT. Through the looking glass: understanding non-inferiority. *Trials* 2011;12.
- 13 Molé D, Kempf JF, Gleyze P, *et al.* [Results of endoscopic treatment of non-broken tendinopathies of the rotator cuff. 2. Calcifications of the rotator cuff]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 1993;79:532–41.
- 14 Rupp S, Seil R, Kohn D. [Tendinosis calcarea of the rotator cuff]. *Orthopade* 2000;29:852–67.
- 15 Jelsing EJ, Maida E, Smith J. A simple technique to restore needle patency during percutaneous lavage and aspiration of calcific rotator cuff tendinopathy. *Pm R* 2013;5:242–4.
- 16 Gupta A, Kaur K, Sharma S, *et al.* Clinical aspects of acute post-operative pain management & its assessment. *J Adv Pharm Technol Res* 2010;1:97–108.
- 17 Dubert T, Voche P, Dumontier C, *et al.* [The DASH questionnaire. French translation of a trans-cultural adaptation]. *Chir Main* 2001;20:294–302.
- 18 Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, *et al.* Measures of adult pain: visual analog scale for pain (VAS pain), numeric rating scale for pain (NRS pain), McGill pain questionnaire (MPQ), short-form McGill pain questionnaire (SF-MPQ), chronic pain grade scale (CPGS), short Form-36 bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and measure of intermittent and constant osteoarthritis pain (ICOAP). *Arthritis Care Res* 2011;63:S240–S252.
- 19 del Cura JL, Torre I, Zabala R, *et al.* Sonographically guided percutaneous needle lavage in calcific tendinitis of the shoulder: short- and long-term results. *AJR Am J Roentgenol* 2007;189:W128–W134.
- 20 Piaggio G, Elbourne DR, Pocock SJ, *et al.* Reporting of noninferiority and equivalence randomized trials: extension of the CONSORT 2010 statement. *JAMA* 2012;308:2594–604.
- 21 Hsu HC, Wu JJ, Jim YF, *et al.* Calcific tendinitis and rotator cuff tearing: a clinical and radiographic study. *J Shoulder Elbow Surg* 1994;3:159–64.

Références

1. Huegel J, Williams AA, Soslowsky LJ. Rotator cuff biology and biomechanics: a review of normal and pathological conditions. *Curr Rheumatol Rep.* janv 2015;17(1):476.
2. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* déc 2000;10(6):312- 20.
3. Subramanian A, Schilling TF. Tendon development and musculoskeletal assembly: emerging roles for the extracellular matrix. *Dev Camb Engl.* 15 déc 2015;142(24):4191- 204.
4. Sato N, Taniguchi T, Goda Y, Kosaka H, Higashino K, Sakai T, et al. Proteomic Analysis of Human Tendon and Ligament: Solubilization and Analysis of Insoluble Extracellular Matrix in Connective Tissues. *J Proteome Res.* 02 2016;15(12):4709- 21.
5. Asahara H, Inui M, Lotz MK. Tendons and Ligaments: Connecting Developmental Biology to Musculoskeletal Disease Pathogenesis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* sept 2017;32(9):1773- 82.
6. Magne D, Bougault C. What understanding tendon cell differentiation can teach us about pathological tendon ossification. *Histol Histopathol.* août 2015;30(8):901- 10.
7. Turkel SJ, Panio MW, Marshall JL, Girgis FG. Stabilizing mechanisms preventing anterior dislocation of the glenohumeral joint. *J Bone Joint Surg Am.* oct 1981;63(8):1208- 17.
8. Moor BK, Bouaicha S, Rothenfluh DA, Sukthankar A, Gerber C. Is there an association between the individual anatomy of the scapula and the development of rotator cuff tears or osteoarthritis of the glenohumeral joint?: A radiological study of the critical shoulder angle. *Bone Jt J.* juill 2013;95-B(7):935- 41.
9. Archambault JM, Jelinsky SA, Lake SP, Hill AA, Glaser DL, Soslowsky LJ. Rat supraspinatus tendon expresses cartilage markers with overuse. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* mai 2007;25(5):617- 24.
10. Soslowsky LJ, Thomopoulos S, Tun S, Flanagan CL, Keefer CC, Mastaw J, et al. Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg.* avr 2000;9(2):79- 84.
11. Friedman MS. Calcified tendinitis of the shoulder. *Am J Surg.* juill 1957;94(1):56- 61.
12. Harmon PH. Methods and results in the treatment of 2,580 painful shoulders, with special reference to calcific tendinitis and the frozen shoulder. *Am J Surg.* avr 1958;95(4):527- 44.
13. Farin PU, Jaroma H. Sonographic findings of rotator cuff calcifications. *J Ultrasound Med Off J Am Inst Ultrasound Med.* janv 1995;14(1):7- 14.
14. Louwerens JKG, Sierevelt IN, van Hove RP, van den Bekerom MPJ, van Noort A. Prevalence of calcific deposits within the rotator cuff tendons in adults with and without subacromial pain syndrome: clinical and radiologic analysis of 1219 patients. *J Shoulder Elbow Surg.* oct 2015;24(10):1588- 93.

15. Bosworth BM. Calcium deposits in the shoulder and subacromial bursitis. A survey of 12,122 shoulders. *JAMA*. 1941;116(22):2477- 82.
16. McLaughlin HL. Lesions of the Musculotendinous Cuff of the Shoulder: III. Observations on the Pathology, Course and Treatment of Calcific Deposits. *Ann Surg*. août 1946;124(2):354- 62.
17. Darrieutort-Laffite C. Les rhumatismes à apatite : manifestations cliniques et prise en charge. *RhumatOs*. mai 2018;
18. Speed CA, Hazleman BL. Calcific tendinitis of the shoulder. *N Engl J Med*. 20 mai 1999;340(20):1582- 4.
19. Harvie P, Pollard TCB, Carr AJ. Calcific tendinitis: natural history and association with endocrine disorders. *J Shoulder Elbow Surg*. avr 2007;16(2):169- 73.
20. Grases F, Muntaner-Gimbernat L, Vilchez-Mira M, Costa-Bauzá A, Tur F, Prieto RM, et al. Characterization of deposits in patients with calcific tendinopathy of the supraspinatus. Role of phytate and osteopontin. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. avr 2015;33(4):475- 82.
21. Le Goff B, Berthelot J-M, Guillot P, Glémarec J, Maugars Y. Assessment of calcific tendonitis of rotator cuff by ultrasonography: comparison between symptomatic and asymptomatic shoulders. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. mai 2010;77(3):258- 63.
22. Darrieutort-Laffite C, Blanchard F, Le Goff B. Calcific tendonitis of the rotator cuff: From formation to resorption. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. déc 2018;85(6):687- 92.
23. Uthoff HK. Calcifying tendinitis, an active cell-mediated calcification. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1975;366(1):51- 8.
24. McKendry RJ, Uthoff HK, Sarkar K, Hyslop PS. Calcifying tendinitis of the shoulder: prognostic value of clinical, histologic, and radiologic features in 57 surgically treated cases. *J Rheumatol*. févr 1982;9(1):75- 80.
25. Archer RS, Bayley JI, Archer CW, Ali SY. Cell and matrix changes associated with pathological calcification of the human rotator cuff tendons. *J Anat*. févr 1993;182 (Pt 1):1- 11.
26. Uthoff H, Loehr L. Calcific Tendinopathy of the Rotator Cuff: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *J Am Acad Orthop Surg*. juill 1997;5(4):183- 91.
27. Gohr CM, Fahey M, Rosenthal AK. Calcific tendonitis : a model. *Connect Tissue Res*. 2007;48(6):286- 91.
28. Boskey AL, Bullough PG, Vigorita V, Di Carlo E. Calcium-acidic phospholipid-phosphate complexes in human hydroxyapatite-containing pathologic deposits. *Am J Pathol*. oct 1988;133(1):22- 9.
29. Raggio CL, Boyan BD, Boskey AL. In vivo hydroxyapatite formation induced by lipids. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. oct 1986;1(5):409- 15.
30. Bi Y, Ehrichtiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*. oct 2007;13(10):1219- 27.

31. Zhang J, Wang JH-C. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskelet Disord*. 18 janv 2010;11:10.
32. McBeath R, Edwards RW, O'Hara BJ, Maltenfort MG, Parks SM, Steplewski A, et al. Tendinosis develops from age- and oxygen tension-dependent modulation of Rac1 activity. *Aging Cell*. juin 2019;18(3):e12934.
33. Takeuchi E, Sugamoto K, Nakase T, Miyamoto T, Kaneko M, Tomita T, et al. Localization and expression of osteopontin in the rotator cuff tendons in patients with calcifying tendinitis. *Virchows Arch Int J Pathol*. juin 2001;438(6):612 - 7.
34. Lui PP, Fu S, Chan L, Hung L, Chan K. Chondrocyte phenotype and ectopic ossification in collagenase-induced tendon degeneration. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. févr 2009;57(2):91 - 100.
35. Lui PPY, Maffulli N, Rolf C, Smith RKW. What are the validated animal models for tendinopathy? *Scand J Med Sci Sports*. févr 2011;21(1):3 - 17.
36. O'Brien EJO, Frank CB, Shrive NG, Hallgrímsson B, Hart DA. Heterotopic mineralization (ossification or calcification) in tendinopathy or following surgical tendon trauma. *Int J Exp Pathol*. oct 2012;93(5):319 - 31.
37. Lin X, Huang M, Yin G, Zhang J, Zhang Z, Lai P, et al. Characterization of a Novel Calcific Achilles Tendinopathy Model in Mice: Contralateral Tendinopathy Induced by Unilateral Tenotomy. *Calcif Tissue Int*. 2018;103(6):698 - 707.
38. Liu H, Xu J, Jiang R. Mx-Deficient Mice Exhibit Hedgehog Signaling-Dependent Ectopic Ossification in the Achilles Tendons. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. mars 2019;34(3):557 - 69.
39. Suzuki H, Ito Y, Shinohara M, Yamashita S, Ichinose S, Kishida A, et al. Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotopic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 2016;113(28):7840 - 5.
40. Shukunami C, Takimoto A, Nishizaki Y, Yoshimoto Y, Tanaka S, Miura S, et al. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Sci Rep*. 16 2018;8(1):3155.
41. Sakabe T, Sakai K, Maeda T, Sunaga A, Furuta N, Schweitzer R, et al. Transcription factor scleraxis vitally contributes to progenitor lineage direction in wound healing of adult tendon in mice. *J Biol Chem*. 20 2018;293(16):5766 - 80.
42. Fenwick S, Harrall R, Hackney R, Bord S, Horner A, Hazleman B, et al. Endochondral ossification in Achilles and patella tendinopathy. *Rheumatol Oxf Engl*. avr 2002;41(4):474 - 6.
43. Darrieutort-Laffite C, Le Goff B. Treatment strategy in calcific tendonitis of the rotator cuff. *Rev Rhum Monogr*. avr 2018;85(2):102 - 7.
44. Maugars Y, Varin S, Gouin F, Hugué D, Rodet D, Nizard J, et al. Treatment of shoulder calcifications of the cuff: a controlled study. *Jt Bone Spine Rev Rhum*. juill 2009;76(4):369 - 77.

45. Bannuru RR, Flavin NE, Vaysbrot E, Harvey W, McAlindon T. High-energy extracorporeal shock-wave therapy for treating chronic calcific tendinitis of the shoulder: a systematic review. *Ann Intern Med.* 15 avr 2014;160(8):542- 9.
46. De Conti G, Marchioro U, Dorigo A, Boscolo N, Vio S, Trevisan M, et al. Percutaneous ultrasound-guided treatment of shoulder tendon calcifications: Clinical and radiological follow-up at 6 months(). *J Ultrasound.* déc 2010;13(4):188- 98.
47. Darrieutort-Laffite C, Varin S, Coiffier G, Albert J-D, Planche L, Maugars Y, et al. Are corticosteroid injections needed after needling and lavage of calcific tendinitis? Randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Ann Rheum Dis.* juin 2019;78(6):837- 43.
48. Verstraelen FU, Fievez E, Janssen L, Morrenhof W. Surgery for calcifying tendinitis of the shoulder: A systematic review. *World J Orthop.* 18 mai 2017;8(5):424- 30.
49. Marder RA, Heiden EA, Kim S. Calcific tendonitis of the shoulder: is subacromial decompression in combination with removal of the calcific deposit beneficial? *J Shoulder Elbow Surg.* sept 2011;20(6):955- 60.
50. Golub EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol.* sept 2011;33(5):409- 17.
51. Cui L, Houston DA, Farquharson C, MacRae VE. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. *Bone.* 2016;87:147- 58.
52. Rosenthal AK. Articular cartilage vesicles and calcium crystal deposition diseases. *Curr Opin Rheumatol.* mars 2016;28(2):127- 32.
53. Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, et al. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 mars 1998;95(6):3094- 9.
54. Ea H-K, Nguyen C, Bazin D, Bianchi A, Guicheux J, Reboul P, et al. Articular cartilage calcification in osteoarthritis: insights into crystal-induced stress. *Arthritis Rheum.* janv 2011;63(1):10- 8.
55. Lencel P, Hardouin P, Magne D. Do cytokines induce vascular calcification by the mere stimulation of TNAP activity? *Med Hypotheses.* déc 2010;75(6):517- 21.
56. Zhang K, Asai S, Yu B, Enomoto-Iwamoto M. IL-1 β irreversibly inhibits tenogenic differentiation and alters metabolism in injured tendon-derived progenitor cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 7 août 2015;463(4):667- 72.
57. Li F, Song N, Tombran-Tink J, Niyibizi C. Pigment epithelium-derived factor enhances differentiation and mineral deposition of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio.* déc 2013;31(12):2714- 23.
58. Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derkx P, Uitterlinden AG, et al. The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* sept 2007;21(11):2949- 60.
59. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1.

60. Merle B, Garnero P. The multiple facets of periostin in bone metabolism. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. avr 2012;23(4):1199- 212.
61. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. déc 2000;19(7):615- 22.
62. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Pearcy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. févr 2005;11(1- 2):1- 18.
63. Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest*. oct 1994;94(4):1597- 604.
64. Alves RDAM, Eijken M, Bezstarosti K, Demmers JAA, van Leeuwen JPTM. Activin A suppresses osteoblast mineralization capacity by altering extracellular matrix (ECM) composition and impairing matrix vesicle (MV) production. *Mol Cell Proteomics MCP*. oct 2013;12(10):2890- 900.
65. Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev*. avr 2009;20(2):153- 64.
66. Bargnoux A-S, Morena M, Arnaud J, Cavalier É, Zaoui P, Delanaye P, et al. [Biomarkers of vascular calcifications: the osteoprotegerin/RANK/RANK L axis]. *Ann Biol Clin (Paris)*. juin 2015;73(3):289- 98.
67. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1 mai 1998;12(9):1260- 8.
68. Orita Y, Yamamoto H, Kohno N, Sugihara M, Honda H, Kawamata S, et al. Role of osteoprotegerin in arterial calcification: development of new animal model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. sept 2007;27(9):2058- 64.
69. Ho T-C, Tsai SH, Yeh S-I, Chen S-L, Tung K-Y, Chien H-Y, et al. PEDF-derived peptide promotes tendon regeneration through its mitogenic effect on tendon stem/progenitor cells. *Stem Cell Res Ther*. 3 janv 2019;10(1):2.
70. Valadares ER, Carneiro TB, Santos PM, Oliveira AC, Zabel B. What is new in genetics and osteogenesis imperfecta classification? *J Pediatr (Rio J)*. déc 2014;90(6):536- 41.
71. Homan EP, Rauch F, Grafe I, Lietman C, Doll JA, Dawson B, et al. Mutations in SERPINF1 cause osteogenesis imperfecta type VI. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. déc 2011;26(12):2798- 803.
72. Klinger P, Lukassen S, Ferrazzi F, Ekici AB, Hotfiel T, Swoboda B, et al. PEDF Is Associated with the Termination of Chondrocyte Phenotype and Catabolism of Cartilage Tissue. *BioMed Res Int*. 2017;2017:7183516.
73. He X, Cheng R, Benyajati S, Ma J. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases. *Clin Sci Lond Engl* 1979. juin 2015;128(11):805- 23.
74. Carnagarin R, Elahy M, Dharmarajan AM, Dass CR. Insulin antagonises pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced modulation of lineage commitment of myocytes and heterotrophic ossification. *Mol Cell Endocrinol*. 05 2018;472:159- 66.

75. Wietecha MS, Król MJ, Michalczyk ER, Chen L, Gettins PG, DiPietro LA. Pigment epithelium-derived factor as a multifunctional regulator of wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. sept 2015;309(5):H812-826.
76. Kanemura H, Go MJ, Nishishita N, Sakai N, Kamao H, Sato Y, et al. Pigment epithelium-derived factor secreted from retinal pigment epithelium facilitates apoptotic cell death of iPSC. *Sci Rep*. 2013;3:2334.

Titre: Etude de la composition et des mécanismes de constitution des dépôts calciques dans la tendinopathie calcifiante de la coiffe des rotateurs.

Mots clés : tendinopathie calcifiante, apatite, phosphatase alcaline, chondrocytes hypertrophiques, PEDF

Résumé : La tendinopathie calcifiante est une cause fréquente de douleurs d'épaule. Elle est due à des dépôts d'apatite au sein des tendons de la coiffe. Sa physiopathologie est actuellement peu connue.

L'objectif de cette thèse était de déterminer les mécanismes impliqués dans la constitution des dépôts et les facteurs régulant cette minéralisation pathologique.

L'étude de tendons calcifiés prélevés sur cadavres a montré la présence d'une métaplasie fibro-cartilagineuse autour des dépôts contenant des cellules de type chondrocytaire produisant de la phosphatase alcaline et de l'ENPP1, deux enzymes clé de la minéralisation. *In vitro*, les ténocytes humains issues de la coiffe des rotateurs ont la capacité de produire des dépôts d'apatite et

ceci de manière dépendante de la phosphatase alcaline. Ces cellules sur-exprimaient alors des marqueurs spécifiques des chondrocytes hypertrophiques (Collagène de type X, MMP13). L'analyse de poudres calciques prélevées sur des patients souffrant de tendinopathie calcifiante a montré un enrichissement significatif en protéines associées au développement de l'os et du cartilage. Parmi celles-ci, nous avons identifié le Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF), connue pour favoriser la minéralisation osseuse. Bien qu'il ait été identifié dans les poudres calciques et les cellules chondrocytaires présentes autour des dépôts, il n'a pas montré d'effet pro-minéralisant *in vitro* sur les ténocytes humains.

Title: Study of the composition of the calcific deposits and mechanisms leading to them in the calcific tendonitis of the rotator cuff.

Keywords: calcific tendonitis, apatite, alkaline phosphatase, hypertrophic chondrocytes, PEDF

Abstract: Calcific tendonitis is a frequent cause of shoulder pain. It is due to apatite deposits within the rotator cuff tendons. Its cause is currently poorly known.

The objectives of this thesis were to better characterize the cells and mechanisms involved in depositing apatite crystals in human tendons. Histologic sections of cadaveric calcified tendons showed that calcifications were amorphous areas surrounded by a fibrocartilaginous metaplasia containing hypertrophic chondrocyte-like cells that expressed alkaline phosphatase and ENPP1, two key enzymes of the mineralization process. *In vitro*, tenocytes extracted from human rotator cuff were able to mineralize in an alkaline

phosphatase-dependent manner. These cells expressed type X COLLAGEN and MMP13, hypertrophic chondrocytes markers. Finally, analysis of calcific powders extracted from patients suffering from calcific tendonitis showed a significant enrichment of proteins involved in bone and cartilage development. Among them, we identified Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF). PEDF is able to promote bone mineralization. While it was identified in calcific powders and chondrocyte-like cells surrounding the deposits, it was not able to increase the mineralisation of human tenocytes *in vitro*.