

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES BIOMÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES

Biosynthèse, transport et fonction de l'hyaluronidase HYAL1 dans les macrophages et ostéoclastes murins

Puissant, Émeline

Award date: 2019

Awarding institution: Universite de Namur

Link to publication

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- · Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
 You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.







Biosynthèse, transport et fonction de l'hyaluronidase HYAL1 dans les macrophages et ostéoclastes murins

Emeline Puissant

Laboratoire de Chimie Physiologique

Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Président du jury : Prof. Yves Poumay (URPhyM, UNamur, Namur)

Prof. Jean-Jacques Body (CHU Brugmann, ULB, Bruxelles) Prof. Marielle Boonen (URPhyM, UNamur, Namur) Prof. Florence Chainiaux (URBC, UNamur, Namur) Prof. Agnès Noël (LBTD, ULiège, Liège)

Prof. Michel Jadot (URPhyM, UNamur, Namur), promoteur Prof. Bruno Flamion (URPhyM, UNamur, Namur), co-promoteur

Remerciements

Me voilà arrivée à l'aboutissement de ma thèse. Presque 8 années de travail... qui ont filé sans les voir passer grâce à toutes les personnes que j'ai côtoyées durant cette aventure inoubliable. Contrairement à ce que certains pourraient penser, la réalisation d'une thèse est le résultat d'un travail d'équipe qui ne pourrait aboutir sans l'aide de collègues. L'occasion est ici idéale de mettre en avant et de remercier les personnes sans qui ce manuscrit n'aurait pas vu le jour.

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement mon promoteur Michel Jadot de m'avoir accepté dans son laboratoire pour réaliser une thèse sans me connaître au préalable. Je vous remercie d'avoir toujours été là, notamment dans les moments où il a été difficile de trouver un financement pour continuer cette thèse. Merci pour vos conseils, votre disponibilité, votre patience et le temps que vous m'avez consacré que ce soit lors de réunions ou dans le cadre de corrections d'abstracts ou d'articles. Cette thèse n'aurait bien entendu pas été possible sans votre supervision.

Merci également à mon co-promoteur Bruno Flamion pour vos précieux conseils et les discussions que nous avons eues à propos des résultats obtenus au fur et à mesure du projet. Votre expertise dans le domaine de l'acide hyaluronique et des ostéoclastes a constitué une précieuse aide dans l'avancement de cette thèse. Malgré un emploi du temps chargé, merci d'avoir pris le temps de me transmettre des corrections dans des articles ou des abstracts. Je garderai notamment en mémoire un voyage à Oklahoma au pays des cow-boys.

Une personne que j'aimerais remercier tout particulièrement et sans qui cette thèse n'aurait pas abouti est bien sûr Marielle. Merci pour ta disponibilité à tout moment, pour le temps que tu m'as accordé, pour ta motivation, pour ta bonne humeur,... Travailler à tes côtés renforce la motivation et donne envie de se plonger à fond dans son projet. Merci de t'être autant investie dans mon projet et ma supervision. Je pense pouvoir dire avec certitude que toi et Michel avez eu une influence considérable sur la façon dont j'analyse les résultats et aborde les choses dans le domaine scientifique. J'ai tellement apprécié les moments de détente passés dans le laboratoire ou en-dehors en ta compagnie ainsi qu'avec Virginie et Flo, trois collègues qui sont devenues des amies. Je ne compte plus les heures que nous avons passées à discuter sur le chemin du retour après une journée de travail ! Que de moments passés ensemble et qui nous font sourire en y repensant : la séance de cinéma après le travail le soir en attendant de revenir au laboratoire à 23h pour retirer des échantillons du bainmarie, les zymographies réalisées le week-end ou pendant les vacances de Noël sans chauffage,... Ah oui et n'oublions pas les congrès à Naples et à Louvain.

Je tiens également à adresser mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de lire ce travail : Jean-Jacques Body, Agnès Noël, Florence Chainiaux et Yves Poumay. Je tiens aussi à remercier ce dernier de m'avoir conseillé de contacter le laboratoire de Chimie Physiologique lorsque je cherchais un laboratoire d'accueil pour effectuer une thèse.

Qu'aurait été cette thèse sans les deux techniciennes en or de mon laboratoire? Merci à toi Virginie, ma partenaire d'animalerie toujours prête à rendre service. Merci à toi Flo, une oreille toujours attentive et de bon conseil qui a découvert le laboratoire en même temps que moi. Vous allez terriblement me manquer lorsque je partirai dans quelques mois pour une autre étape de ma vie. Un énorme merci pour votre disponibilité, vos petites attentions, vos conseils, vos coups de main, votre bonne humeur à toute épreuve,... (et j'en oublie certainement tellement la liste est longue). Et quelle chance avons-nous d'avoir deux techniciennes qui préparent des paillasses parfaitement rangées avant chaque TP.

Merci à tous mes collègues avec qui j'ai donné des TPs de biochimie pendant 4 ans : Catherine, Vanessa, Lucie, François et Mian. Merci à Isabelle pour l'organisation des TPs, le partage de ton expérience et nos discussions abordant des sujets divers et variés. Sans oublier mes collègues avec qui j'ai encadré des étudiants lors des TPs de microbiologie pendant 2 ans. Philippe Martin et Philippe Gillion, merci d'avoir partagé avec moi vos larges connaissances dans le monde de la microbiologie.

Un immense merci à Michel Savels pour tes bricolages insolites, ta patience, tes coups de main,... mais aussi et surtout pour ta créativité dans la réalisation d'illustrations scientifiques.

Je voudrais également remercier mes collègues de l'URPhyM. Je pense tout particulièrement à Marie et à Manon avec qui nous partageons les temps de midi. Mais également à d'autres personnes avec qui j'ai pris plaisir à discuter de tout et de rien : Joanna, Olivia, Inès, Evelyne,... Merci aussi à mes collègues travaillant dans le monde de l'acide hyaluronique : Sophie, Delphine, Céline Evrard, Céline Bidron,... Le partage de vos expériences m'a permis d'étendre mes connaissances sur cette molécule si particulière. Merci aussi à toutes les personnes qui ont pris le temps de m'apprendre des techniques : Martine, Benoit, Valérie, Dominique, Kathleen,.... Et enfin, merci à toutes les personnes que j'ai croisées de près ou de loin au cours de ma thèse. Il m'est malheureusement impossible de citer tout le monde.

Last but not least... Une thèse ne serait pas possible sans l'aide de collègues mais aussi de la famille pour nous épauler pendant cette longue aventure. Un grand merci à mes parents pour leur aide pendant la réalisation de cette thèse et d'avoir toujours été présents. Merci de m'avoir toujours soutenue quels que soient les choix que je faisais concernant mes études et mon travail. Merci à François, mon frérot, pour m'avoir toujours guidée et montré l'exemple ainsi qu'à ma belle-sœur Clémentine. Merci aussi à ma marraine et à mon oncle André pour les discussions enrichissantes. Enfin, merci à mes amies du tennis et plus particulièrement à Audrey, Valou et Caro pour tous les moments passés ensemble. Promis, je serai plus disponible à partir de maintenant (enfin je l'espère).

En résumé, merci pour tout

Résumé

L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycane de masse moléculaire élevée qui est abondamment présent dans les matrices extracellulaires où il remplit des fonctions structurelles et contribue à la viscoélasticité du tissu. Par l'intermédiaire d'interactions avec d'autres molécules, l'HA est également impliqué dans divers processus biologiques tels que l'angiogenèse, l'inflammation ou encore la différenciation de certains types cellulaires. L'HA de haute masse moléculaire et les fragments issus de sa dégradation ont cependant souvent des effets opposés sur ces processus. Les hyaluronidases, qui sont les enzymes responsables du catabolisme de l'HA, sont dès lors des protéines particulièrement importantes dans la régulation de ces processus. L'enzyme HYAL1, qui fait l'objet de cette thèse de doctorat, est l'une des deux hyaluronidases principales actives dans les tissus somatiques. En raison de son optimum d'activité à pH acide, HYAL1 a souvent été considérée comme une enzyme lysosomale. Cependant, plusieurs observations réalisées au fil des années ont remis en question cette déduction. Notons par exemple que, contrairement aux autres enzymes lysosomales, HYAL1 est particulièrement abondante dans le sérum, et qu'elle ne semble pas porter de signal d'adressage « classique » vers les lysosomes. Afin de résoudre la controverse pesant sur la localisation subcellulaire d'HYAL1, et ainsi clarifier le modèle de la dégradation intracellulaire de l'HA, nous avons étudié la localisation subcellulaire et le trafic d'HYAL1 dans des macrophages murins ainsi que dans le foie de souris. Par des techniques de fractionnements subcellulaires, de western blotting et de mesure de l'activité d'HYAL1 par zymographies en condition native, nous avons, pour la première fois, fait la démonstration directe de la présence de l'hyaluronidase HYAL1 dans les lysosomes. Nous avons également déterminé qu'HYAL1 est synthétisée sous la forme d'un précurseur actif qui subit un clivage protéolytique dans des endosomes, au cours de son transport vers les lysosomes. L'enzyme s'accumule ensuite dans les lysosomes, sous une forme mature également active. Nous avons également déterminé que l'HYAL1 néosynthétisée ne suit pas la voie canonique de transport vers les lysosomes qui est dépendante du signal mannose 6-phosphate et qui est empruntée par la majorité des hydrolases acides. HYAL1 est tout d'abord sécrétée sous sa forme précurseur, non porteuse d'un signal mannose 6-phosphate, et ensuite endocytée par liaison au récepteur au mannose MRC1 notamment exprimé à la surface des macrophages et des cellules sinusoïdales du foie.

Nous avons ensuite mis en évidence une forte augmentation de l'expression d'HYAL1 au cours de la différenciation de monocytes de souris en ostéoclastes, des cellules multinucléées responsables de la résorption osseuse. Cette observation, ainsi que plusieurs données publiées, nous ont amenés à postuler que la fonction de résorption de l'os par les ostéoclastes pourrait être influencée par HYAL1. En effet, les deux autres enzymes lysosomales fortement surexprimées au cours de l'ostéoclastogenèse, TRAP et la cathepsine K, jouent toutes les deux des rôles centraux dans le processus de résorption osseuse. De plus, plusieurs chercheurs ont rapporté que l'HA peut impacter la croissance et/ou le fonctionnement des ostéoclastes *in vitro*, lorsqu'il est présent dans leur milieu de culture ou immobilisé au fond du puit de culture. Les effets activateurs ou inhibiteurs semblent

varier en fonction de la masse moléculaire de l'HA et, dès lors, pourraient dépendre de l'activité des hyaluronidases telles qu'HYAL1. Cela n'a cependant jamais été investigué, que ce soit in vitro ou in vivo. Afin d'explorer le rôle potentiel d'HYAL1 dans les ostéoclastes, nous avons isolé et différencié des ostéoclastes in vitro à partir de souris sauvages ou déficientes pour HYAL1 (Hyal1 -/-). Il a été rapporté que ces dernières développent une arthrose proche du phénotype d'arthrite juvénile observé chez les rares patients atteints de mucopolysaccharidose de type IX, une pathologie provoquée par une déficience en HYAL1. Nos résultats montrent que le processus de différenciation des ostéoclastes n'est pas affecté par l'inactivation d'Hyal1. Par contre, leur activité de résorption est augmentée. Ex vivo, les fémurs des souris déficientes pour HYAL1 présentent une augmentation du nombre d'ostéoclastes au niveau de l'épiphyse et de la plaque de croissance. Le nombre d'ostéoblastes est, quant à lui, inchangé. Les souris Hyal1 -/- âgées d'un an ou plus ont des fémurs légèrement plus courts et souffrent d'une diminution significative de leur densité osseuse. Ce phénotype d'ostéopénie est cohérent avec l'augmentation de la résorption osseuse par les ostéoclastes que nous avons détectée. Une contribution des ostéoblastes, qui seraient moins actifs, est aussi suspectée sur base de l'observation d'une diminution du marqueur plasmatique de formation osseuse PINP (Procollagen type I N-terminal Propeptide).

En conclusion, dans le cadre de ce travail, nous avons levé toute ambiguïté sur la localisation subcellulaire d'HYAL1, en démontrant sa présence dans les lysosomes, et identifié un mécanisme de ciblage de l'enzyme vers ces organites. Nous avons aussi observé que le fonctionnement normal des ostéoclastes repose sur l'hyperexpression de l'enzyme HYAL1 au cours de leur différenciation à partir de monocytes, et que l'inactivation de cette enzyme altère significativement le remodelage osseux chez la souris. Ces résultats indiquent que la fragmentation de l'HA osseux par HYAL1 est un mécanisme finement régulé qui module la physiologie osseuse. Il sera intéressant, dans le futur, d'étudier plus avant les mécanismes par lesquels l'action de l'HA clivé par HYAL1 agit sur les différents types de cellules osseuses et de déterminer si ces voies de régulation sont perturbées dans diverses pathologies osseuses.

Abréviations

ABCB6/B9/D4	ATP Binding Cassette subfamily B/D member 4/6/9
ADAMTS5	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 5
Akt	Protein Kinase B
AP-1/2	Adaptor Protein complex 1/2
Arp 2/3	Actin-related protein-2/3
Asn	Asparagine
ATG4B/5/7	Autophagy related protein 4B/5/7
АТР	Adenosine Triphosphate
BMD	Bone Mineral Density
BMM	Bone Marrow Monocyte-Macrophage
CAII	Carbonic Anhydrase II ou Anhydrase Carbonique II
CD16/44	Cluster of Differentiation 16/44
CD-MPR	Cation-Dependent Mannose 6-Phosphate Receptor
CEMIP	Cell Migration-Inducing and hyaluronan-binding Protein
CI-MPR	Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor
CIC7	Chloride Channel protein 7
CLEAR	Coordinated Lysosomal Expression And Regulation
CLIP-170	Cytoplasmic Linker Protein 170
СТХ	C-terminal Telopeptide of type I-collagen
DAP12	DNAX-Activation Protein 12
DEF8	Differentially Expressed in FDCP 8
DMAB	p-dimethylaminobenzaldehyde
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular Matrix
EEA1	Early Endosomal Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor ou Facteur de Croissance Epidermique
Egr-1	Early growth response protein 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENPP1	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1
ER	Endoplasmic Reticulum ou Réticulum Endoplasmique
ERK1,2	Extracellular signal-Regulated Kinase 1,2
FAM98A	Family with sequence similarity 98 Member A
FcRγ	Fragment crystallizable Receptor γ
FSH	Follicle Stimulating Hormone ou Hormone Folliculo-Stimulante
GAG	Glycosaminoglycan ou Glycosaminoglycane
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GH	Growth Hormone ou Hormone de Croissance
GGA	Golgi-localized, γ-ear containing, ADP-ribosylation factor binding
GILT	Gamma-Interferon-inducible Lysosomal Thiol reductase
Glc	Glucose
GlcUA	Glucuronic Acid ou Acide Glucuronique
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine Triphosphate
НА	Hyaluronic Acid ou Hyaluronan ou Acide Hyaluronique
НАВР	Hyaluronic Acid Binding Proteins
HARE	Hyaluronan Receptor for Endocytosis
HAS1-3	Hyaluronic Acid Synthase 1-3
HEK 293	Human Embryonic Kidney 293
HES	Hematoxylin Eosin Saffron
HGSNAT	Heparan-α-glucosaminide N-acetyltransferase ou
	Héparane-alpha-glucosaminide N-acétyltransférase
HYAL1-5	Hyaluronidase 1-5
lds	Inhibitors of differentiation
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1 ou Facteur de Croissance 1 analogue à l'Insuline
IL-1/6	Interleukin 1/6 ou Interleukine 1/6
IQGAP1	Ras GTPase-Activating-like Protein 1
IRF8	Interferon Regulatory Factor 8
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
КО	Knockout
LAAT1	Lysosomal Amino Acid Transporter
LAMP	Lysosome-Associated Membrane Protein
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3
LDL	Low Density Lipoprotein
Lhx2	LIM homeobox 2
LIMP2	Lysosome Membrane Protein 2
LMBD1	LMBR1 Domain-containing protein 1
LRP1/2	LDL Receptor-related Protein 1/2
LYNUS	Lysosome Nutrient Sensing
LYVE-1	Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor 1
MafB	V-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
Man	Mannose
Man-6-P	Mannose 6-Phosphate
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase

MCOLN1	<i>Mucolipin</i> 1 ou Mucolipine 1
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MITF	Microphtalmia-associated Transcription Factor
MLN64	Metastatic Lymph Node 64
MM	Molecular Mass
MMP-9/13	Matrix Metalloproteinase 9/13
MPR	Mannose 6-Phosphate Receptor ou Récepteur du Mannose 6-Phosphate
MRC1	Mannose Receptor C-type 1 ou Récepteur au Mannose 1 de type C
MRP5	Multidrug Resistance-associated Protein 5
MPS	Mucopolysaccharidosis ou Mucopolysaccharidose
mTORC1	mammalian (ou mechanistic) Target Of Rapamycin Complex 1
NAcGln (ou GlcNAc)	N-acetylglucosamine ou N-acétylglucosamine
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NDEL1	Nuclear Distribution protein nude-Like 1
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T cells 1
NF-κB	Nuclear Factor-Kappa B
NHE1	Sodium-Hydrogen Exchanger 1
NPC1	NPC intracellular cholesterol transporter 1
OPG	Osteoprotegerin ou Ostéoprotégérine
OSCAR	Osteoclast-Associated immunoglobulin-like Receptor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PINP	Procollagen type I N-terminal Propeptide
PHOSPHO1	Phosphoethanolamine/phosphocholine Phosphatase
РІЗК	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIR-A	Paired Immunoglobulin-like Receptor A
Pit1	inorganic Phosphate Transporter 1
ΡLCγ	Phospholipase Cy
Plekhm1	Pleckstrin Homology domain-containing family M member 1
PNGase F	Peptide-N-Glycosidase F
pQCT	peripheral Quantitative Computed Tomography
PSAP	Prosaposin ou Prosaposine
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin subtrate protein 1
RANK	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand
RHAMM	Receptor for Hyaluronan Mediated Motility
RSA	Relative Specific Activity
RT	Room Temperature

SDSSodium Dodecyl SulfateSDS-PAGESodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel ElectrophoresisSEZ6L2Seizure Related 6 homolog Like 2SIRPβ1Signal-Regulatory Protein β-1SNARESoluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein ReceptorSPAM1Sperm Adhesion Molecule 1TCATrichloroacetic AcidTFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Trigpertidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	SDF-1	Stromal cell-Derived Factor-1
SDS-PAGESodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel ElectrophoresisSEZ6L2Seizure Related 6 homolog Like 2SIRPβ1Signal-Regulatory Protein β-1SNARESoluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein ReceptorSPAM1Sperm Adhesion Molecule 1TCATrichloroacetic AcidTFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWIPWid-Type	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEZ6L2Seizure Related 6 homolog Like 2SIRPβ1Signal-Regulatory Protein β-1SNARESoluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein ReceptorSPAM1Sperm Adhesion Molecule 1TCATrichloroacetic AcidTFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Trineptidyl-Peptidase 1TNFTumor Necrosis FactorTPP1Trigeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIRPβ1Signal-Regulatory Protein β-1SNARESoluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein ReceptorSPAM1Sperm Adhesion Molecule 1TCATrichloroacetic AcidTFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseWiskott-Aldrich Syndrome proteinWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWild-Type	SEZ6L2	Seizure Related 6 homolog Like 2
SNARESoluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein ReceptorSPAM1Sperm Adhesion Molecule 1TCATrichloroacetic AcidTFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	SIRPβ1	Signal-Regulatory Protein β-1
SPAM1Sperm Adhesion Molecule 1TCATrichloroacetic AcidTFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein Receptor
TCATrichloroacetic AcidTFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseViskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWild-Type	SPAM1	Sperm Adhesion Molecule 1
TFEBTranscription Factor EB ou Facteur de Transcription EBTGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWiASp-Interacting ProteinWTWild-Type	ТСА	Trichloroacetic Acid
TGNTrans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de GolgiTLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TREM2Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TFEB	Transcription Factor EB ou Facteur de Transcription EB
TLR2/4Toll-Like Receptor 2/4TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TREM2Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TGN	Trans-Golgi Network ou Réseau trans de l'appareil de Golgi
TMEM2Transmembrane protein 2TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TREM2Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWIPWASp-Interacting ProteinWIPWild-Type	TLR2/4	Toll-Like Receptor 2/4
TNFTumor Necrosis FactorTPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TREM2Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TMEM2	Transmembrane protein 2
TPP1Tripeptidyl-Peptidase 1TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TREM2Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF6TNF Receptor Associated Factor 6TREM2Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TPP1	Tripeptidyl-Peptidase 1
TREM2Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
TRAPTartrate-Resistant Acid PhosphataseTSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TREM2	Triggering Receptor Expressed in Myeloid cells-2
TSG-6Tumor necrosis factor-inducible Gene 6UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
UDPUridine DiphosphateVAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	TSG-6	Tumor necrosis factor-inducible Gene 6
VAMP7Vesicle-Associated Membrane Protein 7v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	UDP	Uridine Diphosphate
v-ATPaseVacuolar-type H+ ATPaseWASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	VAMP7	Vesicle-Associated Membrane Protein 7
WASpWiskott-Aldrich Syndrome proteinWIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	v-ATPase	Vacuolar-type H+ ATPase
WIPWASp-Interacting ProteinWTWild-Type	WASp	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
WT Wild-Type	WIP	WASp-Interacting Protein
	WT	Wild-Type

Table des matières

INTRODUCTION	
1. Les lysosomes	
1.1. La découverte des lysosomes	
1.2. Les voies de transport du matériel à dégrader	
1.3. Le transport des hydrolases acides et des protéines membranaires vers les lysosomes	
1 3 1 La biosynthèse et la N-glycosylation des protéines lysosomales	10
1.3.2. Les voies de transport des hydrolases acides dépendantes du mannose 6-phosphate	
1.3.3. Les voies de transport des hydrolases acides indépendantes du mannose 6-phosphate	
1.3.4. Les voies de transport des protéines membranaires lysosomales	16
1.4. Les lysosomes spécialisés	17
1.5. Les dysfonctions des lysosomes	18
2. L'acide hyaluronique	22
2.1. Les propriétés et les fonctions de l'acide hyaluronique	22
2.1.1. Les glycosaminoglycanes	22
2.1.2. Les propriétés de l'acide hyaluronique	22
2.1.3. Les fonctions de l'acide hyaluronique	23
2.2. La synthèse de l'acide hyaluronique	
2.3. Les hyaladhérines	25
2.3.1. Les hyaladhérines extracellulaires	25
2.3.2. Les hyaladhérines cellulaires	25
2.4. La dégradation de l'acide hyaluronique	27
2.4.1. Les hyaluronidases des mammifères	27
2.4.2. HYAL2	28
2.4.3. HYAL3	29
2.4.4. Les hyaluronidases HYAL4, SPAM1, HYALP1 et HYAL5	30
2.4.5. Les modèles du catabolisme de l'acide hyaluronique	30
2.4.6. Les nouveaux acteurs du catabolisme de l'acide hyaluronique	31
2.5. L'hyaluronidase HYAL1	32
2.5.1. La structure d'HYAL1	32
2.5.2. La localisation subcellulaire d'HYAL1	
2.5.3. La déficience en HYAL1	36
3. Le tissu osseux	
3.1. La structure et la composition de l'os	38
3.2. Les ostéoblastes	40
3.3. Les ostéocytes	41
3.4. Les ostéoclastes	42
3.4.1. L'ostéoclastogenèse	42
3.4.2. Les podosomes	46
3.4.3. L'activité de résorption osseuse des ostéoclastes	47
3.5. Le remodelage osseux	51
3.6. Les perturbations de la résorption osseuse	53
3.7. Les rôles de l'acide hyaluronique dans l'os	56
3.7.1. La présence de l'acide hyaluronique dans les tissus osseux	56
3.7.2. Les effets de l'acide hyaluronique sur les ostéoblastes	57
3.7.3. Les effets de l'acide hyaluronique sur les ostéoclastes	58
3.7.4. Les acteurs du métabolisme de l'acide hyaluronique dans l'os	59

OBJECTIFS	61
RESULTATS	65
1. Etude du trafic intracellulaire d'HYAL1 dans les macrophages murins	67
2. Etude de la localisation et de l'activité d'HYAL1 dans le foie murin	85
3. Etude de l'expression et du trafic intracellulaire d'HYAL1 dans les ostéoclastes	93
4. Analyse de l'impact de l'inactivation du gène <i>Hyal1</i> sur la différenciation et l'activité des ostéo	clastes
murins, et investigation du phenotype osseux de souris Hyal1 -/	119
DISCUSSION	143
1. Le trafic intracellulaire d'HYAL1	145
1.1. La localisation subcellulaire d'HYAL1	145
1.2. Transport de l'enzyme HYAL1 vers les lysosomes	148
1.3. Localisation non lysosomale d'HYAL1	150
1.4. Contribution au modèle du catabolisme de l'acide hyaluronique	152
2. Expression d'HYAL1 dans les ostéoclastes	156
3. Le phénotype osseux des souris déficientes pour HYAL1	158
3.1. Impact de l'absence d'HYAL1 sur les ostéoclastes	159
3.1.1. Effets potentiels de l'acide hyaluronique sur l'ostéoclastogenèse	160
3.1.2. Effets de l'acide hyaluronique sur la production de RANKL et d'OPG	161
3.1.3. Sécrétion de la cathepsine K et de TRAP par les ostéoclastes	162
3.1.4. Adhésion des ostéoclastes	163
3.2. Impact de l'absence d'HYAL1 sur des marqueurs de résorption et de formation osseuse	164
3.3. HYAL1, acide hyaluronique et densité osseuse	165
3.4. Les effets de l'absence d'HYAL1 sur la croissance longitudinale des os	166
4. Conclusion	168
BIBLIOGRAPHIE	169
ANNEXES	187

INTRODUCTION

Les lysosomes sont des organites intracellulaires acidifiés délimités par une membrane simple et qui constituent le principal compartiment de dégradation de la cellule. Bien que longtemps considérés comme « l'estomac » de la cellule, ils sont maintenant connus pour être des régulateurs clés de l'homéostasie et être impliqués dans de nombreux processus cellulaires [de Duve and Wattiaux, 1966]. Les lysosomes jouent notamment un rôle primordial dans plusieurs voies de signalisation métaboliques, la réparation de la membrane plasmique, les défenses immunitaires contre les pathogènes, l'induction de l'apoptose ou encore l'homéostasie du cholestérol [ces processus ont fait l'objet de plusieurs articles de revue récents parmi lesquels, Lamming and Bar-Peled, 2019; Vieira, 2018; Hipolito, Ospina-Escobar et al., 2018; Yu et al., 2016; Luo et al., 2017].

Les lysosomes contiennent une soixantaine d'hydrolases acides solubles impliquées dans la dégradation de diverses molécules. Parmi ces enzymes, se trouvent des lipases, des protéases, des glycosidases, des sulfatases, des phosphatases et des nucléases dont l'activité est optimale à pH acide pour la majorité (Fig 1) [Schröder et al., 2010; Jadot, Boonen et al., 2017].

D'autre part, les lysosomes contiennent de nombreuses protéines transmembranaires qui sont généralement fortement glycosylées. Les glycans forment un glycocalyx protecteur sur la face interne de la membrane lysosomale, ce qui protège cette membrane et les protéines qui y résident d'une dégradation par les hydrolases acides. L'inactivation de plusieurs protéines structurelles membranaires telles que les LAMPs (LAMP1 et LAMP2, Lysosome-Associated Membrane Protein) par des méthodes génétiques a démontré que ces protéines sont requises pour la fusion, la motilité et l'exocytose des lysosomes [Schwake et al, 2013]. D'autres protéines membranaires lysosomales sont des canaux ioniques ou encore des transporteurs qui participent à l'export vers le cytosol de produits de dégradation tels que des acides aminés, des acides gras ou des hydrates de carbone produits par les hydrolases acides [Eskelinen et al., 2003]. Par ailleurs, un complexe membranaire important pour le fonctionnement des lysosomes est la pompe à protons v-ATPase (Vacuolar-type H+ ATPase) qui permet, comme son nom l'indique, d'importer des protons dans la lumière des lysosomes, et d'y faire régner un pH correspondant aux conditions optimales de fonctionnement des hydrolases acides [Schneider, 1979; Mindell, 2012]. Pour terminer, notons que des plateformes de signalisation ont été découvertes à la surface des lysosomes. La plateforme mTORC1 (mammalian ou mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1), par exemple, interagit avec la v-ATPase et détecte l'abondance de certains acides aminés produits dans les lysosomes. En fonction de cette abondance, la plateforme adapte l'expression de tout un réseau de gènes. Ainsi, le lysosome est le point de départ d'une signalisation qui peut notamment promouvoir la synthèse des protéines si les stocks d'acides aminés sont suffisants ou, dans le cas contraire, induire la dégradation des protéines en acides aminés [Lamming and Bar-Peled, 2019].



Figure 1: Représentation schématique des lysosomes. Les lysosomes sont des organites délimités par une membrane lipidique qui est protégée de l'environnement acide de la lumière par une couche de glycocalyx recouvrant sa face interne. La membrane lysosomale, qui permet d'isoler les hydrolases acides du cytosol, contient diverses protéines intégrales ou périphériques. Parmi les protéines intégrales se trouvent les protéines structurelles LAMP1 et LAMP2 qui représentent environ 50 % des protéines membranaires lysosomales. Les transporteurs membranaires constituent un autre groupe de protéines membranaires lysosomales qui peuvent être impliquées dans l'export de molécules (comme NPC1, la cystinosine, la sialine, LAAT1, etc) ou dans l'import de matériel à dégrader (via LAMP2A). La machinerie LYNUS (Lysosome Nutrient Sensing) comprend des protéines membranaires intégrales, dont la pompe à protons v-ATPase, ainsi que des protéines cytosoliques ancrées sur la face externe des lysosomes (comme le complexe mTORC1). Cette machinerie détecte les niveaux intralysosomaux d'acides aminés et contrôle une cascade de signalisation capable, en fonction des besoins, de diriger le métabolisme cellulaire soit vers l'anabolisme des protéines soit vers leur catabolisme. D'autres machineries protéiques, contenant notamment des petites GTPases (Guanosine Triphosphatase) Rabs et des membres de la famille des SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Activating protein Receptor), sont impliquées dans le déplacement des lysosomes dans le cytosol et dans la fusion des lysosomes avec d'autres lysosomes, avec des endosomes ou encore avec la membrane plasmique. Enfin, la membrane lysosomale comprend aussi des canaux ioniques, tels que le canal chlorure CIC7 (Chloride Channel protein 7), et quelques enzymes cataboliques comme l'héparane-alpha-glucosaminide N-acétyltransférase (HGSNAT pour Heparanalpha-glucosaminide N-acetyltranferase) qui participe à la dégradation du sulfate d'héparane (schéma adapté à partir de Settembre et al., 2013).

1.1. La découverte des lysosomes

Les lysosomes ont pour la première fois été décrits par l'équipe de Christian de Duve en 1955 lorsqu'ils ont mis en évidence la présence d'une activité de type phosphatase acide dans des compartiments délimités par une membrane [de Duve et al., 1955]. Le terme « lysosome » a été proposé pour ce nouveau type de granules cytoplasmiques riches en enzymes hydrolytiques. Ils ont par la suite pu être partiellement purifiés à partir de foie de rat grâce à l'utilisation d'un schéma de fractionnement subcellulaire par centrifugation permettant d'obtenir cinq fractions enrichies en différents organites. Comme cette technique a été utilisée dans ce travail de thèse, il nous semble important d'en détailler brièvement le principe. Elle est basée sur le principe de la centrifugation différentielle selon lequel des particules de plus grande taille sédimentent plus rapidement par rapport à des petites particules. Ainsi, en soumettant un homogénat cellulaire ou tissulaire à des champs centrifuges de plus en plus élevés, il est possible d'isoler des fractions renfermant des organites dont le coefficient de sédimentation, qui reflète principalement la taille de la structure, est de plus en plus petit. Les cinq fractions obtenues successivement selon cette méthode proposée par de Duve ont été respectivement nommées N, M, L, P et S. Obtenue en premier, la fraction nucléaire N est enrichie en noyaux, en cellules non cassées et en larges fragments de la membrane plasmique. Les deux fractions suivantes appelées mitochondriale lourde M et mitochondriale légère L contiennent majoritairement des mitochondries, des lysosomes et des peroxysomes mais dans des proportions différentes. Les microsomes, c'est-àdire des vésicules formées à partir de fragments du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique, sédimentent principalement dans la fraction microsomale P alors que la dernière fraction S contient le matériel soluble (non sédimenté dans les conditions utilisées). Bien qu'enrichis dans certaines fractions, le degré de purification des organites par cette technique reste fort limité. La fraction M renferme la part la plus importante de la population lysosomale, mais la majorité des mitochondries s'y trouve également. Il en résulte un degré de purification très modeste des lysosomes. En revanche, l'enrichissement en lysosomes est nettement plus élevé dans la fraction L, de l'ordre de maximum dix fois par rapport à l'homogénat, en raison de sa faible concentration en protéines totales [Appelmans, et al., 1955; de Duve et al., 1955].

Les techniques d'enrichissement en lysosomes d'un échantillon ont, par la suite, été améliorées en combinant ces centrifugations différentielles à une ou plusieurs étapes de centrifugation isopycnique. Au cours d'une centrifugation isopycnique, les particules sédimentent dans un milieu constitué d'un gradient de densité, et ce jusqu'à ce qu'elles atteignent un point précis du gradient correspondant à leur propre densité, ce qui provoque leur immobilisation. Différents types de milieux peuvent être utilisés pour construire ces gradients de densité, tels que le saccharose, le Nycodenz[®], le PercollTM ou l'iodixanol [Graham, 2001]. L'utilisation de la centrifugation isopycnique permet d'obtenir des fractions de lysosomes enrichies cinq à dix fois plus par rapport à la fraction L. Une autre approche permettant de distinguer les lysosomes des autres organites consiste à provoquer une modification spécifique de la densité des lysosomes. Par exemple, l'injection de Triton WR1339 dans des rats ou des souris provoque une accumulation de lipoprotéines dans les lysosomes et, par conséquent, diminue leur densité [Wattiaux et al., 1963]. Après centrifugation isopycnique, ces lysosomes « allégés », appelés tritosomes, se retrouvent dans une zone de densité pauvre en autres constituants cellulaires, ce qui permet un enrichissement élevé des lysosomes. Ce type de méthode peut être appliqué à des cellules en culture, par exemple traitées avec du saccharose ou de la progestérone, ce qui provoque une profonde modification de la densité d'équilibration des lysosomes en centrifugation isopycnique [DeCourcy and Storrie, 1991; Gasingirwa et al, 2008].

1.2. Les voies de transport du matériel à dégrader

Les lysosomes étant responsables de la dégradation de nombreuses macromolécules, celles-ci doivent d'abord accéder à cet organite. Le matériel extracellulaire non diffusible rejoint les lysosomes par endocytose alors que les composants intracellulaires peuvent être délivrés aux lysosomes par autophagie. L'autophagie (« se manger soi-même ») est un terme qui recouvre les divers processus par lesquels des macromolécules ainsi que des organites vieillissants et/ou dysfonctionnels de la cellule elle-même peuvent être dégradés. Le processus le mieux caractérisé est celui de la macroautophagie. Il implique la séquestration du matériel intracellulaire à dégrader au sein d'une double membrane qui se referme progressivement sur elle-même. Le compartiment qui est formé au terme de cette étape est appelé un autophagosome. Sa fusion avec un lysosome génère un autophagolysosome au sein duquel la dégradation prend place [Li et al., 2018; Dikic and Elazar, 2018].

L'endocytose est un processus qui permet aux cellules d'« internaliser » du matériel extracellulaire et de l'envoyer vers les lysosomes. Plusieurs mécanismes d'endocytose existent dont la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine ou par les cavéoles ainsi que l'endocytose dite indépendante de la clathrine et des cavéoles [Kaksonen and Roux, 2018; Sandvig et al., 2018].

Le seul processus de transport de matériel vers les lysosomes qui sera développé ici, en raison de son lien avec le travail de thèse, est celui de l'endocytose médiée par récepteur (Fig 2 et 3). Ce processus implique, dans la majorité des cas, la clathrine. Comme son nom l'indique, cette endocytose débute par l'interaction du ligand avec son récepteur qui, à son tour, recrute des protéines adaptatrices cytosoliques par l'intermédiaire de signaux de reconnaissance présents dans le domaine cytoplasmique des récepteurs. Ces signaux peuvent correspondre à des courtes séquences, dont les plus communes sont des motifs basés sur des tyrosines, à des domaines conformationnels ou à des modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations ou des ubiquitinylations [Pandey, 2009]. Parmi les protéines adaptatrices impliquées dans l'endocytose de cargos se trouve un complexe multimérique appelé AP-2 (Adaptor Protein complex 2). Ce complexe, qui se trouve être le plus utilisé et le mieux décrit, interagit avec les récepteurs transmembranaires et des phospholipides de la membrane plasmique, puis subit un changement conformationnel qui permet d'exposer en surface du complexe des signaux de reconnaissance par la clathrine. Un manteau, composé de diverses protéines adaptatrices et de clathrine, est alors formé et, avec l'aide de l'actine et de ses molécules régulatrices, favorise la déformation de la membrane plasmique donnant naissance à un puit recouvert de clathrine. L'invagination se poursuit par la formation d'une vésicule recouverte de clathrine grâce à l'action de protéines de fission telles que la dynamine qui forme un anneau autour du « cou » de cette vésicule participant à son détachement de la membrane plasmique. La clathrine se détache par la suite de la vésicule, avant fusion de celle-ci avec un endosome précoce, et est recyclée [Kaksonen and Roux, 2018].



Figure 2: Représentation schématique de l'endocytose médiée par récepteur. Ce processus débute par la liaison du ligand à un récepteur transmembranaire. La portion cytosolique de ce dernier contient des signaux de reconnaissance qui sont impliqués dans le recrutement de protéines adaptatrices dont la mieux étudiée est un complexe hétéro-tétramérique appelé AP-2. Alors que les sous-unités μ 2 et σ 2 interviennent dans l'interaction avec les récepteurs transmembranaires, le domaine α est impliqué dans le ciblage du complexe vers la membrane plasmique. Enfin, la quatrième sous-unité β 2 participe au recrutement de la clathrine au niveau de la membrane plasmique. L'assemblage des triskélions de clathrine sous forme d'un réseau polygonal favorise la déformation de la membrane plasmique, avec l'aide d'autres protéines adaptatrices ainsi que de l'actine. Les puits recouverts de clathrine bourgeonnent jusqu'à la fission de la membrane plasmique notamment grâce à l'action de la dynamine, une GTPase qui entoure le « cou » des puits en bourgeonnement. Une fois la vésicule détachée de la membrane, des protéines qui ont participé à sa formation, comme AP-2, la clathrine ou la dynamine décrites cidessus, sont recyclées vers la membrane plasmique (adapté à partir de Conner and Schmid, 2003).

Les endosomes précoces forment un réseau de centaines de vacuoles dynamiques interagissant entre elles (Fig 3). Ces structures situées en périphérie cellulaire sont caractérisées par la présence d'EEA1 (*Early Endosomal Antigen* 1) et de la petite GTPase Rab5. La principale fonction des endosomes précoces est de diriger les cargos, qui se détachent généralement de leur récepteur dans l'environnement légèrement acide des endosomes, vers les endosomes tardifs et lysosomes où ils seront dégradés. Les récepteurs, et certains cargos, peuvent aussi être dirigés à partir des endosomes précoces vers la membrane plasmique dans un processus de recyclage. En effet, ces endosomes se présentent sous la forme de vacuoles à partir desquelles émergent des réseaux tubulaires qui formeront les endosomes de recyclage. Le matériel destiné à la dégradation dans les lysosomes reste dans la partie vacuolaire alors que les molécules présentes dans les tubules sont généralement destinées au recyclage. Par ailleurs, une formation de vésicules intra-luminales, par invagination de la membrane limitante, débute dans les endosomes précoces. Ces endosomes en contiennent

habituellement un maximum de huit, tandis que les endosomes appelés tardifs en contiennent généralement une multitude. Ils sont, par conséquent, également désignés sous le nom de corps multivésiculaires [Saftig and Klumperman, 2009; Appelqvist et al., 2013; Klumperman and Raposo, 2014].

La conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs se déroule grâce à un processus de maturation qui implique la perte de certains constituants et l'acquisition de nouveaux éléments. Ceci se déroule au travers d'un échange continu de membranes et de contenu avec d'autres compartiments, principalement d'autres endosomes, les lysosomes et diverses vésicules de transport [Saftig and Klumperman, 2009]. En comparaison avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs contiennent progressivement moins d'extensions tubulaires et de cargos destinés au recyclage vers la membrane plasmique [Mesaki, Tanabe et al., 2011]. A la place, les endosomes tardifs se caractérisent par une augmentation graduelle de la concentration de molécules destinées à la dégradation ainsi que d'hydrolases acides et de protéines membranaires lysosomales néosynthétisées en provenance du réseau trans de l'appareil de Golgi (ou TGN pour trans-Golgi Network). Au fur et à mesure de leur maturation, ces compartiments se dirigent vers la zone péri-nucléaire et deviennent identifiables par la présence de la GTPase Rab7 à leur surface [Pillay et al., 2002; Saftig and Klumperman, 2009]. La conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs s'accompagne aussi d'une diminution du pH, avoisinant alors 5.0-5.5. Il a été proposé que cette acidification graduelle découle d'une augmentation de l'activité de la v-ATPase en raison d'une modification progressive de l'abondance relative des différentes sous-unités qui la composent [Lafourcade et al., 2008].

Les endosomes tardifs fusionnent ensuite avec des lysosomes, ce qui donne naissance à un compartiment intermédiaire parfois qualifié d'endolysosome ou de lysosome actif. Plusieurs groupes pensent en effet que la dégradation des macromolécules prend place au sein de cet organite, et que les hydrolases acides y sont recrutées suite à la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes dits « denses » (qualifiés ainsi d'après leur comportement en fractionnement subcellulaire et leur aspect en microscopie électronique à transmission) [Bright et al., 2016]. D'autres mécanismes, tels que du transport vésiculaire, pourraient aussi intervenir dans la formation d'un compartiment actif dans la dégradation des macromolécules. Au terme de cette dégradation, l'endolysosome donnerait naissance à un nouveau lysosome (Fig 3) [Luzio et al., 2014]. La reformation des lysosomes est un processus encore mal compris mais qui semble comprendre une condensation progressive de l'endolysosome, ou d'un tubule émergeant de cette structure, suite à l'export des produits de dégradation générés par l'activité catabolique. Les mécanismes de condensation seraient aussi liés au recyclage de protéines endosomales membranaires vers l'appareil de Golgi [Hirst et al., 2018]. Il a également été suggéré que la maturation des lysosomes implique la perte de matériel par bourgeonnement vésiculaire ainsi qu'une modification du fonctionnement de la pompe à protons v-ATPase ou du contenu en calcium qui pourrait induire l'agrégation des hydrolases acides [Pryor et al., 2000; Miller et al., 2015; Bissig et al., 2017].



Figure 3: Voies de transport du matériel destiné à la dégradation dans les lysosomes. Suite à la formation de vésicules, souvent recouvertes de clathrine, les molécules provenant du milieu extracellulaire et liées à un récepteur membranaire sont délivrées dans les endosomes précoces (EE, 1). A ce niveau, elles peuvent se détacher de leur récepteur et être dirigées vers les endosomes tardifs (LE, 2). Les récepteurs et certains cargos rejoignent quant à eux la surface cellulaire par un processus de recyclage impliquant le passage par un endosome de recyclage (RE, 3). La fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes (L, 4) donne naissance à des endolysosomes (EL, 5) capables de dégrader les cargos internalisés et ensuite de reformer des lysosomes. Les molécules à dégrader peuvent également rejoindre les lysosomes par différents processus d'autophagie dont le mieux étudié est la macroautophagie. Cette dernière se caractérise par la séquestration, grâce à une double membrane, d'une partie du cytoplasme comprenant du matériel soluble mais aussi éventuellement des organites. Ce mécanisme conduit à la formation d'une structure vésiculaire à double membrane appelée autophagosome (AP, 6) qui fusionne ensuite avec un lysosome et forme ainsi un autolysosome. Les protéines endosomales et lysosomales néosynthétisées au niveau du réticulum endoplasmique et ensuite délivrées dans l'appareil de Golgi sont, quant à elles, envoyées à partir du TGN (7) vers les endosomes (dans des vésicules de transport recouvertes de clathrine) avant de rejoindre les lysosomes. Une petite fraction de ces protéines peut aussi être sécrétée constitutivement (8) et ensuite ré-internalisée par endocytose médiée par récepteur (adapté à partir de Luzio et al., 2014).

Les lysosomes, dont le pH est compris entre 4.5 et 5, se distinguent aussi des endosomes tardifs par un faible nombre de vésicules intra-luminales ainsi que par l'absence des récepteurs du mannose 6phosphate (MPR pour *Mannose* 6-*Phosphate Receptor*) dans leur membrane. Ces derniers assurent l'envoi des hydrolases acides vers les lysosomes à partir du TGN (leur rôle sera détaillé dans le chapitre 1.3). Alors que les récepteurs MPR peuvent être détectés dans les endosomes précoces ou tardifs ainsi que dans les endolysosomes, les lysosomes matures sont dépourvus de ces protéines membranaires [Saftig and Klumperman, 2009; Appelqvist et al., 2013; Klumperman and Raposo, 2014]. Pour terminer ce chapitre concernant l'endocytose médiée par récepteur, notons qu'environ trente minutes sont nécessaires pour que des cargos extracellulaires atteignent les (endo)lysosomes où se déroule la majorité des activités de dégradation [Saftig and Klumperman, 2009].

1.3. Le transport des hydrolases acides et des protéines membranaires vers les lysosomes

Comme expliqué précédemment, les lysosomes contiennent de nombreuses hydrolases acides et protéines membranaires lysosomales essentielles à leur fonctionnement. Ces protéines doivent être transportées vers cet organite après leur biosynthèse au niveau du réticulum endoplasmique. Après un passage par l'appareil de Golgi, ces protéines doivent donc pouvoir être reconnues par une ou plusieurs machineries de transport qui les dirigeront, par voie directe ou indirecte, vers les lysosomes.

1.3.1. La biosynthèse et la N-glycosylation des protéines lysosomales

La biosynthèse des glycoprotéines, dont font partie la grande majorité des hydrolases acides et des protéines transmembranaires lysosomales, débute au niveau de ribosomes associés à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux. Au cours de leur traduction, les protéines solubles qui possèdent un peptide signal N-terminal comprenant généralement 12 à 35 acides aminés subissent une translocation transmembranaire vers la lumière du réticulum endoplasmique grâce à un complexe protéique transmembranaire appelé translocon [Pfeffer et al., 2016]. Dans les protéines transmembranaires, un segment transmembranaire sert de signal d'initiation de la translocation. C'est de façon co-traductionnelle que débute la N-glycosylation, le type de glycosylation le plus courant qui prend place sur les protéines néo-synthétisées. Ainsi, une chaîne oligosaccharidique est transférée sur ces protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique grâce à l'action d'une oligosaccharyltransférase, un complexe protéique associé au translocon (Fig 4) [Ruiz-Canada et al., 2009; Welti, 2013]. Cette chaîne oligosaccharidique (N-glycan) est fixée de manière covalente sur la fonction amide de certaines asparagines situées dans une séquence tri-peptidique asparagine-Xsérine/thréonine. Dans ce signal de glycosylation, X peut être n'importe quel acide aminé à l'exception d'une proline. Les structures typiques des chaînes ajoutées sont Glc₃Man₉NAcGln₂, à savoir 3 résidus de glucose (Glc), 9 de mannose (Man) et 2 de N-acétylglucosamine (NAcGln). Ces chaînes oligosaccharidiques nouvellement ajoutées sur une protéine sont ensuite rapidement élaguées dans le réticulum endoplasmique par l'action de plusieurs α -glucosidases et d'une α -mannosidase jusqu'à l'obtention d'une chaîne Man₈NAcGln₂. Les glycoprotéines sont ensuite empaquetées dans des vésicules bourgeonnant à partir du réticulum endoplasmique pour être transportées vers le réseau cis de l'appareil de Golgi [Aebi, 2013].



Figure 4: *N*-glycosylation des protéines dans le réticulum endoplasmique. La formation d'une chaîne oligosaccharidique, composée de 3 unités de glucose, 9 de mannose et 2 de NAcGIn, est initiée dans le cytosol et terminée dans la lumière du réticulum endoplasmique. Cette chaîne, ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique (ER) par un lipide appelé dolichol phosphate, est ensuite transférée sur certains résidus asparagine (Asn) des protéines en cours de formation par une enzyme transmembranaire nommée oligosaccharyltransférase (adapté à partir de Cantagrel et al., 2010).

La majorité des chaînes oligosaccharidiques des protéines néo-synthétisées subit plusieurs étapes de maturation prenant place dans l'appareil de Golgi. Cette maturation peut donner naissance à des chaînes oligosaccharidiques de structures très variées puisque les étapes de modification peuvent être très différentes d'une protéine à l'autre. Il existe ainsi trois classes de *N*-glycans : les chaînes de type « haut-mannose », les chaînes « hybrides » et les chaînes « complexes » (Fig 5). Les premières citées sont des chaînes riches en mannose qui ont perdu les résidus de glucose et certains résidus mannose de la structure initiale Glc₃Man₉NAcGln₂ grâce à l'action de glucosidases et de mannosidases dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les chaînes complexes ont aussi perdu les unités de glucose et certains mannoses, mais sont caractérisées par l'ajout d'un ou plusieurs résidus NAcGln grâce à l'action de *N*-acétylglucosaminyltransférases. Le *N*-glycan qui en résulte peut ensuite être modifié par l'ajout d'autres sucres au niveau du « corps » de la chaîne ou par l'addition de résidus fucose, NAcGln, galactose ou acide sialique aux extrémités des branches grâce à d'autres glycosyltransférases. Les chaînes hybrides, quant à elles, sont caractérisées par la présence de ramifications similaires à des chaînes de type haut-mannose alors que d'autres ramifications possèdent la structure de chaînes complexes [Stanley et al., 2015].



Figure 5: Les trois classes des chaînes oligosaccharidiques liées aux asparagines (Asn). Les chaînes hautmannose sont uniquement constituées de résidus mannose fixés sur des unités *N*-acétylglucosamine (NAcGln). Les chaînes complexes sont caractérisées par la présence d'unités de fucose, de galactose, de NAcGln ou d'acide sialique à leur extrémité. Enfin, les chaînes hybrides possèdent des propriétés des structures de type hautmannose et complexe (adapté à partir de Sethi and Fanayan, 2015).

1.3.2. Les voies de transport des hydrolases acides dépendantes du mannose 6-phosphate

Une fois arrivées dans l'appareil de Golgi, la majorité des hydrolases acides glycosylées tel que décrit ci-dessus emprunte une voie de transport commune vers les lysosomes. Ce transport sélectif vers ce compartiment dépend de l'ajout d'un signal mannose 6-phosphate (Man-6-P) sur les chaînes hautmannose des hydrolases acides. Ce signal permet, au niveau du TGN, de distinguer ces hydrolases acides des glycoprotéines non-résidentes du lysosome. En effet, une protéine exposant ce signal sera spécifiquement reconnue par des récepteurs transmembranaires appelés récepteurs du Man-6-P, déjà évoqués précédemment. Ceux-ci assurent l'empaquetage des hydrolases acides dans des vésicules recouvertes de clathrine suite à l'interaction de leur région cytoplasmique avec des complexes adaptateurs de la clathrine tels que AP-1 (*Adaptor Protein complex* 1) ou les GGAs (*Golgi-localized, γ-ear containing, ADP-ribosylation factor binding*) [Takatsu et al., 2001; Ghosh and Kornfeld, 2004]. Ces vésicules délivrent leur cargo dans un endosome précoce ou tardif, permettant ainsi aux hydrolases de rejoindre les lysosomes.

L'ajout du signal Man-6-P sur les chaînes oligosaccharidiques des hydrolases acides prend place au sein du réseau *cis* de l'appareil de Golgi. La première étape de la synthèse de cette modification est le transfert d'un résidu NAcGIn-1-phosphate en position 6 d'un des mannoses d'un *N*-glycan de type haut-mannose (Fig 6). Cette réaction de transfert est catalysée par une enzyme appelée UDP-*N*acétylglucosamine 1-phosphotransférase (NAcGIn-1-phosphotransférase) [Kaplan et al., 1977; Tabas and Kornfeld, 1980; Waheed et al., 1982; Coutinho et al., 2012]. La reconnaissance du substrat par cette enzyme, dont dépend la spécificité du ciblage des protéines vers les lysosomes, semble être liée à des déterminants conformationnels contenant des résidus lysines présents dans la structure des hydrolases acides [Cuozzo and Sahagian, 1994]. En raison de la grande variété de structure des enzymes lysosomales, ces déterminants ne sont cependant probablement pas identiques d'une hydrolase acide à l'autre. Au niveau de la NAcGIn-1-phosphotransférase, différents domaines d'interaction aux enzymes lysosomales répartis dans les sous-unités α et γ ont été identifiés. Il a dès lors été suggéré que l'implication de ces différents sites diffère en fonction de l'hydrolase acide ciblée ce qui permettrait d'apporter une certaine flexibilité nécessaire à la liaison de substrats variés [van Meel, Lee, Liu et al., 2016; Qian, Flanagan-Steet et al., 2013]. Le résidu NAcGln terminal qui a été greffé par l'enzyme se voit ensuite éliminé par une phosphodiestérase, agissant comme une « enzyme de démasquage » (*uncovering enzyme*) [Varki and Kornfeld, 1981; Varki et al., 1983]. Au terme de cette réaction, les futures protéines lysosomales exposent donc un signal de reconnaissance Man-6-P, qui conditionnera leur transport sélectif vers le lysosome par liaison aux récepteurs du Man-6-P tel que décrit ci-dessus.



Figure 6: Illustration schématique de l'ajout de mannose 6-phophate sur les hydrolases acides lysosomales. Le processus débute par l'addition d'un résidu NAcGIn-1-phosphate sur le carbone 6 de certaines unités mannose des chaînes oligosaccharidiques de type haut-mannose à partir d'un UDP-NAcGIn. Cette réaction est catalysée dans le réseau *cis* de l'appareil de Golgi par une enzyme appelée UDP-*N*-acétylglucosamine 1-phosphotransférase. Dans un second temps, une phosphodiestérase dénommée *uncovering enzyme* élimine les résidus NAcGIn laissant en place un groupement phosphate en position de 6 de certains mannoses d'où l'apparition d'un motif Man-6-P.

Au cours de leur transport vers les lysosomes, de nombreuses hydrolases acides subissent des étapes de maturation. Celles-ci consistent généralement en des clivages protéolytiques à pH acide dans les endosomes et les lysosomes suite à l'action de protéases lysosomales. Dans la majorité des cas, ces étapes de maturation conditionnent l'apparition d'une forme plus active et/ou plus stable de l'hydrolase [Ishidoh and Kominami, 2002]. Par exemple, la forme précurseur inactive de la cathepsine D qui est synthétisée dans le réticulum endoplasmique subit une maturation protéolytique progressive au cours de son cheminement vers les lysosomes. Elle perd une petite séquence (pro-peptide) de 44 acides aminés lorsqu'elle arrive dans les endosomes. La forme qui résulte de ce clivage est appelée

forme intermédiaire et est active. Dans les lysosomes, un clivage libère une chaîne lourde et une chaîne légère qui demeurent associées et forment la cathepsine D mature la plus active. Les protéases cathepsines B et L ont été impliquées dans cette maturation progressive de la cathepsine D [Laurent-Matha et al., 2006].

La voie décrite ci-dessus correspond au transport « direct », dépendant du Man-6-P, des hydrolases acides depuis les compartiments biosynthétiques vers les lysosomes. Une fraction de la population d'hydrolases néosynthétisées peut aussi suivre un trajet alternatif, « indirect », pour rejoindre les lysosomes. Celui-ci concerne les hydrolases acides qui « échappent » à la liaison aux récepteurs du Man-6-P dont il existe deux formes, le CD-MPR (*Cation-Dependent Mannose 6-Phosphate Receptor*) et le CI-MPR (*Cation-Independent Mannose 6-Phosphate Receptor*). Par défaut, ces hydrolases suivent alors la voie de la sécrétion constitutive et se retrouvent dans le milieu extracellulaire. Elles peuvent néanmoins être ré-internalisées par endocytose et ainsi être acheminées jusqu'aux lysosomes. En effet, l'un des deux récepteurs du Man-6-P, le CI-MPR, est également localisé et actif au niveau de la membrane plasmique [Matsui and Kirchhausen, 1990; Coutinho et al., 2012]. Ce récepteur est principalement reconnu par le complexe adaptateur de la clathrine AP-2, le plus souvent par l'intermédiaire de motifs peptidiques présents dans sa région cytosolique [Jadot et al., 1992].

1.3.3. Les voies de transport des hydrolases acides indépendantes du mannose 6-phosphate

Alors que le transport, qu'il soit direct ou indirect, de la majorité des hydrolases acides lysosomales est dépendant du Man-6-P, l'existence de voies alternatives a été suggérée suite à des observations réalisées chez les patients atteints de mucolipidose de type II. Ces derniers présentent des mutations dans le gène codant pour la NAcGIn-1-phosphotransférase [Kornfeld and Sly, 2001]. L'activité de cette enzyme étant déficiente chez ces patients, le signal Man-6-P n'est pas ajouté sur les hydrolases acides qui ne sont, par conséquent, pas dirigées vers les lysosomes. Il en résulte une accumulation importante de matériel non dégradé dans ces organites, pauvres en hydrolases, ainsi qu'une sécrétion massive des hydrolases acides qui entrent par défaut dans la voie de la sécrétion constitutive une fois arrivées au niveau du TGN. De façon surprenante, malgré l'absence de signaux Man-6-P chez ces patients, certains types cellulaires tels que les lymphoblastes et les hépatocytes présentent des concentrations intracellulaires normales d'hydrolases acides [Owada and Neufeld, 1982; Little et al., 1987]. De même, il a été observé que les niveaux intracellulaires d'hydrolases acides sont normaux voire plus élevés dans le cerveau, le foie et plusieurs autres organes du modèle murin de la mucolipidose de type II [Boonen, van Meel et al., 2011]. Ces observations indiquent ainsi l'existence, au moins dans certains types cellulaires, de voies de transport des hydrolases lysosomales fonctionnant indépendamment du Man-6-P.

Au cours des années, différents récepteurs alternatifs de transport des hydrolases acides ont été décrits (Fig 7). Parmi ceux-ci, un des récepteurs les mieux connus est une protéine transmembranaire appelée LIMP2 (*Lysosome Membrane Protein* 2) qui permet de transporter la β-glucocérébrosidase,

une enzyme lysosomale très peu modifiée par le Man-6-P [Little et al., 1987; Reczek et al., 2007]. Un autre récepteur qui a été découvert est la sortiline, une protéine transmembranaire capable de transporter plusieurs hydrolases vers les lysosomes à partir du TGN ou de la membrane plasmique dans certains types cellulaires [Ni and Morales, 2006; Canuel et al., 2008]. Récemment, une voie de transport alternative impliquant un récepteur appelé SEZ6L2 (Seizure Related 6 homolog Like 2) a été identifiée. Exprimée dans le cerveau, la protéine SEZ6L2 participe au transport de la pro-cathepsine D vers les endosomes [Boonen et al., 2016]. Enfin, les récepteurs de la famille des récepteurs aux LDL (Low Density Lipoproteins), LRP1 et LRP2 (LDL Receptor-related Protein), sont impliqués dans le transport lysosomal de différentes cathepsines et de l' α -galactosidase [Christensen et al., 2007; Markmann, Thelen et al., 2015]. Malgré ces descriptions récentes de récepteurs Man-6-P indépendants impliqués dans le transport d'hydrolases acides, des mécanismes alternatifs de ciblage vers les lysosomes restent encore à élucider. En effet, contrairement aux récepteurs du Man-6-P, les voies alternatives de transport décrites ci-dessus sont très sélectives et ne concernent généralement qu'un nombre limité d'enzymes et de types cellulaires. Il semble dès lors peu probable que ces mécanismes alternatifs de transport des hydrolases puissent rendre compte de la diversité de l'arsenal hydrolytique retrouvé dans les lysosomes de certaines cellules dépourvues d'activité NAcGIn-1phosphotransférase [Little et al., 1987].

Il faut toutefois noter qu'un récepteur qui pourrait être impliqué dans le transport lysosomal de plusieurs hydrolases acides à partir du milieu extracellulaire est le récepteur au mannose (MRC1 ou *Mannose Receptor C-type* 1), du moins dans les cellules qui expriment ce récepteur. En effet, celui-ci est capable d'internaliser des enzymes portant des chaînes oligosaccharidiques contenant des résidus NAcGln ou mannose à leur extrémité [Lennartz et al., 1987]. Le récepteur au mannose jouerait ainsi un rôle important dans la capture d'hydrolases acides circulantes et dans leur adressage vers les lysosomes au niveau des cellules non parenchymateuses du foie [Hubbard et al., 1979; Achord et al., 1978]. Son expression n'étant pas ubiquiste, l'implication du récepteur au mannose dans le ciblage lysosomal des enzymes semble néanmoins être restreinte à certains types cellulaires. Ces derniers correspondent aux macrophages, cellules dendritiques, endothéliales et lymphatiques mais également à des cellules spécialisées comme les cellules mésengiales ou les cellules musculaires lisses de la trachée [Martinez-Pomares, 2012].



Figure 7: Représentation schématique de récepteurs alternatifs au Man-6-P. Sept récepteurs alternatifs aux MPR ont été identifiés à ce jour. Contrairement aux MPR qui reconnaissent l'ensemble des hydrolases acides ou presque, la plupart de ces récepteurs alternatifs ne sont capables d'assurer le ciblage que d'un nombre restreint d'hydrolases acides (indiquées au-dessus de chaque récepteur sur le schéma). La région cytosolique de ces récepteurs contient généralement des motifs de reconnaissance par des adaptateurs de la clathrine de type tyrosine ou dileucine (voir le chapitre sur le ciblage des protéines transmembranaires). Le récepteur au mannose est un cas particulier puisqu'il est capable d'endocyter l'ensemble des soixante hydrolases acides qui sont porteuses de résidus mannose ou NAcGln. L'internalisation du récepteur au mannose dépend d'une séquence FENTLY présente dans sa portion cytosolique (schéma adapté à partir de Staudt, Puissant et al., 2016).

1.3.4. Les voies de transport des protéines membranaires lysosomales

Tout comme les hydrolases acides, les protéines membranaires lysosomales néosynthétisées qui arrivent au niveau du TGN doivent ensuite être dirigées vers les lysosomes par une voie directe ou éventuellement indirecte [Bonifacino and Traub, 2003; Braulke and Bonifacino, 2009]. La plupart de ces protéines possèdent dans leur région cytoplasmique des motifs dits « dileucine », qui sont de type D/EXXXLL/I, et/ou des motifs dits « tyrosine » (NPXY ou YXX¢, dans lesquels X peut être n'importe quel acide aminé et ϕ est un acide aminé hydrophobe volumineux) [Obermüller et al., 2002; Steenhuis et al., 2010]. Il en est de même pour les récepteurs du Man-6-P qui contiennent un motif dileucine de type DXXLL et un motif tyrosine YXX (Johnson and Kornfeld, 1992; Honing et al., 1997; Ghosh and Kornfeld, 2004; Dahms et al., 2008]. Ces signaux d'adressage sont reconnus par des protéines adaptatrices telles que AP-1, AP-2 et les protéines GGAs qui recrutent ensuite de la clathrine [Takatsu et al., 2001; Nakatsu et al., 2003]. Ce processus conduit à l'entrée des protéines membranaires lysosomales dans des vésicules recouvertes de clathrine qui se forment au niveau du TGN (où les motifs dileucine et tyrosine de type YXX¢ sont reconnus par AP-1 et des GGAs) ou au niveau de la membrane plasmique (suite à la reconnaissance des motifs dileucine ou tyrosine par AP-2 ou par d'autres adaptateurs qui ne seront pas développés ici). Les protéines transmembranaires des lysosomes peuvent ainsi rejoindre ces organites par une voie directe à partir du TGN vers les endosomes ou indirecte au cours de laquelle les protéines rejoignent d'abord la membrane plasmique avant d'être dirigées vers les lysosomes par endocytose [Bonifacino and Traub, 2003; Braulke and Bonifacino, 2009].

Alors que le transport de nombreuses protéines membranaires lysosomales dépend des motifs conventionnels tyrosine et dileucine, de plus en plus de voies alternatives ont été mises en évidence ces dernières années. Certaines protéines contiennent des motifs dileucine et tyrosine atypiques, voire des motifs qui ne contiennent pas ces acides aminés (les motifs et les voies de transport atypiques sont repris dans la Table 1 de l'article de revue que nous avons publié en 2016 et qui est inclus en annexe). Par exemple, les motifs YFPQA et KSASNP respectivement rencontrés dans la cystinosine et MLN64 (Metastatic Lymph Node 64) contrôlent leur transport lysosomal [Cherqui et al., 2001; Liapis et al., 2012]. Il a également été démontré que le ciblage lysosomal peut dépendre de modifications posttraductionnelles, telles que des prénylations ou des palmitoylations, ou de signaux d'adressage présents dans les domaines transmembranaires comme c'est le cas de la région TMD0 d'ABCB6 (ATP Binding Cassette subfamily B member 6) et ABCB9 (ATP Binding Cassette subfamily B member 9) [Demirel, Bangert et al., 2010; Kiss et al., 2015; Staudt, Puissant et al., 2016]. L'interaction avec des protéines présentant des motifs d'adressage peut aussi être nécessaire au ciblage de certaines protéines membranaires lysosomales, elles-mêmes dépourvues de signaux de recrutement d'adaptateurs de la clathrine. Ce transport médié par association à un autre partenaire protéique est par exemple décrit dans le cas du transporteur ABCD4 (ATP Binding Cassette subfamily D member 4) dont le trafic est dépendant de son association avec la protéine lysosomale LMBD1 (LMBR1 Domaincontaining protein 1) qui contient un motif de type tyrosine classique [Kawaguchi, Okamoto et al., 2016]. Il est à noter que le transport des protéines lysosomales peut aussi avoir lieu dans des vésicules dépourvues de clathrine [Pols et al., 2013]. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces voies indépendantes de la clathrine restent cependant imprécis à ce stade.

1.4. Les lysosomes spécialisés

A côté des lysosomes « classiques » décrits ci-dessus, il est intéressant de noter que certains types cellulaires contiennent des lysosomes dits « spécialisés », souvent désignés sous le terme de lysosomes de sécrétion. Ces types cellulaires dérivent pour la plupart de la lignée hématopoïétique, avec quelques exceptions dont les mélanocytes [Blott and Griffiths, 2002; Luzio et al., 2014]. Les lysosomes de sécrétion sont, contrairement à des lysosomes classiques, largement impliqués dans un processus de sécrétion régulée. Ils présentent aussi un contenu légèrement différent des lysosomes classiques en ce sens qu'une ou plusieurs protéines destinées à la sécrétion y sont stockées en grande quantité. La nature de ces protéines et la fonction précise des lysosomes spécialisés dépend du type cellulaire. Par exemple, la sécrétion de ces compartiments à partir des lymphocytes T cytotoxiques permet de libérer de larges quantités de protéines cytolytiques comme la perforine et les granzymes qui peuvent induire

la mort de cellules cibles [Peters et al., 1991]. Les mélanosomes sont un autre type de lysosomes spécialisés qui sont transférés des mélanocytes vers les kératinocytes ce qui permet, grâce à la mélanine qu'ils contiennent, de pigmenter la peau, les cheveux et les yeux [Orlow et al., 1995]. Les ostéoclastes, cellules qui résorbent la matrice osseuse, contiennent eux aussi de nombreux lysosomes de sécrétion qui sont, quant à eux, riches en cathepsine K et TRAP (*Tartrate-Resistant Acid Phosphatase*), deux enzymes impliquées dans la résorption de la matrice osseuse [van Meel, Boonen et al., 2011]. Nous reparlerons de ce point plus en détail dans un chapitre consacré aux ostéoclastes.

Il a pu être montré que certaines protéines telles que les granzymes ou la cathepsine K accèdent aux lysosomes de sécrétion en empruntant la voie classique du Man-6-P [Burkhardt et al., 1989; van Meel, Boonen et al., 2011]. Cependant, le transport de toutes les protéines présentes dans ces organites n'est pas dépendant du Man-6-P. En effet, il a par exemple été rapporté que le ciblage de la cytolysine vers les granules lytiques des lymphocytes T cytotoxiques ne dépendrait pas de la voie du Man-6-P. Comme cela a été décrit pour les lysosomes conventionnels, des voies de transport alternatives vers les lysosomes de sécrétion semblent donc aussi exister [Burkhardt et al., 1989]. Il est intéressant de noter que, dans les mélanocytes et les ostéoclastes notamment, les deux types de lysosomes, conventionnels et de sécrétion, coexistent [van Meel, Boonen et al., 2011; Raposo et al., 2001].

1.5. Les dysfonctions des lysosomes

Etant donné le rôle particulièrement important des lysosomes dans l'homéostasie cellulaire, un dysfonctionnement de ces organites peut avoir des conséquences importantes sur la fonction des cellules. En effet, une mutation dans une des protéines impliquées dans le fonctionnement des lysosomes, telle qu'une hydrolase acide, un transporteur lysosomal ou encore l'enzyme responsable de la synthèse du Man-6-P, peut mener à une accumulation progressive de matériel, non dégradé ou non exporté, dans la lumière lysosomale (Fig 8). Cette surcharge dite primaire conduit souvent à l'apparition d'une accumulation secondaire d'autres molécules en raison de la perturbation globale de l'environnement lysosomal causée par la surcharge primaire. Ces accumulations anormales de matériel perturbent le trafic membranaire dans le système endolysosomal, l'homéostasie du calcium, diverses voies de signalisation ou encore la perméabilisation de la membrane lysosomale. Ces altérations mènent à des dommages cellulaires irréversibles pouvant causer un dysfonctionnement au niveau d'un ou plusieurs organes. La perturbation du fonctionnement des lysosomes due à la surcharge affecte notamment le processus d'autophagie qui, pour rappel, assure la dégradation de macromolécules et organites intracellulaires dysfonctionnels. La surcharge tertiaire qui résulte de cette dysfonction de l'autophagie amplifie l'accumulation de matériel et participe notamment à la neurodégénérescence en raison de l'accumulation d'agrégats protéiques toxiques et d'organites. L'absence de clairance de ces derniers est source de dommages cellulaires puisque, par exemple, des mitochondries dysfonctionnelles peuvent provoquer un stress oxydatif. Ces pathologies appelées « maladies de surcharge lysosomale » présentent une prévalence combinée de 1 sur 8000 naissances et regroupent plus de 50 maladies génétiques distinctes. Les symptômes sont variables selon l'origine de la maladie mais les patients présentent souvent une atteinte neurologique qui peut s'accompagner notamment d'hépatosplénomégalie ainsi que de problèmes cardiaques ou squelettiques [Settembre et al., 2013; Platt et al., 2018].



Figure 8: Mécanismes du développement pathologique des maladies de surcharge lysosomale. Ces maladies se caractérisent par l'accumulation, dans la lumière lysosomale, soit de macromolécules non dégradées soit de catabolites monomériques, provoquée respectivement par une déficience enzymatique ou par une mutation dans un transporteur membranaire. Cette surcharge dite primaire est souvent, elle-même, responsable de l'apparition d'une accumulation secondaire d'autres molécules. Les lipides, dont le cholestérol, sont fréquemment accumulés de façon secondaire dans les divers types de maladies de surcharge lysosomale. Les mécanismes menant à cette surcharge secondaire varient probablement en fonction de la protéine déficiente à l'origine de la pathologie. Ils pourraient néanmoins être associés à une altération de l'export de lipides à partir des lysosomes ou encore à l'inhibition d'autres hydrolases acides, parmi lesquelles des lipases, en raison de la perturbation de l'environnement lysosomal par la surcharge primaire. Enfin, une surcharge tertiaire, caractérisée par l'accumulation d'agrégats cytosoliques et d'organites dysfonctionnels, peut également se mettre en place en raison d'une perturbation de la reformation des lysosomes et de l'autophagie. Tous ces niveaux de surcharge perturbent la régulation du calcium, les voies de signalisation ou encore l'intégrité de la membrane lysosomale, ce qui induit des dysfonctionnements cellulaire et tissulaire qui réduisent souvent fortement l'espérance de vie des patients (adapté à partir de Platt et al., 2012).

De nombreuses maladies de surcharge lysosomales sont provoquées par une mutation dans un gène codant pour une hydrolase acide qui ne peut plus exercer son activité de dégradation vis-à-vis de macromolécules spécifiques. Celles-ci s'accumulent alors dans les lysosomes. Des mutations dans les enzymes responsables de la dégradation de sphingolipides, gangliosides ou glycoprotéines sont par exemple respectivement responsables de l'apparition de sphingolipidose, gangliosidose ou glycoprotéinose (voir Table 1 en annexe) [Ferreira and Gahl, 2017; Platt et al., 2018]. Les mucopolysaccharidoses (MPS pour mucopolysaccharidosis) sont un autre type de maladies de surcharge lysosomale, caractérisées par une déficience dans une enzyme responsable de la dégradation de glycosaminoglycanes (GAG pour glycosaminoglycan), également appelés mucopolysaccharides. Les mucopolysaccharidoses se caractérisent souvent par une atteinte musculosquelettique bien que d'autres symptômes tels qu'une organomégalie ou un retard mental puissent apparaître également. A l'heure actuelle, onze types de mucopolysaccharidoses différents ont été identifiés (voir Table 1 en annexe) allant de la MPS I, caractérisée par une accumulation de sulfate d'héparane et de dermatane, à la MPS IX qui est due à une déficience en HYAL1, hyaluronidase impliquée dans le catabolisme de l'acide hyaluronique (HA pour Hyaluronic Acid) [Cimaz and La Torre, 2014; Coutinho et al., 2015].

A côté des maladies de surcharge lysosomales causées par une mutation dans une enzyme de dégradation, certains types de surcharges peuvent être provoqués par une déficience en une protéine transmembranaire lysosomale. La cystinose est un exemple de pathologie causée par l'inactivation du transporteur membranaire de la cystine appelé cystinosine, ce qui a pour effet d'induire une accumulation de ce composé dans la lumière lysosomale [Elmonen et al., 2016]. Enfin, une déficience dans une protéine non lysosomale mais qui contribue au fonctionnement de cet organite peut aussi mener au développement d'une maladie de surcharge lysosomale comme c'est le cas dans la mucolipidose de type II. Tel que mentionné précédemment, la déficience en NAcGln-1-phosphotransférase, enzyme du réseau *cis* de l'appareil de Golgi indispensable à l'ajout du signal Man-6-P sur les hydrolases acides, empêche l'envoi de celles-ci vers les lysosomes dans de nombreux types cellulaires [Little et al., 1987].

Pour terminer ce chapitre, il est intéressant de mentionner que le terme de maladie lysosomale s'est quelque peu étendu au-delà des maladies de surcharge décrites ci-dessus. Il est maintenant établi qu'un dysfonctionnement lysosomal est aussi au cœur des perturbations cellulaires observées dans des maladies neurodégénératives communes, telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer ou d'Huntington. Tout d'abord, des mutations dans des gènes codant pour des protéines lysosomales ont été détectées chez des patients ayant développé ces pathologies. Par exemple, des mutations hétérozygotes dans le gène codant pour la β -glucocérébrosidase semblent prédisposer à l'apparition de la maladie de Parkinson alors que les patients homozygotes pour des mutations dans cette même protéine développent une maladie de surcharge lysosomale appelée maladie de Gaucher [Sidransky et al., 2009]. Par ailleurs, un dysfonctionnement du processus d'autophagie contribue à l'accumulation d'agrégats toxiques d' α -synucléine et de huntingtine qui se forment respectivement dans les neurones en cas de maladie de Parkinson et de maladie de Huntington [Martinez-Vicente, Talloczy, Wong et al., 2010]. La stimulation de la fonction lysosomale et autophagique permet d'ailleurs de diminuer l'accumulation de ces agrégats [Cuervo et al., 2004; Jeong, Then et al., 2009]. Cette découverte pourrait être très intéressante pour la mise au point de nouveaux traitements contre les maladies de surcharge lysosomale ou les maladies neurodégénératives associées à une dysfonction lysosomale [Settembre et al., 2013]. En effet, bien que des traitements spécifiques aient été approuvés pour une dizaine de maladies de surcharge lysosomale, leur prise en charge thérapeutique reste très limitée dans la plupart des cas [voir table 1 de l'annexe; Ferreira and Gahl, 2017; Platt et al., 2018].

Une piste thérapeutique intéressante qui est explorée actuellement par les équipes de Sabatini et Ballabio est de cibler le facteur de transcription EB (TFEB pour Transcription Factor EB). Ce dernier se fixe sur une séquence consensus de 10 paires de bases appelée CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression And Regulation) située dans la région promotrice de près de 400 gènes. Parmi ceux-ci se trouvent la majorité des protéines lysosomales ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans l'autophagie ou sa régulation [Sardiello et al., 2009; Palmieri et al., 2011]. Lors d'une situation de jeûne par exemple, le complexe mTORC1 évoqué au début du chapitre 1 active TFEB par déphosphorylation. TFEB est alors transloqué dans le noyau où il induit l'expression du réseau de gènes CLEAR et, par conséquent, augmente le potentiel de dégradation de matériel dans les lysosomes. La situation de jeûne est ainsi atténuée, suite à la libération de nouveaux produits de dégradation, dont des acides aminés, qui pourront être utilisés dans des réactions de l'anabolisme [Settembre and Ballabio, 2011a]. Dans le cadre des maladies de surcharge lysosomale, il a été remarqué qu'une surexpression de TFEB dans des cellules isolées de patients atteints de ces maladies, par transfection par exemple, permet d'augmenter la clairance du matériel accumulé. Cette élimination du matériel accumulé serait en partie liée à la stimulation du catabolisme dans les lysosomes mais également à l'exocytose du contenu des lysosomes surchargés. Ce processus débuterait par le recrutement des lysosomes au niveau de la périphérie cellulaire suivi de la fusion des membranes plasmique et lysosomale grâce à la libération intracellulaire de calcium à partir de la lumière lysosomale par le biais du canal ionique mucolipine 1 (MCOLN1 ou *mucolipin* 1) [Medina, Fraldi et al., 2011]. Sur base de ces observations, plusieurs groupes ont décidé de tester si une activation de TFEB dans des modèles murins de maladies de surcharge lysosomale ou neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson pourrait permettre d'améliorer l'état de santé de ces animaux [Gatto et al., 2017; Torra et al., 2018]. Plusieurs molécules activatrices ont déjà été testées, dont le tréhalose ou la curcumine, et se révèlent être prometteuses. En effet, un traitement avec du tréhalose, un disaccharide naturel, sur des modèles murins de sclérose latérale amyotrophie ainsi que des maladies de Parkinson ou de Huntington améliore la survie des animaux grâce à une activation de l'autophagie via TFEB [Rusmini et al., 2018]. Un effet similaire a été observé suite à un traitement avec de la curcumine sur des souris atteintes de la maladie de Niemann-Pick de type C1, une maladie de surcharge lysosomale causée par des mutations dans un transporteur membranaire lysosomal appelé NPC1 (NPC intracellular cholesterol transporter 1) [Lloyd-Evans et al., 2008; Thayyullathil et al., 2014].
2.1. Les propriétés et les fonctions de l'acide hyaluronique

2.1.1. Les glycosaminoglycanes

L'acide hyaluronique (HA), ou *hyaluronan*, fait partie de la famille des glycosaminoglycanes (GAG). Présents chez tous les vertébrés et de nombreux invertébrés, les GAGs linéaires sont formés de répétitions d'unités disaccharidiques composées d'une hexosamine et d'un acide uronique (ou d'un galactose). Les GAGs sont synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi et peuvent être modifiés par sulfatation ou phosphorylation. Chargés négativement au pH physiologique, ces polysaccharides peuvent également se lier de façon covalente à des protéines formant ainsi des protéoglycanes. Chez les vertébrés, les différents types de GAGs sont l'héparine, le sulfate d'héparane, le sulfate de chondroïtine, le sulfate de dermatane, le sulfate de kératane et l'HA (Table 1) [Taylor and Gallo, 2006; Yamada et al., 2011].

Glycosaminoglycane	Acide uronique	Hexosamine	Lien glycosidique dans les disaccharides
Héparine	Souvent acide iduronique	N-acétylglucosamine	$\alpha 1 \rightarrow 4$
Sulfate d'héparane	Souvent acide glucuronique	N-acétylglucosamine	$\alpha 1 \rightarrow 4$
Sulfate de chondroïtine	Acide glucuronique	N-acétylgalactosamine	β 1 \rightarrow 3
Sulfate de dermatane	Souvent acide iduronique	N-acétylgalactosamine	$\beta 1 \rightarrow 3$
Sulfate de kératane	Galactose	N-acétylglucosamine	$\beta 1 \rightarrow 4$
Acide hyaluronique	Acide glucuronique	N-acétylglucosamine	$\beta 1 \rightarrow 3$

Table 1 : Tableau récapitulatif des six types de glycosaminoglycanes (GAG)

2.1.2. Les propriétés de l'acide hyaluronique

Purifié pour la première fois à partir d'humeur vitrée bovine [Meyer and Palmer, 1934], l'HA est présent dans presque chaque tissu de tous les vertébrés bien qu'il soit particulièrement abondant dans la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Chez les mammifères, une forte concentration d'HA est retrouvée dans la peau mais également dans le liquide synovial, le cordon ombilical et l'humeur vitrée [Fraser et al., 1997; Girish and Kemparaju, 2007]. L'HA est un membre de la famille des GAGs un peu particulier notamment en raison de la simplicité de sa structure. En effet, les chaînes polysaccharidiques de l'HA ne sont pas modifiées par des sulfatations et ne forment pas de liaison covalente avec des protéines. En outre, contrairement aux autres GAGs qui sont synthétisés au niveau de l'appareil de Golgi, la biosynthèse de l'HA se déroule au niveau de la face interne de la membrane plasmique [Itano, Kimata, 2002b]. La masse moléculaire de l'HA diffère également des autres GAGs dont la taille est généralement limitée à 50 x 10^3 Da. En comparaison, la taille moyenne de l'HA varie entre 10^5 Da et 10^7 Da. Dans le liquide synovial où il est particulièrement abondant, la masse moléculaire moyenne de l'HA est de 7 x 10^6 Da, soit environ 25 000 unités disaccharidiques [Fraser et al., 1997]. Concernant sa structure, l'HA est composé de répétitions d'unités disaccharidiques composées d'acide glucuronique et de *N*-acétylglucosamine (NAcGln) qui sont reliés par des liaisons glycosidiques β 1-3. Précisons que les disaccharides sont connectés entre eux par des liens β 1-4 (Fig 9).



Figure 9: Structure chimique de l'acide hyaluronique. Ce dernier est un polymère de disaccharides composés de d'acide glucuronique (GlcUA pour *Glucuronic Acid*) et de *N*-acétylglucosamine (NAcGln) connectés entre eux par des liens β 1-3. Les unités disaccharidiques sont elles-mêmes reliées entre elles par des liaisons glycosidiques β 1-4. La taille de l'HA est très variable, pouvant atteindre 25 µm, ce qui correspond à environ 25 000 unités disaccharidiques (adapté à partir de Hascall and Esko, 2009).

2.1.3. Les fonctions de l'acide hyaluronique

Au cours de sa biosynthèse, l'HA est exporté vers le milieu extracellulaire où il pourra remplir diverses fonctions. Grâce à ses propriétés biochimiques et biophysiques, les molécules d'HA seules peuvent jouer plusieurs rôles. Ainsi, une des propriétés particulièrement importantes de l'HA est sa viscoélasticité. En effet, la grande capacité de l'HA à lier l'eau permet notamment d'hydrater les tissus et d'améliorer leur capacité à absorber des chocs [Cowman et al., 2015]. Par ailleurs, l'HA est essentiel à l'assemblage et au maintien de la structure des matrices extracellulaires. A côté de cela, l'HA remplit diverses fonctions biologiques grâce à son interaction avec d'autres molécules, que ce soit au niveau intracellulaire ou extracellulaire. Il est à noter que, étant donné sa très grande taille, un seul polymère d'HA peut se lier à des centaines de molécules. Au niveau de la surface cellulaire, l'HA peut interagir avec des récepteurs et intervenir principalement dans trois processus. Premièrement, l'HA participe à la formation d'un manteau qui entoure certaines cellules et leur permet notamment d'interagir avec leur environnement. Deuxièmement, la liaison de l'HA avec des récepteurs membranaires est

impliquée dans l'induction de son internalisation en vue de sa dégradation intracellulaire. Troisièmement, l'interaction de l'HA avec des récepteurs à la surface des cellules participe à la transduction de signaux intracellulaires [Girish and Kemparaju, 2007; Dicker et al., 2014]. Par ce mécanisme, l'HA est par exemple capable d'activer la voie PI3K - Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase – protein kinase B*) qui promeut notamment la survie et la motilité cellulaire [Itano et al., 2002a]. Précisons que l'HA est connu pour être impliqué dans la migration, l'adhésion, la prolifération, la différenciation cellulaire ou encore le développement embryonnaire, l'angiogenèse et le cancer [Heldin, 2003; Spicer and Tien, 2004; Genasetti et al., 2008; Rankin and Frankel, 2016]. Bien que l'HA soit majoritairement localisé dans les matrices extracellulaires, il est également présent dans le cytoplasme et le noyau des cellules [Hascall et al., 2004]. Il est aussi important de souligner que les effets de l'HA peuvent varier en fonction de sa masse moléculaire, allant jusqu'à être opposés. Un exemple bien connu est l'inflammation qui est inhibée par l'HA de haute masse moléculaire mais stimulée par des fragments de petite taille [Litwiniuk et al., 2016].

2.2. La synthèse de l'acide hyaluronique

La biosynthèse de l'HA est catalysée par des isoenzymes transmembranaires appelées *Hyaluronic Acid Synthases* (HAS). Ces glycosyltransférases ont la particularité de contenir deux domaines catalytiques permettant d'ajouter alternativement un acide glucuronique et un NAcGln à l'extrémité réductrice de la chaîne en formation à partir d'uridine diphosphate acide glucuronique (UDP-GlcUA) et d'uridine diphosphate *N*-acétylglucosamine (UDP-NAcGln). Au cours de sa synthèse au niveau de la face interne de la membrane plasmique, l'extrémité non-réductrice de l'HA est exportée vers le milieu extracellulaire [Itano, Kimata, 2002b; Dicker et al., 2014; Weigel, 2015]. Il a été proposé que le récepteur MRP5 (*Multidrug Resistance-associated Protein* 5) de la famille des transporteurs ABC soit impliqué dans cette extrusion [Prehm and Schumacher, 2004]. Toutefois, ce mécanisme de transport est controversé puisque de nombreux auteurs estiment que l'HA serait plutôt sécrété à travers un pore transmembranaire formé par un complexe composé des HAS elles-mêmes et de lipides [Weigel, 2015].

Il existe trois isoformes de synthases différentes actives indépendamment l'une de l'autre: HAS1, HAS2 et HAS3. L'expression des gènes codant pour ces enzymes, situés sur des chromosomes différents, varie selon le type cellulaire et le développement [Spicer et al., 1997; Itano, Kimata, 2002b]. Bien que les vitesses maximales des trois HAS soient similaires, leurs propriétés enzymatiques présentent certaines différences. En effet, HAS1 est l'isoforme possédant l'affinité pour ses substrats la plus faible. HAS3 produit des chaînes polysaccharidiques de plus petite taille qu'HAS1 et HAS2. Ainsi, la masse moléculaire de l'HA synthétisé par HAS3 se situe entre 10⁵ et 10⁶ Da alors que celle de l'HA produit par HAS1 et HAS2 peut dépasser 2 x 10⁶ Da [Itano et al., 1999]. Outre des différences au niveau des séquences protéiques des HAS, qui partagent entre 50 et 70 % d'homologie, il a été proposé que ces variations d'activité découlent de modifications post-traductionnelles différentes, notamment au niveau d'O-N-acétylglucosaminylations. L'environnement intracellulaire et des molécules accessoires pourraient également intervenir dans la régulation de l'activité des HAS [Vigetti, Deleonibus et al., 2012; Baggenstoss et al., 2017].

2.3. Les hyaladhérines

Plusieurs rôles biologiques de l'HA dépendent de son interaction avec des hyaladhérines, également appelées *Hyaluronic Acid Binding Proteins* (HABP). Ces dernières sont un groupe hétérogène de protéines qui peuvent être classifiées selon leur site de liaison à l'HA ou leur localisation.

2.3.1. Les hyaladhérines extracellulaires

Les hyaladhérines extracellulaires correspondent à des protéines liant l'HA et qui participent à son interaction avec des protéoglycanes. Les hyaladhérines peuvent être considérées comme faisant partie intégrante des protéoglycanes ou non. L'interaction de l'HA à ces protéoglycanes permet la rétention de ces derniers dans les matrices extracellulaires et est, par conséquent, un élément majeur pour le maintien de la structure de ces matrices. Grâce à sa très grande taille, l'HA est capable de relier de nombreux protéoglycanes entre eux. C'est par exemple le cas dans le cartilage où une seule chaîne d'HA permet d'assembler entre elles de nombreuses molécules d'aggrécanes, le protéoglycane majeur de ce tissu. La formation de ces agrégats est un des phénomènes responsables de la résistance du cartilage à la compression [Girish and Kemparaju, 2007; Dicker et al., 2014].

2.3.2. Les hyaladhérines cellulaires

Les hyaladhérines peuvent également être cellulaires et remplir la fonction de récepteurs de l'HA.

Le **CD44** (*Cluster of Differentiation* 44) est une glycoprotéine transmembranaire de type I considéré comme le principal récepteur de l'HA [Aruffo et al., 1990]. Exprimé de façon ubiquiste, CD44 existe sous de nombreuses isoformes différentes résultant d'épissages alternatifs de son ARNm [Screaton et al., 1992]. Ce phénomène module la liaison du CD44 à l'HA ainsi que son activité. Le niveau de glycosylation et d'oligomérisation du récepteur influencent également sa capacité de liaison à l'HA [Lesley et al., 1993; Lesley et al., 1995]. Le CD44 est connu pour être impliqué dans de nombreux processus, physiologiques ou pathologiques. Tout d'abord, avec la participation d'HYAL2, une enzyme impliquée dans le catabolisme de l'HA, le CD44 est capable de lier l'HA dans des régions de la membrane plasmique enrichies en cavéoles. Il en résulterait une internalisation de l'HA en vue de sa dégradation intracellulaire ce qui sous-tend un rôle du CD44 dans le catabolisme local de l'HA (ce point sera développé plus loin) [Hua et al., 1993; Stern, 2003; Bourguignon et al., 2004]. De par son interaction avec de l'HA présent dans les matrices extracellulaires, le CD44 participe également à des

processus physiologiques tels que l'adhésion, l'agrégation ou la migration cellulaire [Ponta et al., 2003; Girish and Kemparaju, 2007]. Par ailleurs, l'activation du CD44 par sa liaison avec l'HA peut provoquer la transduction de signaux intracellulaires, comme la stimulation de la voie PI3K - Akt (*phosphatidylinositol 3-kinase – protein kinase B*), qui vont eux-mêmes influencer divers processus physiologiques [Ponta et al., 2003; Girish and Kemparaju, 2007]. Le CD44 participe également au développement de pathologies telles que l'inflammation puisque son interaction avec l'HA semble notamment favoriser le recrutement de neutrophiles et de macrophages. En outre, le CD44 est connu pour être impliqué dans la pathologie du cancer. En effet, la stimulation du récepteur par de l'HA semble capable de moduler les processus d'adhésion, de migration et de survie des cellules cancéreuses ainsi que leur expression de transporteurs de médicaments ou leur activation de la transition épithélio-mésenchymateuse [Misra et al., 2015].

RHAMM (*Receptor for Hyaluronan Mediated Motility*) est un autre récepteur de l'HA dont l'expression relativement faible en condition normale est régulièrement augmentée dans différents types de lésions ou de cancers avancés. En fonction de l'épissage alternatif de ses transcrits, RHAMM peut être localisé dans le noyau, le cytoplasme ou en surface cellulaire. Au niveau intracellulaire, la liaison de l'HA avec RHAMM provoque son interaction avec des microtubules, des filaments d'actine ou le fuseau mitotique et favorise la mitose, probablement par une modification de l'assemblage de ce fuseau mitotique [Turley, 1982; Maxwell et al., 2008; Vigetti et al., 2014]. En surface cellulaire, l'association de RHAMM avec le CD44 participe à la transduction de signaux induits par la liaison à l'HA [Hamilton et al., 2007]. La formation d'un complexe RHAMM-CD44-HA est par exemple capable de stimuler la voie MAPK - ERK1,2 (*Mitogen-Activated Protein Kinase - Extracellular signal-Regulated Kinase* 1,2) qui augmente la survie et la motilité cellulaires.

Le récepteur **LYVE-1** (*Lymphatic Vessel Endothelial hyaluronan receptor* 1) est une glycoprotéine transmembranaire exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et du foie ainsi que par certains macrophages et cellules réticulaires des ganglions lymphatiques [Mouta Carreira et al., 2001; Wróbel et al., 2005]. Cette protéine présente une forte homologie de structure avec le CD44. La liaison de LYVE-1 à l'HA peut être régulée par des modifications post-traductionnelles. En effet, la présence d'acides sialiques sur des chaînes oligosaccharidiques liées à des résidus thréonine ou sérine, appelées O-glycosylations, inhibe l'interaction du récepteur avec son ligand alors qu'un effet inverse a été observé en présence de *N*-glycosylations [Nightingale et al., 2009]. En raison de sa localisation, ce récepteur serait principalement impliqué dans la clairance de l'HA au niveau du système lymphatique [Jadin et al., 2012; Vigetti et al., 2014; Jackson, 2018].

HARE (*Hyaluronan Receptor for Endocytosis*), également appelé stabiline-2, est une protéine transmembranaire existant sous deux isoformes suite à un clivage protéolytique [Harris et al., 2007]. Ce récepteur est présent au niveau des cellules endothéliales, notamment du foie, de la rate et des ganglions lymphatiques [Vigetti et al., 2014]. Egalement capable de lier d'autres GAGs, HARE permet

l'endocytose de l'HA et est un acteur majeur de sa clairance [Weigel et al., 2003; Pandey and Weigel, 2014].

Les récepteurs membranaires **TLR2** et **TLR4** (*Toll-Like Receptor*) sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires. Leur stimulation, par exemple par des PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*), permet d'activer la réponse immunitaire innée. En fonction de leur taille, les molécules d'HA peuvent inhiber ou stimuler TLR2 et TLR4. En effet, les petits fragments d'HA stimulent ces récepteurs, et par conséquent, induisent la réponse immunitaire alors que l'HA de grande taille est décrit comme ayant l'effet inverse [Campo et al., 2011].

L'HA peut également se lier à d'autres protéines telles que **TSG-6** (*Tumor necrosis factor-inducible Gene* 6) ce qui permet d'induire la formation de fibrilles ou câbles d'HA associés avec le processus d'inflammation. Ces câbles pourraient potentiellement jouer un rôle protecteur en maintenant les neutrophiles dans un état inactif et en atténuant la perte de composants des matrices extracellulaires [Day and de la Motte, 2005; Baranova et al., 2011].

2.4. La dégradation de l'acide hyaluronique

Le renouvellement de l'HA dans les tissus est un processus relativement rapide. Il a ainsi été estimé que, sur les quinze grammes d'HA que contient en moyenne un individu humain, cinq grammes sont remplacés toutes les vingt-quatre heures. Il faut toutefois noter que la vitesse de ce renouvellement est dépendante du type de tissus. Alors que le temps de demi-vie de l'HA circulant est de deux à cinq minutes, celui de l'HA présent dans le cartilage varie d'une à trois semaines. L'HA peut être catabolisé grâce à des dégradations non enzymatiques, par exemple par des réactions d'oxydations dues à des dérivés réactifs de l'oxygène, ou grâce à des clivages enzymatiques [Stern et al., 2007]. Ces derniers sont réalisés par l'intermédiaire d'enzymes appelées hyaluronidases.

2.4.1. Les hyaluronidases des mammifères

Il existe trois groupes d'hyaluronidases classifiées en fonction de leur mode d'action et du type d'organismes dans lesquelles elles sont exprimées. Les hyaluronidases présentes chez les mammifères sont des endo-β-*N*-acétylhexosaminidases, c'est-à-dire qu'elles hydrolysent les liens glycosidiques β1-4 qui relient le NAcGln et l'acide glucuronique de l'HA. Chez l'humain, la famille des hyaluronidases comprend six membres, produits des gènes *HYAL1*, *HYAL2* et *HYAL3* localisés sur le chromosome 3 et d'*HYAL4*, *SPAM1* (*Sperm Adhesion Molecule* 1) et *HYALP1* sur le chromosome 7. La même organisation a été observée chez la souris au niveau des chromosomes 9 et 6, respectivement, avec l'apparition supplémentaire d'une septième hyaluronidase appelée *Hyal5* localisée à proximité du groupe *Hyal4*, *Spam1* et *Hyalp1* (Fig 10). Les gènes paralogues codant pour les hyaluronidases partagent environ 40 % de leur séquence [Csóka et al., 2001; Kim et al., 2005].



Figure 10: Organisation chromosomique des gènes codant pour les hyaluronidases chez la souris et l'humain. Que ce soit chez la souris ou chez l'humain, les gènes *HYAL1*, *HYAL2* et *HYAL3* sont rassemblés respectivement sur les chromosomes 9 et 3. Bien qu'*HYAL1* soit toujours au milieu, la position d'*HYAL2* et *HYAL3* est inversée entre les deux espèces. Les autres hyaluronidases sont regroupées sur le chromosome 6 chez la souris et 7 chez l'humain avec *HYAL5* uniquement présent chez les rongeurs (adapté à partir de Martin-DeLeon, 2006).

Enzyme présentant l'activité la plus élevée, HYAL1 est capable d'hydrolyser l'HA indépendamment de sa taille. Avec HYAL2, elle constitue l'une des deux principales hyaluronidases des tissus somatiques. HYAL1 étant l'enzyme d'intérêt dans cette thèse, elle fera l'objet d'un chapitre séparé (voir pages 32 à 37). Nous nous concentrerons ici sur les autres hyaluronidases connues.

2.4.2. HYAL2

HYAL2 est une hyaluronidase ubiquiste dont l'expression est particulièrement élevée dans les tissus responsables du catabolisme de l'HA circulant, à savoir les ganglions lymphatiques, le foie et la rate [Chowdhury et al., 2016]. Il s'agit d'une enzyme ancrée dans la membrane plasmique grâce à un lien glycosylphosphatidylinositol (GPI) mais qui peut également être présente sous forme soluble [André et al., 2011]. Le pH d'activité optimal d'HYAL2 varie selon les études, allant de 4.5 d'après le groupe d'Eli Gilad à 6.5 selon les données publiées par Harada et Takahashi [Bourguignon et al., 2004; Vigdorovich et al., 2005; Harada and Takahashi, 2007]. HYAL2 est capable de cliver l'HA de haute masse moléculaire jusqu'à l'obtention de fragments d'environ 20 kDa [Lepperdinger et al., 2001; Bourguignon et al., 2004; Vigdorovich et al., 2005; André et al., 2011]. La raison pour laquelle la dégradation de l'HA par HYAL2 s'arrêterait à l'apparition de fragments de 20 kDa n'a jamais été clairement établie. Cependant, il a été suggéré qu'HYAL2 puisse cliver l'HA uniquement s'il se présente sous la forme d'une structure tertiaire stable, une conformation qui se mettrait en place lorsque l'HA présente une taille d'au moins 20 kDa [Stern, 2003].

Des souris dans lesquelles le gène Hyal2 a été inactivé présentent une augmentation des niveaux d'HA dans de nombreux tissus. Cette accumulation est la plus marquée au niveau des ganglions lymphatiques ainsi que du plasma et s'accompagne d'une augmentation de la taille moyenne des fragments d'HA [Jadin et al., 2008; Bourguignon and Flamion, 2016; Chowdhury et al., 2016]. En l'absence d'HYAL2, les souris présentent des problèmes cardio-pulmonaires, une microangiopathie thrombotique chronique et un développement anormal des os cranio-faciaux [Jadin et al., 2008; Chowdhury et al., 2013; Onclinx et al., 2015]. Une altération de l'expression d'HYAL2 semble également être associée avec des problèmes de développement des os cranio-faciaux chez l'humain puisque des mutations dans le gène HYAL2, impactant le niveau protéique de l'enzyme, ont été mises en évidence chez des patients porteurs d'un syndrome de fente oro-faciale [Muggenthaler, Chowdhury et al., 2017]. De plus, une étude publiée un an auparavant a identifié la présence de mutations dans HYAL2 comme une des causes potentielles de l'apparition d'un dimorphisme facial dans une famille consanguine [Shaheen et al., 2016]. La création de souris déficientes pour HYAL2 dans le cartilage a aussi permis d'observer une accumulation d'HA au niveau de la plaque de croissance osseuse accompagnée d'une légère diminution de la taille de leurs tibias. Ces souris développent progressivement un phénotype d'arthrose associé à une augmentation de l'HA et des métalloprotéases MMP-13 (Matrix Metalloproteinase 13) et ADAMTS5 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 5) dans le cartilage articulaire. Une perte progressive des protéoglycanes, caractéristique du développement d'arthrose, a également été mise en évidence au niveau du cartilage articulaire chez ces souris déficientes pour HYAL2 âgées de 9 mois [Higuchi et al., 2017].

2.4.3. HYAL3

HYAL3 est une glycoprotéine exprimée notamment dans les testicules, la moelle osseuse et les chondrocytes [Girish and Kemparaju, 2007]. Contrairement à HYAL1 et HYAL2, HYAL3 semble dépourvue d'activité hydrolytique. D'ailleurs, son inactivation ne provoque pas d'accumulation d'HA ni de phénotype particulier chez la souris [Atmuri et al., 2008]. Toutefois, HYAL3 serait capable d'augmenter l'activité d'HYAL1 puisqu'une élévation importante du niveau protéique et de l'activité d'HYAL1 est détectée lorsqu'HYAL3 est surexprimée par des manipulations expérimentales. Il a été postulé que cette protéine pourrait potentiellement accroître la stabilité d'HYAL1, étant donné que la surexpression d'HYAL3 n'a qu'un impact minime sur l'expression de l'ARNm d'HYAL1 [Hemming, Martin et al., 2008]. Dans le foie de souris, un phénomène de co-transcription d'HYAL1 et d'HYAL3 semble se mettre en place puisque des transcrits portant la séquence des deux protéines ont été mis en évidence. Cette observation suggère qu'un promoteur unique pourrait être utilisé pour induire l'expression d'HYAL1 et d'HYAL3 et renforce l'idée de l'existence d'une relation étroite entre les deux protéines [Shuttleworth et al., 2002].

2.4.4. Les hyaluronidases HYAL4, SPAM1, HYALP1 et HYAL5

Présente dans le placenta et le muscle squelettique, HYAL4 est capable de dégrader le sulfate de chondroïtine mais pas l'HA [Kaneiwa et al., 2010]. A l'instar d'HYAL3, les trois hyaluronidases SPAM1, HYALP1 et HYAL5 sont présentes dans les spermatozoïdes. Bien que leurs fonctions ne soient pas définies, il a été proposé que ces hyaluronidases soient impliquées dans la liaison et la pénétration à travers le cumulus oophorus et la zone pellucide, des structures qui entourent l'ovocyte. Les souris déficientes pour une de ces hyaluronidases présentent néanmoins une fertilité normale [Reese et al., 2010].

2.4.5. Les modèles du catabolisme de l'acide hyaluronique

Plusieurs études ont démontré qu'une partie de l'HA présent dans les matrices extracellulaires est catabolisé localement dans les tissus, bien que la fraction d'HA dégradé *in situ* semble varier selon le tissu concerné [Laurent et al., 1991; Jadin et al., 2012]. Dans la peau, par exemple, une fraction de l'HA, qui pourrait être de l'ordre de 20 à 30 % selon une étude, serait catabolisé localement alors que le restant serait éliminé par le système lymphatique [Laurent et al., 1991]. En absence d'HYAL1 ou d'HYAL2, une accumulation d'HA est en effet visible au niveau des ganglions lymphatiques, supportant le rôle de ces organes dans la clairance de l'HA [Bourguignon and Flamion, 2016]. Par ailleurs, les cellules sinusoïdales lymphatiques seraient des acteurs importants de ce catabolisme puisque l'HA, emmené par la lymphe à partir d'autres tissus, co-localise avec ces cellules qui expriment les récepteurs HARE et LYVE-1 impliqués dans la clairance de l'HA [Jadin et al., 2012]. En comparaison, dans l'os et le cartilage qui sont des tissus denses présentant très peu de drainage lymphatique, la dégradation de l'HA se déroulerait majoritairement au niveau local [Laurent et al., 1991; Fraser et al., 1997]. L'HA circulant est, quant à lui, majoritairement endocyté et catabolisé par le foie, et dans une moindre mesure par la rate, principalement au niveau des cellules endothéliales sinusoïdales positives pour le récepteur HARE [Jadin et al., 2012].

Au niveau cellulaire, un modèle de catabolisme de l'HA a été proposé par Robert Stern et complété ensuite par l'équipe d'Eli Gilad (Fig 11) [Stern, 2003; Bourguignon et al., 2004]. L'HA interagirait avec la membrane plasmique grâce à l'action couplée d'HYAL2 et de récepteurs de l'HA dont un des principaux est la protéine ubiquiste CD44 que nous avons décrite précédemment. Ce complexe, enrichi au niveau de domaines invaginés de la membrane plasmique dénommés cavéoles, est également associé à un antiport échangeur de Na⁺ et H⁺ appelé NHE-1 (*Sodium-Hydrogen Exchanger* 1). Une fois activé par la liaison à l'HA, l'antiport NHE-1 génèrerait un microenvironnement légèrement acide qui permettrait à HYAL2 de cliver l'HA de haute masse moléculaire en fragments de 20 kDa. Ces oligosaccharides seraient ensuite transportés jusqu'aux lysosomes et dégradés en tétra- et hexasaccharides par HYAL1. L'action d'HYAL1 serait complétée dans les lysosomes par les exoglycosidases β -hexosaminidase et β -glucuronidase, capables d'éliminer respectivement les unités NAcGIn et acide glucuronique.



Figure 11: Modèle du catabolisme cellulaire de l'acide hyaluronique proposé par Robert Stern en 2003. Dans un premier temps, l'HA est synthétisé au niveau de la membrane plasmique par les trois HAS qui produisent des molécules d'HA de tailles différentes. L'HA peut ensuite se lier à la surface cellulaire grâce à son interaction avec des récepteurs de surface tels que le récepteur CD44. Ce dernier peut aussi s'associer à HYAL2 au niveau de zones de la membrane appelées cavéoles connues pour être notamment impliquées dans l'endocytose. L'HA est ensuite clivé au cours de son endocytose par HYAL2 en fragments de taille intermédiaire suivi de leur dégradation complète par HYAL1 et les exoglycosidases, β -hexosaminidase et β -glucuronidase, dans les lysosomes (adapté à partir de Stridh et al., 2012).

2.4.6. Les nouveaux acteurs du catabolisme de l'acide hyaluronique

Récemment, deux autres protéines impliquées dans le catabolisme de l'HA ont été proposées. En 2013, l'équipe de Shintaro Inoue a identifié KIAA1199, ou CEMIP (*Cell Migration-Inducing and hyaluronanbinding Protein*), comme un acteur potentiel du catabolisme de l'HA [Yoshida et al., 2013]. Ils ont observé que la surexpression ou l'inactivation de cette protéine induit respectivement une augmentation ou une diminution de la dégradation de l'HA dans les fibroblastes. Sur base de leurs résultats, les auteurs ont suggéré que l'HA serait clivé dans des endosomes par cette nouvelle hyaladhérine avant d'être libéré dans le milieu sous forme de fragments de taille intermédiaire. Toutefois, ni la protéine recombinante ni les milieux conditionnés des cellules surexprimant KIAA1199 ne présentent d'activité de dégradation de l'HA, ce qui remet en question l'hypothèse selon laquelle cette protéine posséderait une activité hyaluronidasique [Yoshida et al., 2013]. Il est possible que son rôle se limite à la présentation de l'HA vers d'autres systèmes de dégradation.

L'autre protéine proposée est une hyaluronidase transmembranaire appelée TMEM2 (*Transmembrane protein* 2). En effet, il a pu être démontré que TMEM2 est capable de cliver l'HA en

fragments d'environ 5 kDa à un pH d'environ 6-7 [Yamamoto et al., 2017]. A l'heure actuelle, le positionnement exact de ces deux protéines dans le modèle du catabolisme de l'HA reste à préciser.

2.5. L'hyaluronidase HYAL1

Bien que la présence d'une hyaluronidase active à pH acide dans le sérum soit connue depuis les années 60, il n'a été démontré que bien plus tard que cette enzyme correspondait à HYAL1, une protéine dont le gène humain a été cloné en 1997 [De Salegui and Pigman, 1967; Frost et al., 1997]. HYAL1 est constituée de 435 acides aminés chez l'humain et de 462 acides aminés chez la souris [Csóka et al., 1998]. HYAL1 est principalement exprimée dans le foie mais également dans les reins, le cœur, la rate, les poumons et la peau, que ce soit chez la souris ou chez l'homme. En revanche, l'expression d'HYAL1 n'est pas détectée dans le cerveau [Csóka et al., 1999; Shuttleworth et al., 2002]. En plus d'être capable de cliver l'HA quelle que soit sa taille, HYAL1 peut aussi dégrader la chondroïtine et le sulfate de chondroïtine mais avec une efficacité moindre [Stern, 2003].

2.5.1. La structure d'HYAL1

Dans le sérum humain, HYAL1 est présente sous forme d'une seule chaîne polypeptidique de 49 kDa sur laquelle sont greffées des structures oligosaccharidiques représentant ensemble une masse moléculaire de 8 kDa. Cette forme précurseur de 57 kDa donne naissance, par clivage protéolytique, à une seconde forme de 45 kDa, qui est notamment détectée en concentration élevée dans l'urine. Les 12 kDa perdus représenteraient l'excision d'un fragment interne d'une centaine d'acides aminés dans la région C-terminale de la protéine. A l'issue de ce clivage, le long fragment N-terminal (environ 300 acides aminés) et le fragment restant de la partie C-terminale (25 acides aminés) resteraient, hypothétiquement, reliés entre eux par un ou plusieurs ponts disulfures (Fig 12) [Csóka et al., 1997].



Figure 12: Représentation schématique des deux formes d'HYAL1 d'environ 57 kDa et 45 kDa présentes dans les tissus humains. La perte d'environ 100 acides aminés (AA) au niveau C-terminal, suite à un clivage protéolytique de la forme de plus haute masse moléculaire, provoque l'apparition de deux chaînes polypeptidiques. Ces deux fragments, qui présentent une masse totale de 45 kDa, seraient reliés entre eux par un ou plusieurs ponts disulfures (adapté à partir de Csóka et al., 2001).

La forme humaine de la protéine HYAL1 expose un peptide signal N-terminal de 21 acides aminés, permettant la translocation de la protéine dans la lumière du réticulum endoplasmique. Cette séquence est suivie d'une région comprenant le domaine catalytique de 331 acides aminés et d'un domaine C-terminal de 83 acides aminés appelé EGF-*like* en raison de son homologie de séquence avec celle du facteur de croissance épidermique (EGF pour *Epidermal Growth Factor*) [Chao et al., 2007]. La fonction exacte du domaine C-terminal n'est pas connue mais sa délétion résulte en l'inactivation de la protéine, indiquant qu'il est critique pour la fonction d'HYAL1 [Zhang et al., 2009]. Le reploiement d'HYAL1 dans le réticulum endoplasmique s'accompagne de la formation de cinq ponts disulfures. Trois d'entre eux sont localisés dans le domaine C-terminal, deux dans le domaine catalytique [Chao et al., 2007].

Différents acides aminés essentiels à la fonction de la forme humaine d'HYAL1 ont été identifiés. Ainsi, la tyrosine 202 et la sérine 245 sont indispensables pour la liaison de l'enzyme à son substrat alors que l'aspartate, le glutamate et la tyrosine respectivement en position 129, 131 et 247 sont nécessaires à l'activité catalytique d'HYAL1 (Fig 13) [Chao et al., 2007; Zhang et al., 2009]. HYAL1 humain contient aussi trois sites de glycosylation utilisés, au niveau des asparagines 99, 216 et 350. L'ajout de chaînes oligosaccharidiques sur ces trois sites de glycosylation est important pour la sécrétion et l'activité d'HYAL1 puisque la mutation d'un seul de ces sites, peu importe lequel, est suffisante pour induire une diminution de ces processus [Goto et al., 2014a]. Enfin, la forme humaine d'HYAL1 pourrait être modifiée par « C-mannosylation », c'est-à-dire par l'ajout d'un mannose au niveau du carbone C2 du noyau indole présent dans les résidus tryptophanes. La « C-mannosylation » d'HYAL1 au niveau du tryptophane 130 impacterait négativement sa sécrétion et son activité enzymatique, potentiellement à travers la modification de la polarité et de la conformation de l'enzyme [Goto et al., 2014b].

En comparaison avec la forme humaine, la structure de l'HYAL1 de souris a été peu explorée jusqu'à présent. Présentant 73 % d'homologie de séquence avec HYAL1 humaine, la forme murine est légèrement plus longue avec 462 acides aminés contre 435 acides aminés chez l'homme. La forme de souris comporterait un peptide signal N-terminal de 53 acides aminés ainsi qu'un domaine EGF-*like* C-terminal de seulement 12 acides aminés. Cinq sites de glycosylation potentiels ont également été identifiés dans la séquence de la forme murine de la protéine au niveau des asparagines 98, 127, 244, 265 et 378. Enfin, une analyse *in silico* prédit la présence de cinq ponts disulfures dans la structure de l'HYAL1 de souris, tout comme dans la forme humaine.



Figure 13: Structure cristalline de la forme humaine d'HYAL1 (mauve) comprenant un tétrasaccharide d'acide hyaluronique (vert) dans son site actif. Des acides aminés connus pour être impliqués dans la fonction d'HYAL1 sont représentés sur l'illustration. L'aspartate 129 (D129), le glutamate 131 (E131) ainsi que la tyrosine 247 (Y247) sont des résidus catalytiques essentiels puisque leur mutation abolit l'activité d'HYAL1. En outre, la liaison de l'hyaluronidase avec son substrat est dépendante des acides aminés tyrosine 202 (Y202) et sérine 245 (S245) car leur substitution réduit très fortement l'affinité d'HYAL1 pour l'HA. Par ailleurs, des interactions non covalentes prenant place entre l'aspartate 206 (D206) et l'arginine 265 (R265) favoriseraient l'organisation conformationnelle du site d'actif. Un pont disulfure formé entre les cystéines 207 (C207) et 221 (C221), proche du site actif, est également illustré sur la figure. Enfin, des chaînes oligosaccharidiques (blanc) sont ajoutées au niveau des trois asparagines en position 99, 216 et 350 (N99, N216 et N350) (Zhang et al., 2009).

2.5.2. La localisation subcellulaire d'HYAL1

Le pH optimal pour l'activité d'HYAL1 a été estimé à 3.7 *in vitro*. Pour cette raison, HYAL1 a très tôt été considérée comme une enzyme lysosomale [Frost et al., 1997] bien que, de façon surprenante, la démonstration formelle de sa localisation subcellulaire n'a jamais été réalisée.

En 1965, l'équipe de Davidson a mis en évidence la présence d'une activité hyaluronidasique dans les lysosomes de foie de rat [Aronson and Davidson, 1965]. Il faut préciser que la mesure de l'activité enzymatique réalisée par ces auteurs était basée sur la méthode de Reissig qui consiste à détecter les nouvelles extrémités NAcGln réductrices générées lors du clivage de l'HA. Cette méthode permet, par conséquent, de mesurer le catabolisme de l'HA mais n'est pas spécifique d'HYAL1 [Reissig et al., 1955]. Il a fallu attendre près de 40 ans pour qu'un autre indice, indirect, pointe vers une localisation lysosomale pour HYAL1. En effet, l'analyse de la morphologie des cellules de patients atteints d'une déficience en HYAL1 appelée mucopolysaccharidose de type IX (MPS de type IX) a permis de montrer que les macrophages, et dans une moindre mesure les fibroblastes articulaires, présentent de nombreuses vacuoles dont l'apparence rappelle celle des lysosomes. Le contenu de ces vacuoles se

colore avec du bleu alcian qui permet de mettre en évidence les GAGs. De plus, un traitement avec de l'hyaluronidase a pour effet de diminuer ce marquage par bleu alcian, suggérant que, en absence d'HYAL1, c'est bien de l'HA qui s'accumule dans ces vacuoles [Natowicz et al., 1996a; Imundo et al., 2011]. Il a été déduit de ces observations que la mucopolysaccharidose de type IX s'apparente aux maladies de surcharge lysosomale provoquées par l'accumulation intralysosomale du substrat d'une enzyme non fonctionnelle. Le chapitre suivant développera plus avant les caractéristiques de cette pathologie.

Cependant, un article publié par notre laboratoire en 2010 met en avant que l'activité d'HYAL1 est uniquement détectable dans des compartiments pré-lysosomaux, c'est-à-dire principalement les endosomes [Gasingirwa et al., 2010]. Dans le cadre de cette étude, des fractionnements subcellulaires de foie de souris qui ont été injectées avec la forme recombinante de la protéine ont été réalisés afin d'étudier l'endocytose d'HYAL1. Ceci a permis de montrer qu'HYAL1 était rapidement internalisée par le foie, principalement par les cellules sinusoïdales. Il a également été observé qu'après la séparation de fractions M ou L riches en endosomes, lysosomes, mitochondries et peroxysomes, par centrifugation isopycnique dans un gradient de densité de saccharose, HYAL1 co-distribue avec des marqueurs endolysosomaux. Cependant, son profil de distribution n'est pas modifié lorsque les souris sont préalablement injectées avec du Triton WR-1339, une molécule provoquant une diminution spécifique de la densité des lysosomes. Il en a été déduit qu'HYAL1 est majoritairement présente dans des endosomes non affectés par ce traitement. Des résultats similaires, suggérant l'absence d'une forme active de l'hyaluronidase dans les lysosomes, ont été obtenus après détection de l'activité d'HYAL1 endogène ou après le suivi d'HYAL1 recombinante marquée radioactivement.

Il est à noter que, au cours de cette étude, l'activité d'HYAL1 a été détectée par une technique de zymographie qui présente l'avantage d'être spécifique pour HYAL1, contrairement au test de Reissig mentionné plus haut [Gasingirwa et al., 2010]. La technique de zymographie utilisée par Gasingirwa et al. est basée sur la séparation des échantillons protéiques contenant HYAL1 par SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dans un gel au sein duquel son substrat HA a été incorporé. Après une étape de renaturation des protéines, le gel est incubé à pH acide et à 37°C afin de permettre à HYAL1 de dégrader son substrat. L'activité de l'hyaluronidase est révélée grâce à une étape de coloration de l'HA laissant apparaître des bandes non colorées, là où se situent les protéines HYAL1 qui ont dégradé l'HA [Fiszer-Szafarz, 1984; Guntenhöner et al., 1992].

Une autre observation qui a remis en question l'hypothétique localisation lysosomale d'HYAL1 est que cette enzyme n'a jamais été détectée dans les études qui visaient à identifier toutes les protéines portant le motif Man-6-P [Sleat et al., 2005; Sleat et al., 2006]. De plus, la concentration plasmatique d'HYAL1 n'est pas augmentée chez les patients déficients pour la première enzyme responsable de l'ajout du Man-6-P comme habituellement observé pour les hydrolases acides empruntant cette voie principale de transport vers le lysosome (voir plus haut) [Fiszer-Szafarz et al., 2005; Natowicz and Wang, 1996b].

En conclusion, bien qu'elle soit active à pH acide et que cette protéine soit probablement un acteur du catabolisme endo-lysosomal de l'HA, HYAL1 ne présente pas toutes les caractéristiques de la majorité des hydrolases acides lysosomales. Cette « controverse » est ce qui nous a poussés, dans la première partie de cette thèse, à investiguer plus précisément la localisation subcellulaire d'HYAL1.

2.5.3. La déficience en HYAL1

Comme mentionné précédemment, les patients présentant une déficience en HYAL1 développent une pathologie appelée mucopolysaccharidose de type IX. Une première patiente âgée de 14 ans a été identifiée en 1996 [Natowicz et al., 1996a]. En plus d'une taille inférieure au cinquième percentile, la jeune fille présentait des douleurs et des « masses » au niveau des articulations. Malgré son jeune âge, la patiente développait déjà une érosion du cartilage dont l'évolution a nécessité le remplacement d'une hanche avant l'âge de 30 ans. Un dimorphisme facial et un gonflement cutané généralisé ont également été observés. Au niveau histologique, les « masses » articulaires se caractérisaient par une transformation villonodulaire de la membrane synoviale. Les villosités de cette membrane comprenaient un grand nombre de macrophages et de fibroblastes contenant de nombreuses vacuoles larges qui correspondaient vraisemblablement à des lysosomes surchargés d'HA (Fig 14). Aucune activité hyaluronidasique n'a pu être mise en évidence dans le plasma où une très forte accumulation d'HA a par ailleurs été détectée [Natowicz et al., 1996a]. Deux mutations différentes ont par la suite été identifiées dans les allèles codant pour HYAL1, l'une générant un nouveau codon stop provoquant un arrêt prématuré de la traduction, l'autre induisant la substitution d'une lysine à la place de l'acide glutamique 268, un acide aminé conservé parmi les hyaluronidases [Triggs-Raine et al., 1999].



Figure 14: Biopsie synoviale d'une patiente atteinte de mucopolysaccharidose de type IX. (A) La membrane synoviale est infiltrée par de nombreux macrophages qui présentent une accumulation de matériel mis en évidence par le bleu alcian qui colore les GAGs. (B) L'intensité du marquage est diminuée par un pré-traitement avec de l'hyaluronidase (grossissement 400 x) suggérant que le matériel accumulé est de l'HA. (C) Une analyse par microscopie électronique a permis de montrer que les macrophages étaient remplis de vacuoles présentant une morphologie compatible avec les lysosomes (adapté à partir de Imundo et al., 2011).

En 2011, trois frères et sœurs présentant une déficience en HYAL1 ont été identifiés. Ces patients, âgés de 11, 13 et 21 ans, ont développé une arthrite juvénile idiopathique. Les symptômes articulaires et les biopsies de la membrane synoviale étaient semblables à ceux décrits pour la première patiente. L'analyse des biopsies a également permis d'observer une absence d'accumulation de lymphocytes et d'inflammation caractéristiques de l'arthrite inflammatoire. Cependant, le phénotype de cette fratrie était limité à une atteinte articulaire puisqu'ils ne présentaient ni gonflement cutané ni dimorphisme facial. De plus, leur taille était soit normale soit légèrement supérieure à la moyenne. Les parents de cette fratrie étant cousins germains, les deux allèles codant pour HYAL1 chez ces patients présentaient une délétion identique provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré dans la séquence [Imundo et al., 2011].

Des souris déficientes pour HYAL1 ont été générées par substitution de la moitié du gène codant pour HYAL1 par la séquence du gène de résistance à la néomycine. L'absence d'expression d'HYAL1 chez ces souris a été confirmée au niveau transcriptionnel et protéique [Martin et al., 2008]. Ces souris présentent une très forte accumulation d'HA au niveau du foie, et plus particulièrement dans les cellules endothéliales sinusoïdales qui seraient les principales cellules responsables de l'endocytose de l'HA circulant [Jadin et al., 2012; Bourguignon and Flamion, 2016]. Une légère augmentation des niveaux d'HA a également été détectée dans différents tissus des souris déficientes pour HYAL1 tels que la peau, le muscle, les ganglions lymphatiques et le sérum. Contrairement à ce qui est observé dans des souris déficientes pour HYAL2, la distribution de la masse moléculaire de l'HA accumulé n'est pas modifiée par la perte d'HYAL1 [Bourguignon and Flamion, 2016]. Cette différence s'explique probablement par la capacité d'HYAL1 de dégrader l'HA indépendamment de sa taille alors que le catabolisme de l'HA par HYAL2 se limite aux fragments de grande taille.

Les souris déficientes pour HYAL1 présentent en outre une perte des protéoglycanes au niveau du cartilage articulaire et des excroissances osseuses caractéristiques du développement d'un phénotype d'arthrose. Une accumulation d'HA est aussi visible dans et autour des chondrocytes. Ces modifications au niveau articulaire sont déjà observables à trois mois mais elles s'amplifient avec l'âge. En-dehors du développement d'une arthrose, la déficience en HYAL1 ne semble pas entraîner d'autres conséquences majeures chez les souris. Ce phénotype relativement léger ne s'explique pas par une expression compensatoire d'HYAL2 puisque l'expression de cette enzyme est inchangée en absence d'HYAL1. Seule l'expression d'HYAL3 est augmentée mais, pour rappel, une activité de dégradation de l'HA n'a jamais pu être mise en évidence pour cette protéine [Martin et al., 2008]. En revanche, les souris déficientes à la fois pour HYAL1 et pour la β -hexosaminidase, une exoglycosidase participant au catabolisme terminal de l'HA par la libération d'unités NAcGIn à partir de la chaîne oligosaccharidique, présentent une accumulation d'HA beaucoup plus marquée que celle observée en absence d'une seule de ces deux enzymes [Gushulak et al., 2012]. Bien que leur expression ne soit pas modifiée chez les souris déficientes pour HYAL1, les deux exoglycosidases β -hexosaminidase et β -glucuronidase pourraient donc participer à la dégradation de l'HA accumulé [Martin et al., 2008].

3.1. La structure et la composition de l'os

L'os est un tissu conjonctif spécialisé composé de cellules et d'une matrice extracellulaire minéralisée qui, associé avec le cartilage, constitue le système squelettique. Le tissu osseux remplit trois fonctions majeures dans l'organisme. Premièrement, l'os présente un rôle mécanique puisqu'il participe au support du corps. Deuxièmement, le tissu osseux joue un rôle protecteur pour les organes vitaux et la moelle osseuse. Troisièmement, l'os possède une fonction métabolique notamment à travers la régulation homéostasique du calcium et du phosphate puisqu'il contient respectivement 99 % et 85 % de leurs stocks présents dans l'organisme [Baron, 2000; Bayliss et al., 2012; Del Fattore et al., 2012]. Précisons aussi que, par sa sécrétion d'ostéocalcine, l'os peut être considéré comme un organe endocrine [Guntur and Rosen, 2012].

Il existe deux types d'os dans le squelette, les os plats et les os longs, qui se distinguent par leur mécanisme de formation. Alors que les os plats se développent grâce à un processus appelé ossification intramembraneuse, la croissance des os longs nécessite en plus la mise en place d'une ossification endochondrale. La principale différence entre ces deux processus réside dans le développement d'une matrice cartilagineuse précédant la formation de l'os lors de l'ossification endochondrale, contrairement à l'ossification intramembraneuse [Baron, 2000; Ralston, 2013].

Les os longs, tels que le fémur, le tibia ou l'humérus, sont constitués de trois parties (Fig 15). Les extrémités plus larges s'appellent les épiphyses et sont recouvertes de cartilage articulaire. La portion cylindrique au centre de l'os constitue la diaphyse et est séparée des épiphyses par une zone de transition qui correspond à la métaphyse. Durant la croissance, la métaphyse et l'épiphyse sont séparées par une plaque de cartilage, appelée la plaque de croissance ou plaque épiphysaire, où se déroule l'ossification endochondrale permettant la croissance longitudinale des os longs. A la fin de la puberté, la plaque de croissance disparaît car elle est remplacée par de l'os. A l'exception des articulations des os longs, les surfaces internes et externes de l'os sont recouvertes par une membrane de tissu conjonctif appelée respectivement endoste et périoste. C'est à ce niveau que se déroule l'ossification intramembraneuse responsable de la croissance des os plats ainsi que de l'augmentation de l'épaisseur des os longs [Baron, 2000; Emons et al., 2011].



Figure 15: Représentation schématique de la structure des os longs. Différentes zones peuvent être distinguées dans les os longs: la diaphyse au milieu entourée de la métaphyse et de l'épiphyse qui sont elles-mêmes séparées par la plaque épiphysaire. Les structures osseuses sont tapissées par une couche tissulaire appelée endoste au niveau interne et périoste en périphérie. L'espace laissé libre au centre de l'os cortical dans la diaphyse et entre les travées osseuses présentes aux extrémités renferme la moelle osseuse. L'os cortical est constitué d'unités appelées ostéons, des structures constituées de lamelles concentriques organisées autour de canaux de Havers contenant des vaisseaux sanguins. Alors que les fibres de collagène sont parallèles à l'intérieur d'une même lamelle, ces fibres s'organisent de façon perpendiculaire par rapport à la lamelle adjacente (adapté à partir de Sims and Vrahnas, 2014).

Le squelette comprend deux types d'os de composition similaire mais qui diffèrent au niveau structurel et fonctionnel. D'une part, la partie externe des os longs est constituée d'un tissu osseux dense et épais appelé os cortical. D'autre part, la région interne des épiphyses et des métaphyses contient de l'os trabéculaire, également appelé os spongieux, constitué de fines travées de densité plus faible. Ces deux types d'os se distinguent par leur taux de minéralisation puisque 80 à 90 % du volume de l'os cortical est calcifié alors que cela ne concerne que 15 à 25 % du volume trabéculaire. De plus, la majorité de l'interface entre l'os et les tissus adjacents se situe au niveau de l'os trabéculaire. Ainsi le remodelage de l'os trabéculaire est plus rapide que celui de l'os cortical, ce qui mène à des différences fonctionnelles. En effet, la principale fonction du tissu osseux trabéculaire est métabolique alors que l'os cortical joue majoritairement des rôles mécaniques et de protection des organes vitaux. Parmi ces organes se trouve la moelle osseuse présente dans les espaces entre les travées dans l'épiphyse et la métaphyse ainsi que dans la zone centrale de la diaphyse qui est creuse [Baron, 2000; Ralston, 2013].

L'os est composé à 10 % de cellules dont les trois principaux types sont les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes et à 60 % d'une matrice inorganique minéralisée qui confère à l'os sa rigidité et qui

est principalement constituée de cristaux d'hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Ces derniers sont formés par la précipitation d'ions calcium Ca²⁺ et phosphate sous la forme H₂PO₄⁻ ou HPO₄²⁻. Les 30 % restant du tissu osseux correspondent à la matrice organique dont le constituant majeur est le collagène de type I. Ce dernier représente 88 % de la matrice organique et permet de conférer à l'os une résistance importante aux forces de tension tout en gardant une légère élasticité. Outre le collagène de type I, des protéines spécifiques ou non du tissu osseux constituent 10 % de la matrice osseuse organique. Parmi ces protéines se trouvent l'ostéocalcine, l'ostéonectine, l'ostéopontine ou encore des facteurs de croissance. Elles remplissent diverses fonctions : elles sont impliquées dans l'adhésion des cellules osseuses à la matrice osseuse, elles fixent le calcium, stabilisent les cristaux d'hydroxyapatite et elles influencent la différenciation ainsi que le niveau d'activité des cellules osseuses qui forment ou résorbent l'os. Enfin, les 2 % restant de la matrice osseuse organique correspondent à des lipides et à des glycosaminoglycanes [Baron, 2000; Feng and McDonald, 2011; Bonucci, 2012; Ralston, 2013].

Que ce soit dans l'os cortical ou trabéculaire, les fibres de collagène de type I s'organisent de façon parallèle ce qui a pour effet d'obtenir la plus forte densité de fibres par volume et, par conséquent, d'optimiser la résistance du tissu osseux. Ainsi organisé, l'os est appelé lamellaire par opposition à l'os formé rapidement, lors du développement ou de la réparation d'une fracture, dans lequel les fibres de collagène n'ont pas d'orientation particulière. Cet os désorganisé est plus fragile et sera remodelé ultérieurement. Dans le cas de l'os cortical, les fibres de collagène parallèles s'organisent de façon concentrique autour d'un canal contenant des vaisseaux sanguins. Cette structure particulière est appelée ostéon ou système de Havers (Fig 15) [Baron, 2000; Bayliss et al., 2011; Ralston, 2013].

3.2. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont responsables de la formation de la matrice osseuse. Ils sont issus des cellules souches mésenchymateuses qui se différencient en pré-ostéoblastes avant de devenir des ostéoblastes matures incapables de se diviser mais produisant la majorité des constituants de l'os. Les ostéoblastes sont toujours retrouvés sous forme d'amas en contact avec la matrice osseuse qu'ils génèrent [Baron, 2000].

La formation du tissu osseux se déroule en deux étapes successives. Dans un premier temps, les ostéoblastes matures sécrètent les éléments qui constituent la matrice osseuse organique dont le principal composant est le collagène de type I. D'autres exemples de protéines du tissu osseux produites par les ostéoblastes sont l'ostéocalcine, l'ostéopontine, des protéoglycanes, des facteurs de croissance ainsi que des cytokines capables d'influencer la différenciation et l'activité des ostéoclastes mais aussi des ostéoblastes. La matrice osseuse non minéralisée ainsi formée est appelée ostéoïde [Baron, 2000; Del Fattore et al., 2012]. Dans un second temps, ce tissu est minéralisé grâce à la condensation d'ions Ca^{2+} et H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ ce qui induit la formation des cristaux d'hydroxyapatite dont

la formule est Ca10(PO4)6(OH)2. Ce phénomène est initié par la libération, dans la matrice extracellulaire, de vésicules délimitées par une membrane par les ostéoblastes. La production de ces vésicules est un processus peu caractérisé à l'heure actuelle qui débuterait par le bourgeonnement de la membrane apicale des ostéoblastes sous la forme de structures de type microvillosités. La libération des vésicules est ensuite provoquée par une dépolymérisation des microfilaments d'actine [Thouverey et al., 2009; Bottini et al., 2018]. Une fois produites, ces vésicules accumulent dans leur lumière des ions calcium et phosphate qui s'associent entre eux. D'une part, le calcium serait incorporé à partir du milieu extracellulaire grâce à une pompe ATPase transporteur d'ions Ca²⁺. D'autre part, les ions phosphate proviendraient majoritairement de molécules d'ATP (Adenosine Triphosphate). En effet, l'hydrolyse d'ATP par une enzyme appelée ENPP1 (Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1) génère du pyrophosphate qui peut être à son tour clivé en ions phosphate au niveau extracellulaire par une phosphatase alcaline présente dans la membrane des vésicules libérées par les ostéoblastes. Les molécules de phosphate sont ensuite transportées vers la lumière des vésicules grâce à un transporteur du phosphate et du sodium appelé Pit1 (inorganic Phosphate Transporter 1). De plus, l'enzyme PHOSPHO1 (Phosphoethanolamine/phosphocholine Phosphatase) participerait à la génération de phosphates dans la lumière vésiculaire par l'intermédiaire de l'hydrolyse de la phosphocholine [Hasegawa, 2018]. Une fois la limite de solubilité du phosphate de calcium atteinte, un processus de précipitation se met en place induisant ainsi la formation de cristaux d'hydroxyapatite dans ces vésicules. Après rupture de la membrane des vésicules, les cristaux s'allongent et remplissent l'espace libre entre les fibres de collagène permettant l'obtention d'une matrice osseuse minéralisée. Le temps nécessaire entre l'apparition de la matrice organique et sa calcification est d'environ dix jours [Sapir-Koren and Livshits, 2011]. Une fois leurs fonctions remplies, les ostéoblastes peuvent soit entrer en apoptose soit se différencier en ostéocytes ou en cellules quiescentes bordant l'os. Bien que les mécanismes qui sous-tendent le devenir des ostéoblastes sont largement méconnus, il a pu être observé que le pourcentage d'ostéoblastes qui poursuivent chaque voie variait suivant l'espèce concernée, l'âge ou encore le type d'os.

3.3. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont les cellules majoritaires de l'os correspondant aux ostéoblastes qui ont été emprisonnés dans la matrice osseuse qu'ils ont produite. Bien que leur activité métabolique soit fortement diminuée au cours de leur différenciation à partir d'ostéoblastes, les ostéocytes sont toujours capables de produire des protéines de la matrice osseuse [Baron, 2000]. Ces cellules sont caractérisées par la présence de fins prolongements cellulaires en contact avec les prolongements d'autres ostéocytes ou de cellules présentent à la surface de la matrice osseuse, formant ainsi un réseau interconnecté traversant le tissu osseux. L'espace laissé libre entre la membrane plasmique des ostéocytes et les cavités de la matrice osseuse entourant ces cellules ainsi que leurs prolongements

est rempli d'un fluide qui constitue la seule source de nutriments, de cytokines et d'hormones de ces cellules [Divieti Pajevic and Krause, 2019]. Ce fluide est également impliqué dans la réponse à la pression mécanique exercée sur le squelette. En effet, les ostéocytes seraient capables de détecter une perturbation du flux de ce liquide extracellulaire induite par une tension sur le tissu osseux ainsi que directement percevoir une déformation de la matrice osseuse suite à une pression mécanique en signaux biochimiques est un processus complexe appelé mécano-transduction. Il impliquerait l'intervention de cils cellulaires présents à la surface du corps des ostéocytes, de canaux ioniques, d'intégrines, du cytosquelette mais aussi de récepteurs couplés à des protéines G [Hemmatian et al., 2017; Hinton et al., 2018].

Suite à la détection des signaux mécaniques, les ostéocytes sécrètent des cytokines qui modulent la formation et la résorption osseuse. Ainsi, en réponse à une augmentation de la parathormone ou à un stimulus mécanique, les ostéocytes diminuent leur sécrétion de sclérostine, une protéine inhibitrice de la formation osseuse, ce qui a pour effet de promouvoir la différenciation et l'activité des ostéoblastes. Ces mêmes stimuli induisent également une augmentation de la production, par les ostéocytes, de RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*), une cytokine qui induit la différenciation des ostéoclastes. Enfin, il a aussi été rapporté que l'apoptose des ostéocytes, provoquée par exemple par l'immobilisation d'un membre, induirait une augmentation de la sécrétion de RANKL et, par conséquent, une résorption osseuse accrue menant à une réduction de la densité osseuse [Bellido, 2014]. A terme, les ostéocytes sont digérés en parallèle des composants de la matrice osseuse au cours du processus de résorption mis en œuvre par les ostéoclastes (voir ci-dessous) [Baron, 2000].

3.4. Les ostéoclastes

3.4.1. L'ostéoclastogenèse

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption de la matrice osseuse. Ils sont formés suite à la différenciation de cellules précurseurs appartenant à la lignée des monocytes-macrophages [Väänänen et al., 2000]. En effet, dans la moelle osseuse, des progéniteurs myéloïdes communs, issus de cellules souches hématopoïétiques, se différencient en monocytes sous l'action d'une cytokine appelée M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) produite par les ostéoblastes et les cellules stromales [Geissmann et al., 2010]. En se liant à son récepteur, le M-CSF oriente les cellules précurseurs vers la lignée des monocytes-macrophages et contribue à leur prolifération et à leur survie [Tanaka et al., 1993]. Présents dans la moelle osseuse, la circulation sanguine et la rate, les monocytes peuvent se différencier sous l'action de différents stimuli en cellules dendritiques, en macrophages ou en ostéoclastes. En présence de M-CSF, les monocytes se différencient en macrophages, des cellules

tissulaires capables de sécréter des cytokines et de reconnaître de nombreuses molécules de l'hôte ou étrangères, telles que des pathogènes, grâce à divers récepteurs. Ces cellules sont considérées comme des cellules phagocytaires professionnelles possédant la capacité de digérer des pathogènes et d'éliminer les cellules apoptotiques. La différenciation des monocytes en cellules dendritiques requiert d'autres cytokines dont notamment du GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) [Geissmann et al., 2010]. Sous la stimulation du RANKL, les monocytes-macrophages fusionnent et se différencient en ostéoclastes [Hsu et al., 1999]. Le M-CSF est une nouvelle fois nécessaire lors de la différenciation en ostéoclastes, durant laquelle ils stimule la prolifération et la survie des cellules précurseurs mais induit également l'expression de RANK (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B*), le récepteur membranaire du RANKL (Fig 16) [Arai et al., 1999].



Figure 16: Les différentes étapes de la différenciation des ostéoclastes à partir des monocytes-macrophages. L'ostéoclastogenèse requiert la présence de la cytokine M-CSF qui, en plus d'être nécessaire à la prolifération et à la survie des monocytes-macrophages, induit l'expression de RANK à la surface des cellules précurseurs. Le RANKL peut alors se lier à son récepteur et induire l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires ainsi que divers facteurs de transcription. Ces derniers stimulent l'expression de protéines importantes à la différenciation et à l'activité des ostéoclastes, comme par exemple le canal chlorure CIC7, la cathepsine K ou l'anhydrase carbonique II (CAII pour *Carbonic Anhydrase* II). L'ostéoclastogenèse se caractérise également par la fusion de précurseurs mononucléés ce qui a pour effet de donner naissance à des cellules géantes multinuclées capables de dégrader la matrice osseuse (adapté à partir de Zhao et al., 2007).

Le RANKL est une cytokine, appartenant à la famille du *Tumor Necrosis Factor* (TNF), essentielle et suffisante à l'induction de l'ostéoclastogenèse. Il est principalement exprimé sous forme membranaire ou soluble par les ostéoblastes, les cellules stromales de la moelle osseuse, les ostéocytes et les lymphocytes activés. Les deux formes du RANKL, assemblées en homo-trimères, sont toutes deux capables de stimuler le récepteur RANK présent à la surface des monocytes-macrophages. Suite à sa

stimulation, RANK se trimérise et recrute TRAF6, un membre de la famille des TNF Receptor Associated Factor (TRAF), qui s'assemble sous la forme de trimère également (Fig 17). A son tour, TRAF6 induit l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires telles que JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) et p38 ainsi que des facteurs de transcription c-FOS, NF-KB (Nuclear Factor-Kappa B) et MITF (Microphtalmia-associated Transcription Factor). Grâce à l'activation de NF-κB et c-FOS, la liaison du RANKL à son récepteur aboutit à la stimulation de NFATc1 (Nuclear Factor of Activated T cells 1), le facteur de transcription majeur de la différenciation des ostéoclastes qui est suffisant pour induire l'ostéoclastogenèse. NFATc1 est capable de s'auto-amplifier et participe à la levée d'inhibition de la différenciation des ostéoclastes par la répression de gènes anti-ostéoclastogéniques. En parallèle, des signaux co-stimulateurs semblent être nécessaires à l'activation de NFATc1. L'identité exacte de ces signaux n'est pas clairement définie bien qu'il ait été suggéré qu'ils puissent être présents à la surface des précurseurs des ostéoclastes adjacents. L'activation des récepteurs co-stimulateurs OSCAR, PIR-A, TREM2 et SIRPβ1 mène à l'induction d'oscillations de la concentration de calcium intracellulaire, une étape cruciale à la stimulation de NFATc1 via la calcineurine. Avec la participation d'autres facteurs de transcription, NFATc1 activé induit ensuite l'expression de gènes importants pour le fonctionnement des ostéoclastes tels que la cathepsine K ou TRAP [Nakashima and Takayanagi, 2011b; Kim and Kim, 2014; Ono and Nakashima, 2018].

Précisons que la principale manifestation morphologique de l'ostéoclastogenèse est la fusion des membranes plasmiques de cellules précurseurs donnant ainsi naissance à des cellules géantes multinucléées dont le diamètre peut aller jusqu'à 100 μm.



Figure 17: Illustration des voies de signalisation aboutissant à l'induction de l'ostéoclastogenèse. La différenciation des ostéoclastes débute par la liaison du RANKL à son récepteur RANK à la surface des cellules précurseurs, à savoir les monocytes-macrophages. Cette interaction aboutit à la trimérisation du récepteur et au recrutement de TRAF6 qui, à son tour, active différentes voies de signalisation intracellulaires. Parmi celles-ci, se trouve la voie d'activation du NF-κB qui, avec l'aide du facteur de transcription c-FOS, stimule un autre facteur de transcription appelé NFATc1 qui est capable de s'auto-amplifier. La liaison du RANKL à son récepteur a également pour effet de réprimer l'expression de gènes anti-ostéoclastogéniques qui inhibent la différenciation des ostéoclastes. En plus du RANKL, l'activation de NFATc1 requiert la présence de signaux co-stimulateurs qui interagissent avec les récepteurs OSCAR, PIR-A, TREM2 ou SIRPβ1. Ces derniers recrutent des molécules qui portent des motifs ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*), tels que FcRγ et DAP12, ce qui a pour effet d'induire la phospholipase Cγ (PLCγ) qui provoque des fluctuations dans les niveaux cytosoliques du calcium. Ces modulations de concentration du calcium activent la calcineurine qui déphosphoryle NFATc1 et induit, par conséquent, sa translocation nucléaire. Avec la participation d'autres facteurs de transcription, NFATc1 stimule l'expression de protéines impliquées dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes (adapté à partir de Kim and Kim, 2014).

3.4.2. Les podosomes

Les ostéoclastes sont caractérisés par la formation de podosomes, des structures dynamiques en contact avec la matrice. Les podosomes sont observés dans certains types cellulaires spécifiques et sont impliqués dans l'adhésion, la migration et la dégradation de matrices extracellulaires. Un podosome contient un noyau central, environ 300 nm, dense riche en fibres d'actine, qui contient également des protéines associées à l'actine et le récepteur CD44. Ce noyau est entouré d'un « nuage » de fibres d'actine plus espacées contenant des protéines d'adhésion à la matrice telles que des intégrines et des protéines qui leurs sont associées ainsi que de la myosine (Fig 18) [Chabadel et al., 2007; Georgess et al., 2014].

Dans un premier temps, une multitude de podosomes s'agrègent à un pôle membranaire des ostéoclastes et forment progressivement un cercle plus large au cours de la maturation de la cellule en un ostéoclaste capable de résorption osseuse. Lorsque les cellules entrent en contact avec la matrice osseuse, ce cercle s'attache sur cette matrice via les récepteurs CD44 et les intégrines, se consolide et forme un anneau d'actine filamenteuse qui scelle l'ostéoclaste sur l'os. La zone extracellulaire « coincée » au sein de cet espace scellé entre l'os et l'ostéoclaste est la zone où se déroule la dégradation de la matrice osseuse appelée lacune de résorption ou de Howship [Destaing, Saltel et al., 2003]. Il est intéressant de noter que si les ostéoclastes sont différenciés *in vitro* sur du plastique ou sur du verre, les podosomes forment un cercle de type anneau d'actine mais moins condensé [Georgess et al., 2014].



Figure 18: Structure et organisation des podosomes formés aux différents stade de différenciation des ostéoclastes. Le schéma du haut illustre la structure de ces podosomes qui sont constitués de deux parties. D'une part, le noyau au centre est riche en CD44 et en actine ainsi qu'en protéines impliquées dans la polymérisation de cette dernière telles que le complexe Arp 2/3, WIP, WASp ou la cortactine (1). D'autre part, le nuage des podosomes est constitué d'intégrines qui permettent d'adhérer à la matrice extracellulaire, d'actine et de protéines reliant celles-ci entre elles comme la vinculine, la paxilline ou la taline (2). L'organisation des podosomes est adaptée en réponse à des modifications du milieu extracellulaire, notamment grâce à la présence de la myosine qui permet d'associer entre elles les fibres d'actine du nuage. Le schéma du bas représente l'organisation des podosomes au cours de l'ostéoclastogenèse. Dans un premier temps, ces structures forment des agrégats (A) qui s'assemblent ensuite sous forme de cercles (B) dans les ostéoclastes à un stade de différenciation plus avancé. Une fois en contact avec la matrice osseuse, les podosomes se condensent pour former un ou plusieurs anneaux d'actine (C) alors que sur du verre ou du plastique les podosomes s'organisent sous la forme d'une « ceinture » (D) ressemblant aux anneaux d'actine. Toutefois, ces structures se distinguent des anneaux d'actine par leur plus faible densité et par leur présence uniquement à l'extrême périphérie cellulaire (échelle : 5 µm, adaptés à partir de Chabadel et al., 2007; Georgess et al., 2014).

3.4.3. L'activité de résorption osseuse des ostéoclastes

Une fois que l'anneau d'actine est formé, les ostéoclastes peuvent commencer à dégrader la matrice osseuse par l'intermédiaire de la sécrétion d'enzymes lysosomales dans la lacune de résorption ainsi que grâce à son acidification. Ces enzymes sont libérées dans la lacune lors de l'exocytose régulée du contenu de lysosomes spécialisés, parfois appelés lysosomes de sécrétion (voir plus haut) dont la membrane fusionne avec la membrane apicale des ostéoclastes [Vaes, 1968; Lacombe et al., 2013].

Les nombreux évènements de fusion des lysosomes qui se déroulent à cet endroit donnent à la membrane apicale un aspect de bordure en brosse. Les ostéoclastes renferment deux types de lysosomes, les lysosomes que nous désignerons comme conventionnels et les lysosomes de sécrétion dont la caractérisation reste limitée à l'heure actuelle. Toutefois, il a pu être montré que la cathepsine D, une hydrolase acide ubiquiste, est plus abondante dans les lysosomes conventionnels alors que la cathepsine K, une protéase surexprimée par les ostéoclastes et qui dégrade le collagène de type I, est majoritairement présente dans les lysosomes de sécrétion (Fig 19) [van Meel, Boonen et al., 2011; Brömme et al., 1996; Bossard et al., 1996; Czupalla et al., 2006]. Une autre hydrolase acide marqueur des ostéoclastes, TRAP est elle aussi localisée dans les lysosomes de sécrétion et libérée par l'exocytose de leur contenu. Notons que TRAP peut aussi être libérée dans la lacune sous la forme d'un précurseur, en suivant la voie de la sécrétion constitutive à partir du TGN [van Meel, Boonen et al., 2011].

La fusion des lysosomes de sécrétion avec la membrane apicale des ostéoclastes dépendrait notamment de la petite GTPase Rab7, qui serait nécessaire au mouvement des lysosomes de sécrétion vers la périphérie cellulaire et à l'exocytose de leur contenu. En effet, Rab7 formerait un complexe protéique comprenant Plekhm1, DEF8, FAM98A et NDEL1 qui permettrait d'associer les lysosomes aux microtubules et, par conséquent, participerait à leur transport vers la bordure en brosse [Fujiwara et al., 2016]. Par la suite, Rab7 interagirait avec Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin subtrate protein 1), une GTPase de la famille Rho qui est connue pour réguler la polymérisation de l'actine. Il a été rapporté qu'un des effecteurs de Rac1, IQGAP1 (Ras GTPase-Activating-like Protein 1) qui est aussi capable de lier l'actine, peut interagir avec CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein 170), une protéine qui s'accumule à l'extrémité + des microtubules. Il est donc envisageable que l'interaction de ces protéines soit impliquée dans le transfert des lysosomes de sécrétion des microtubules vers le réseau d'actine au contact de la bordure en brosse [Sun et al., 2005]. Ce processus serait suivi par la fusion des membranes lysosomale et plasmique qui nécessiterait également l'intervention de la SNARE lysosomale VAMP7 (Vesicle-Associated Membrane Protein 7) et de la synaptotagmine VII [Palokangas et al., 1997; Zhao et al., 2008]. Enfin, il a pu être montré que l'établissement de la bordure en brosse et l'exocytose du contenu des lysosomes de sécrétion étaient dépendantes de protéines impliquées dans le processus d'autophagie, telles qu'ATG5, ATG7, ATG4B (Autophagy related proteins) et LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3), sans que leur fonction précise n'ait pu être déterminée [DeSelm, Miller et al., 2011].



Figure 19: Illustration du trafic des hydrolases acides dans les ostéoclastes. Les enzymes de dégradation TRAP et cathepsine K (Cat K) sont transportées vers les lysosomes de sécrétion (SL) par une voie de ciblage dépendante du Man-6-P avant d'être libérées, sous forme active et mature, dans la lacune de résorption. En parallèle, TRAP est également sécrétée sous forme d'un précurseur par la voie de sécrétion constitutive indépendante du Man-6-P. Dans les ostéoclastes, les lysosomes de sécrétion co-existent avec les lysosomes conventionnels caractérisés par la présence de la cathepsine D (Cat D) dirigée vers ces organites par une voie de transport indépendante du Man-6-P (adapté de van Meel, Boonen et al., 2011).

Par ailleurs, la fusion de la membrane des lysosomes de sécrétion avec la bordure en brosse a pour conséquence d'y amener la pompe à protons v-ATPase, localisée dans la membrane des lysosomes, et ainsi d'acidifier la lacune de résorption (Fig 20). En effet, les protons produits dans le cytosol des ostéoclastes grâce à l'action de l'anhydrase carbonique II sont transportés par le complexe v-ATPase vers la lacune ce qui a pour effet d'y créer un environnement acide dont le pH est proche de celui régnant dans les lysosomes [Väänänen et al., 1990; Lacombe et al., 2013]. L'électroneutralité de cette lacune est maintenue grâce à un canal chlorure CIC7 présent dans la bordure en brosse qui y transporte également des anions chlorure menant ainsi à l'apparition de HCI en contact avec la matrice osseuse [Graves et al., 2008].

Tous ces éléments confèrent aux ostéoclastes la capacité de dégrader la matrice osseuse, un processus qui se déroule en deux étapes successives. Dans un premier temps, l'environnement acide de la lacune de résorption provoque la dissolution de la partie minérale du tissu osseux. Dans un second temps, les enzymes sécrétées par exocytose du contenu des lysosomes de sécrétion dégradent les composants de la matrice osseuse organique exposés suite à la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite [Väänänen et al., 2000]. L'acidification de la lacune de résorption favorise également le déroulement de cette seconde étape puisque l'optimum de pH d'activité de la majorité des enzymes protéolytiques est acide.



Figure 20: Illustration de l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes. Au contact de la matrice osseuse, les ostéoclastes se polarisent pour former une lacune de résorption scellée par un anneau d'actine. Ces cellules géantes dégradent l'os grâce à la sécrétion d'enzymes telles que la cathepsine K (CTSK) suite à la fusion de la membrane des lysosomes de sécrétion avec leur membrane apicale appelée bordure en brosse. Cette excrétion permet aussi d'amener des pompes à protons v-ATPase au niveau de la bordure en brosse et, par conséquent, d'acidifier la lacune de résorption. Cette diminution du pH permet la dissolution de la matrice inorganique mais favorise également l'activité des enzymes de dégradation. Les protons transportés vers la lacune sont générés dans le cytosol par la dissociation d'acide carbonique H₂CO₃, lui-même produit grâce à l'anhydrase carbonique II (CAII) à partir de CO₂ et d'H₂O. L'électroneutralité de la lacune de résorption est maintenue grâce à un canal appelé CIC7 qui y transporte des ions chlorure depuis le cytoplasme. Ce dernier contient des ions chlorure grâce à l'action d'un échangeur de chlorure/bicarbonate présent dans la membrane basolatérale des ostéoclastes. Au cours de la résorption, des produits de dégradation de la matrice osseuse ainsi que des enzymes de dégradation sont transcytés à travers l'ostéoclaste (adapté à partir de Feng and McDonald, 2011).

Suite à la résorption osseuse, les produits de dégradation de la matrice peuvent être éliminés par endocytose au niveau de la bordure en brosse suivie de leur transport à travers l'ostéoclaste et de leur sécrétion du côté opposé à la lacune (Fig 20). Lors de cette transcytose, la dégradation des composants de la matrice osseuse pourrait se poursuivre, grâce à l'endocytose dans les mêmes vésicules de transcytose, d'enzymes présentes dans la lacune de résorption, la cathepsine K en particulier [Nesbitt and Horton, 1997]. Une autre enzyme qui jouerait un rôle important dans ce processus de transcytose est la phosphatase TRAP qui, à l'instar de la cathepsine K, est fortement surexprimée lors de la différenciation des ostéoclastes [Czupalla et al., 2006]. Deux mécanismes de transport de TRAP vers les vésicules de transcytose ont été proposés. D'une part, TRAP pourrait être endocyté au niveau de la bordure en brosse suite à sa sécrétion dans la lacune de résorption par exocytose du contenu des lysosomes de sécrétion et par la voie de sécrétion constitutive. D'autre part, il a été proposé que TRAP rejoigne directement la voie de transcytose par fusion de vésicules intracellulaires sans passer par une étape de sécrétion suivie d'une ré-internalisation [Vääräniemi et al., 2004]. Dans ces vésicules de transcytose, TRAP participerait à la dégradation de composants de la matrice osseuse grâce à ses activités de phosphatase et de production de dérivés réactifs de l'oxygène qui se mettent

respectivement en place à un pH acide et neutre [Vääräniemi et al., 2004]. TRAP contient en effet en son centre un atome de fer qui présente un potentiel d'oxydoréduction. Alors qu'en présence d'H₂O₂ le fer sous forme ferreuse (Fe^{2+}) peut produire des radicaux hydroxyles et des ions ferrique (Fe^{3+}), ces derniers dans ces mêmes conditions peuvent générer des ions superoxyde et de fer ferreux. Des réactions d'oxydations et de réductions de l'atome de fer pourraient dès lors se mettre en place séquentiellement et produire des radicaux hydroxyles et des ions superoxyde tant que de l'H₂O₂ est disponible [Kaija, Alatalo et al., 2002]. Ce dernier pourrait être généré dans les vésicules de transcytose grâce à des superoxydes dismutases à partir d'ions superoxyde, qui eux-mêmes seraient formés par des NADPH oxydases (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate oxidase) présentes au niveau de la bordure en brosse. L'ensemble de ces observations a amené l'équipe d'H. Kalervo Väänänen à postuler que TRAP participerait à la dégradation des composants de la matrice osseuse dans les vésicules de transcytose dans un premier temps grâce à son activité phosphatase qui se met en place dans un environnement acide. Le pH augmentant au cours du processus de transcytose, l'activité phosphatase serait progressivement remplacée par l'activité de production de dérivés réactifs de l'oxygène de TRAP qui se déroule à pH neutre [Vääräniemi et al., 2004]. Par ailleurs, cette voie de transcytose permet aux ostéoclastes de libérer des composants de la matrice osseuse qui pourraient stimuler ou inhiber les ostéoblastes mais aussi les ostéoclastes eux-mêmes, tels que des facteurs de croissance ou l'ostéocalcine [Tang, Wu et al., 2009].

Suite à la résorption de la matrice osseuse à un endroit particulier, l'ostéoclaste semble pouvoir désassembler son ou ses anneaux d'actine et migrer vers un autre site de résorption. Alternativement, certains ostéoclastes entreraient en apoptose [Georgess et al., 2014].

3.5. Le remodelage osseux

Le tissu osseux est continuellement dégradé et reformé par un processus appelé remodelage osseux. La mise en place de ce phénomène permet de remplacer l'os désorganisé par de l'os lamellaire, de renouveler de l'os vieillissant, d'éliminer des microfractures ou de réguler l'homéostasie du calcium [Del Fattore et al., 2012]. Ainsi, à un instant donné, environ 10 % du squelette d'un adulte sont en cours de renouvellement [Ralston, 2013]. Puisque les cellules nécessaires au remodelage osseux peuvent provenir de la moelle osseuse ou de la circulation, l'os est renouvelé au contact de l'endoste ou à proximité des vaisseaux sanguins traversant les systèmes de Havers [Baron, 2000]. Le remodelage osseux prend place au sein d'unités multicellulaires de base, constituées des cellules essentielles à son déroulement et est subdivisé en quatre phases : l'activation, la résorption, l'inversion et la formation (Fig 21) [Del Fattore et al., 2012]. La phase d'**activation** débute par l'apparition de différents stimuli tels que des microfractures ou la libération de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor* α), d'interleukine 1 (IL-1 pour *interleukin* 1), d'interleukine 6 (IL-6 pour *interleukin* 6) ou de vitamine D. Ces signaux stimulent l'expression de RANKL, de *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) et de *Stromal cell-Derived Factor-1* (SDF-1) par les ostéoblastes, les cellules stromales, les cellules endothéliales, les cellules bordant l'os ou encore les ostéocytes [Del Fattore et al., 2012]. Les cytokines MCP-1 et SDF-1 sont des chémoattractants responsables du recrutement des précurseurs des ostéoclastes alors que, comme expliqué ci-dessus, le RANKL a pour fonction d'induire l'ostéoclastogenèse [Yu et al., 2003; Tamasi et al., 2013].

Les ostéoclastes différenciés sous l'action du RANKL migrent jusqu'au site de résorption et débutent la phase de **résorption**. Au contact de la matrice osseuse, les ostéoclastes se polarisent et organisent leurs podosomes sous forme d'anneaux d'actine par l'intermédiaire d'interactions entre des intégrines et le CD44 avec des protéines de la matrice telles que l'ostéopontine ou l'ostéonectine. Une fois la lacune de résorption formée, les ostéoclastes remplissent leur fonction de dégradation de la matrice osseuse [Chabadel et al., 2007; Baron, 2000].

Suite à l'apoptose ou à la migration des ostéoclastes vers un autre site, une phase d'« **inversion** » se met en place. Au cours de celle-ci, les signaux qui contrôlaient la résorption osseuse lors de la phase précédente sont progressivement remplacés par des signaux qui stimulent la formation osseuse. Cette phase est encore mal caractérisée mais pourrait impliquer le recrutement de cellules mononucléées au niveau du site résorbé [Delaisse, 2014].

La dernière étape du remodelage osseux est la plus longue et correspond à la **formation** de la matrice. Les ostéoblastes recrutés au niveau du site de renouvellement osseux produisent le tissu ostéoïde qui sera minéralisé par la suite [Del Fattore et al., 2012].



Figure 21 : Déroulement des quatre étapes successives du remodelage osseux. La première étape correspond à la phase d'activation qui consiste à recruter et à induire la différenciation des monocytes-macrophages en ostéoclastes. Ces processus se mettent respectivement en place suite à la sécrétion des molécules chémoattractrices MCP-1 et SDF-1 ainsi que de RANKL par différents types cellulaires dont les ostéocytes en réponse à divers stimuli tels que la présence de cytokines ou de microfractures. Arrivés au site de résorption, les ostéoclastes matures entament la deuxième phase, appelée phase de résorption, au cours de laquelle ils dégradent la matrice osseuse. Une fois que les ostéoclastes ont exercé leur activité, ils entrent en apoptose ou migrent vers un autre site de résorption laissant place à la troisième phase nommée phase d'inversion. Cette étape, dont les mécanismes sont peu connus, semble jouer un rôle dans le passage entre la phase de résorption osseuse et la phase suivante, celle de la formation osseuse. Enfin, des précurseurs des ostéoblastes migrent jusqu'au site de remodelage osseux et entament la phase de formation une fois différenciés. Les ostéoblastes produisent le tissu ostéoïde qui sera minéralisé dans les jours suivants avant d'entrer en apoptose ou de se différencier en ostéocytes ou en cellules bordant l'os (adapté à partir de Dole et al., 2015).

3.6. Les perturbations de la résorption osseuse

Un équilibre finement régulé entre les processus de formation et de résorption osseuse est essentiel au maintien d'une masse osseuse normale. Une résorption osseuse insuffisante induit l'apparition d'ostéopétrose, un groupe hétérogène de maladies génétiques caractérisées par une augmentation de la masse osseuse. Un exemple d'ostéopétrose est la pycnodysostose qui est provoquée par une déficience en cathepsine K [Palagano et al., 2018]. De façon similaire, les souris dans lesquelles le gène codant pour TRAP ou la cathepsine K a été délété développent un phénotype d'ostéopétrose [Saftig et al., 1998; Hayman et al., 1996].

Cette pathologie peut notamment être classifiée en fonction du nombre d'ostéoclastes présents dans les tissus osseux. D'une part, les ostéopétroses riches en ostéoclastes sont dues à des mutations dans des gènes essentiels à l'activité des ostéoclastes. Elles sont caractérisées par un grand nombre d'ostéoclastes mais ceux-ci sont non fonctionnels. Ces cas sont souvent accompagnés par une formation osseuse normale ou accrue. D'autre part, les ostéopétroses pauvres en ostéoclastes sont

provoquées par des mutations dans des gènes essentiels à l'ostéoclastogenèse et sont caractérisées par une absence ou une diminution du nombre d'ostéoclastes. Ces pathologies sont généralement accompagnées d'une réduction du nombre d'ostéoblastes en raison d'une diminution des signaux stimulateurs par les ostéoclastes. En effet, il a pu être établi que les ostéoclastes produisent des molécules qui stimulent le fonctionnement des ostéoblastes indépendamment de la dégradation de la matrice osseuse [Karsdal et al., 2008].

A l'inverse, un excès de résorption osseuse par rapport à la formation par les ostéoblastes peut induire l'apparition d'une pathologie appelée ostéoporose. Il en résulte une diminution de la densité osseuse et une perturbation de la structure osseuse qui augmentent la fragilité osseuse et le risque de fracture. L'ostéoporose est définie comme une densité osseuse située au minimum 2.5 écart-types en-dessous de la valeur moyenne de la densité des adultes jeunes. Une diminution entre 1 et 2.5 écart-types correspond à de l'ostéopénie, qui peut être précurseur d'ostéoporose [Akkawi and Zmerly, 2018]. Différents facteurs peuvent être à l'origine du développement d'une ostéoporose. Par exemple, l'ostéoporose apparaît fréquemment après la ménopause, suite à la diminution des estrogènes, ce qui provoque une stimulation de la résorption osseuse. Bien qu'une augmentation de la formation osseuse est aussi observée, elle ne suffit pas à compenser la résorption osseuse accrue (Fig 22) [Feng and McDonald, 2011]. En absence d'estrogènes, l'expression d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- α par les monocytes, les lymphocytes T, les ostéoblastes et les cellules stromales est augmentée [Takao et al., 2005; Wang et al., 2006; Kramer et al., 2004]. Ces cytokines favorisent la diminution de la densité osseuse par l'intermédiaire d'une stimulation de l'ostéoclastogenèse, de l'activité des ostéoclastes, de leur survie ainsi que de l'expression de RANKL [Jimi et al., 1998; Jimi et al., 1999; Kobayashi et al., 2000; Fuller et al., 2002; Kudo et al., 2003; Kim et al., 2009]. De plus, les estrogènes augmentent l'expression d'ostéoprotégérine, un récepteur soluble du RANKL qui bloque son interaction avec le récepteur RANK et donc diminue l'ostéoclastogenèse [Bord et al., 2003]. Les estrogènes induisent également l'apoptose des ostéoclastes mais inhibent celle des ostéoblastes [Kameda et al., 1997].



Figure 22: Mécanismes pathologiques menant à l'apparition d'une ostéoporose après la ménopause. La perte osseuse observée après la ménopause est principalement due à une diminution de la concentration en estrogènes qui influencent le remodelage osseux à plusieurs niveaux. Tout d'abord, les estrogènes inhibent la sécrétion de cytokines telles qu'IL-1, IL-6 et le TNF- α par les monocytes, les lymphocytes T et des cellules de la lignée ostéoblastique. Cette levée d'inhibition après la ménopause augmente la résorption osseuse puisque ces molécules stimulent la différenciation et l'activité des ostéoclastes. En outre, les estrogènes diminuent l'ostéoclastogenèse à travers l'inhibition de la sécrétion de RANKL et la stimulation de la production d'ostéoprotégérine (OPG ou *osteoprotegerin*), un récepteur leurre soluble de ce dernier. Enfin, les estrogènes favorisent l'apoptose des ostéoclastes. En plus des estrogènes, l'hormone folliculo-stimulante (FSH pour *Follicle Stimulating Hormone*) jouerait également un rôle dans la diminution de la densité osseuse principalement lors de la pré-ménopause (adapté à partir de Feng and McDonald, 2011).

Un autre facteur favorisant l'apparition d'une ostéoporose est le vieillissement qui est associé à une diminution de la formation osseuse en absence de modification majeure de la résorption. Avec l'âge, les niveaux sériques de l'hormone de croissance (GH pour *Growth Hormone*) et du facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (IGF-1 pour *Insulin-like Growth Factor 1*), qui stimulent la différenciation et l'activité des ostéoblastes, diminuent. A l'inverse, une augmentation des niveaux circulants de la parathormone est observée chez les personnes âgées. Une stimulation continue par cette hormone induit une augmentation de l'ostéoclastogenèse. Chez l'homme, la diminution de la densité osseuse est également associée à une réduction des androgènes capables de stimuler les ostéoblastes [Locatelli and Bianchi, 2014].

Pour terminer, l'ostéoporose peut également résulter de complications dues à différentes conditions médicales. Elles peuvent, par exemple, se développer suite à des traitements prolongés avec des glucocorticoïdes ou à l'immobilisation d'un membre [Feng and McDonald, 2011].

Une altération du processus de remodelage osseux est également observée dans le cadre du développement d'arthrose. Cette pathologie articulaire dégénérative, déjà évoquée dans le cadre de la description des phénotypes associés à une déficience en HYAL1, est une pathologie complexe dont les différentes causes sont encore mal comprises. Elle est caractérisée par une destruction du cartilage articulaire, une inflammation de bas grade de la membrane synoviale et le développement d'excroissances osseuses appelées ostéophytes [Mora et al., 2018]. Un processus impliqué dans le développement précoce de cette pathologie est la présence d'un remodelage osseux accéléré de l'os sous-chondral, présent juste en-dessous du cartilage articulaire, associé à une augmentation du nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes sous-chondraux. Cet os sous-chondral présente une perte osseuse au début de l'arthrose qui est suivie par une sclérose à un stade avancé. L'apparition de cet os sclérotique plus volumineux résulte d'une synthèse augmentée de collagène de type I par les ostéoblastes sous une forme anormale ce qui a pour effet d'altérer la minéralisation [Wen et al., 2014; Weber, Chan et al., 2017]. Malgré sa prévalence très élevée, la physiopathologie de l'arthrose est peu comprise. Le rôle de l'inflammation est par exemple mal défini puisqu'il n'est pas établi si elle est responsable du déclenchement de l'arthrose ou s'il s'agit d'une réaction secondaire à l'apparition de la pathologie. De même, il n'est pas clairement défini si la dégradation du cartilage précède ou est consécutive à l'accélération du remodelage de l'os sous-chondral. Il a toutefois été récemment démontré qu'une augmentation de l'activité des ostéoclastes, et donc du remodelage osseux, était capable de stimuler la production de métalloprotéases et la dégradation du cartilage observées dans l'arthrose [Zhang et al., 2018].

3.7. Les rôles de l'acide hyaluronique dans l'os

3.7.1. La présence de l'acide hyaluronique dans les tissus osseux

Plusieurs études ont montré que le tissu osseux contenait de l'HA, qui représente environ 7 % des GAGs présents dans la matrice osseuse organique [Oohira and Nogami, 1989]. A la fois les ostéoblastes et les ostéoclastes sont capables de produire de l'HA *in vitro* [Luben et al., 1976; Wong, 1979; Aubin et al., 1982; Ecarot-Charrier and Broekhuyse, 1987]. Au niveau histologique, de l'HA a pu être observé autour des ostéoblastes, des ostéocytes, des cellules bordant l'os et des ostéoclastes [Genever and Dickson, 1996; Midura et al., 2003]. Le rôle de cette molécule *in vivo* reste néanmoins hypothétique à ce stade [Bastow et al., 2008].

Bien qu'il ait été rapporté que la concentration de l'HA dans le tissu osseux est modifiée dans différentes conditions physiologiques et pathologiques, les causes et conséquences de cette modification sur le remodelage osseux restent peu comprises. Nous avons détaillé ci-dessous quelques observations historiques qui ont soulevé la question de l'importance relative de l'HA dans ce processus.

- Dans les années 70, il a été découvert que la parathormone, une molécule qui stimule la résorption osseuse, provoque une augmentation de la synthèse de l'HA par le tissu osseux spécifiquement [Severson et al., 1973; Luben et al., 1974]. Des tests, réalisés *in vitro*, ont par la suite permis de montrer que cette synthèse accrue d'HA peut être attribuée aux ostéoclastes et aux ostéoblastes [Luben et al., 1976; Midura et al., 1994].
- Par après, il a été remarqué que la production d'HA par les ostéoclastes mais également par les ostéoblastes est diminuée lors d'un traitement avec des glucocorticoïdes, qui sont connus pour leur capacité à provoquer une diminution de la densité osseuse lors de traitements prolongés [Wong, 1979; Zhang et al., 2000].
- Il a aussi été observé que la quantité d'HA présent dans les tibias de rats diminue avec l'âge [Prince and Navia, 1983].
- Il a par ailleurs été rapporté que la quantité d'HA dans l'os augmente chez les poussins lorsque leur alimentation est déficiente en vitamine D, en calcium ou en phosphate [Dickson and Roughley, 1993]. De même, il a été observé que l'HA s'accumule dans certaines zones de la plaque de croissance de poussins en absence de vitamine D [Genever and Dickson, 1996].
- Pour terminer, mentionnons que la concentration d'HA est augmentée dans les os de patients atteints d'ostéogenèse imparfaite, une pathologie caractérisée par une fragilité osseuse généralement due à des mutations dans le gène codant pour le collagène de type I [Oohira and Nogami 1989].

Pour élucider le lien entre l'HA et le remodelage osseux, plusieurs groupes de chercheurs se sont attelés à étudier de plus près le ou les rôle(s) de l'HA au niveau des divers types cellulaires osseux. Nous nous concentrerons ci-dessous sur les ostéoblastes et les ostéoclastes.

3.7.2. Les effets de l'acide hyaluronique sur les ostéoblastes

Il est difficile à ce stade de tirer une conclusion définitive sur l'influence de l'HA sur le fonctionnement des ostéoblastes que ce soit au niveau de leur différenciation, leur prolifération ou leur activité. En effet, toutes les études qui ont investigué cette question *in vitro*, en incubant divers modèles cellulaires ostéoblastiques avec de l'HA, n'obtiennent pas des résultats concordants. Il est probable que cela s'explique, du moins en partie, par l'utilisation de molécules d'HA de masses moléculaires différentes. Or, dans d'autres systèmes, il a clairement été établi que la taille de l'HA influence grandement ses effets, qui peuvent être totalement opposés entre des fragments de masse moléculaire faible ou élevée. Ne connaissant pas précisément le profil de masse moléculaire de l'HA osseux, il est difficile de sélectionner la taille de l'HA à utiliser dans des tests expérimentaux, ce qui rend la transposition des
données obtenues avec un modèle cellulaire incubé en présence d'une seule taille d'HA (sélectionnée aléatoirement) à la situation *in vivo* compliquée. Un résumé des effets de l'HA qui ont été décrits *in vitro* sur les ostéoblastes sont néanmoins repris ci-dessous.

Tout d'abord, il a été observé que des précurseurs d'ostéoblastes cultivés sur une surface recouverte d'HA, immobilisé dans le fond du puit, ne présentent pas de modification de leur migration ou de leur adhésion [Salbach-Hirsch et al., 2014; Mathews et al., 2014]. Par contre, d'après les équipes de Shekhar Kumtar et Cody Bünger, lorsque ces cellules sont incubées avec de l'HA soluble ajouté dans le milieu de culture, quelle que soit sa taille, leur prolifération est accélérée [Huang et al., 2003; Zou et al., 2008]. Une observation dans le même sens a été réalisée par plusieurs autres études qui ont rapporté que la différenciation et l'activité des ostéoblastes sont stimulées par de l'HA, bien que selon ces travaux, cet effet soit visible que l'HA soit soluble ou immobilisé [Huang et al., 2003; Zou et al., 2008; Kawano et al., 2011; Mathews et al., 2014; Zhao et al., 2015]. Deux autres équipes ont néanmoins observé un effet inhibiteur de l'HA sur ces cellules. Le premier groupe de recherche a observé une diminution de la prolifération ainsi que de l'adhésion des précurseurs des ostéoblastes lorsque de l'HA est immobilisé dans le fond de la surface de culture [Zhao et al., 2015]. L'autre équipe a détecté une réduction de l'activité de formation osseuse par les ostéoblastes lors d'un traitement prolongé avec de l'HA [Falconi and Aubin, 2007]. Cette même équipe rapporte néanmoins qu'une incubation de courte durée influence positivement le fonctionnement des ostéoblastes. Précisons également que, dans cette étude, un traitement des ostéoblastes avec de l'hyaluronidase a des effets similaires à ceux de l'HA, ce qui amène à se demander si les effets observés peuvent réellement être attribués à l'HA dans ce travail [Falconi and Aubin, 2007].

Au vu de ces informations, contradictoires pour certaines, nous ne pouvons conclure si, *in vivo*, l'HA possède une action pro-formation ou anti-formation osseuse en se liant à la surface des ostéoblastes.

3.7.3. Les effets de l'acide hyaluronique sur les ostéoclastes

Comme pour les ostéoblastes, des effets de l'HA sur l'adhésion, la migration, la différenciation et l'activité des ostéoclastes, ont été observés. Les effets décrits sont cependant eux aussi difficiles à interpréter et à corréler avec le remodelage osseux *in vivo* au vu des informations parfois contradictoires renseignées dans la littérature, mais aussi de l'absence de données précises sur la taille des molécules d'HA présentes dans l'os.

Il a par exemple été montré, par un premier groupe de chercheurs, que les surfaces recouvertes d'HA favorisent l'adhésion des ostéoclastes humains sans qu'un impact comparable n'ait pu être mis en évidence concernant les cellules précurseurs [Spessotto et al., 2002]. Un effet inhibiteur a toutefois été obtenu sur des cellules précurseurs d'ostéoclastes murins [Salbach, Kliemt et al., 2012]. Concernant l'influence de l'HA sur le niveau de différenciation et d'activité de résorption des ostéoclastes, les données *in vitro* sont relativement concordantes. A l'heure actuelle, toutes les études

réalisées démontrent un effet inhibiteur de l'HA de haute masse moléculaire sur la différenciation et l'activité des ostéoclastes, que l'HA soit soluble ou immobilisé sur les surfaces sur lesquelles les cellules sont cultivées. Cette inhibition est associée à une diminution des voies de signalisation stimulées par la cytokine M-CSF, du nombre de lysosomes ainsi que de l'expression de la cathepsine K, de TRAP, de MMP-9 (Matrix Metalloproteinase 9) et du récepteur RANK [Chang, Kim et al., 2007; Pivetta et al., 2011; Salbach, Kliemt et al., 2012]. Précisons que MMP-9 est une métalloprotéase qui serait importante pour la migration des ostéoclastes vers leurs sites de résorption ainsi que pour l'élimination des débris présents au niveau de ces zones de résorption une fois que les ostéoclastes ont rempli leur fonction de dégradation de la matrice osseuse [Everts et al., 2002; Yu et al., 2003]. Il a aussi été suggéré que cette enzyme participe directement au processus de résorption osseuse [Li et al., 2006]. Deux équipes de recherche ont montré que, lorsque des fragments d'HA sont ajoutés dans le milieu de culture tout au long de la différenciation des ostéoclastes in vitro, ils accélèrent ce processus et stimulent leur activité de résorption. Cet effet a été attribué à une augmentation de l'expression de RANK et des voies de signalisation induites par le RANKL [Ariyoshi et al., 2005; Chang, Kim et al., 2007]. Une autre étude a cependant obtenu des résultats opposés, montrant que l'HA de faible masse moléculaire réduit la différenciation et l'activité des ostéoclastes ainsi que l'expression de la cathepsine K et de MMP-9 [Lee et al., 2014]. Au cours de ce travail, l'HA avait été ajouté pendant les 24 dernières heures du processus de différenciation.

A l'exception d'un travail de recherche émettant l'hypothèse que l'inhibition du fonctionnement des ostéoclastes par l'HA de haute masse moléculaire serait médié par le récepteur TLR4, tous les autres effets, que ce soit par l'HA de grande ou de petite taille, ont été attribués à une liaison de l'HA à son récepteur CD44 [Spessotto et al., 2002; Ariyoshi et al., 2005; Chang, Kim et al., 2007; Pivetta et al., 2011]. Notons cependant que cela inclus également la capacité de l'HA à impacter indirectement la différenciation et l'activité des ostéoclastes par l'intermédiaire d'autres cellules. Ainsi, par sa liaison avec le CD44 sur les cellules stromales de la moelle osseuse, l'HA pourrait modifier l'expression de RANKL par ces cellules. Toutefois, les deux études qui se sont intéressées à ce processus ont rendu des conclusions opposées, l'une observant une stimulation, l'autre une inhibition de la production de RANKL en présence d'HA [Cao et al., 2005; Ariyoshi et al., 2014].

3.7.4. Les acteurs du métabolisme de l'acide hyaluronique dans l'os

Les études décrites ci-dessus mettent en avant l'importance de l'abondance et de la masse moléculaire de l'HA dans le contrôle de la fonction des ostéoblastes et des ostéoclastes. Tel que mentionné dans un chapitre précédent, les HAS sont en charge de la production d'HA et les hyaluronidases, en particulier HYAL1 et HYAL2 dans les tissus somatiques, sont responsables du catabolisme de ce polymère.

A l'heure actuelle, les informations concernant l'expression et le rôle des HAS et des hyaluronidases dans le remodelage osseux restent très limitées. En 1965, le travail de Gilbert Vaes et de Paul Jacques

a permis de mettre en évidence la présence d'une activité de dégradation de l'HA dans les os de la voûte crânienne de rats [Vaes and Jacques, 1965]. Deux ans plus tard, la même équipe de recherche a proposé que la ou les enzymes responsable(s) de cette activité hyaluronidasique réside(nt) dans les lysosomes [Vaes, 1967]. Il faut préciser que l'activité de dégradation de l'HA avait été détectée par une technique qui consiste à incuber les échantillons avec une solution contenant de fortes concentrations d'HA de grande taille qui rendent ce milieu visqueux. La présence d'une activité de dégradation de l'HA dans les échantillons peut ainsi être évaluée par la mesure de la diminution de la viscosité de la solution. A l'instar de la technique de Reissig, le catabolisme de l'HA détecté par cette technique n'est pas spécifique d'une hyaluronidase mais correspond à la dégradation globale de l'HA par différents acteurs.

Seule une étude ultérieure a exploré les niveaux d'expression des HAS et des hyaluronidases dans des cellules osseuses, et plus précisément dans des ostéoblastes avant et après induction de leur capacité à produire une matrice minéralisée. Alors que l'expression des HAS était inhibée, les niveaux des hyaluronidases étaient augmentés dans les ostéoblastes actifs qui présentaient également une baisse de leur production d'HA par rapport aux cellules ne produisant pas de matrice minéralisée. Les expressions d'HAS1 et d'HYAL1 n'ont pas pu être détectées dans les ostéoblastes quelle que soit la condition [Adams et al., 2006]. Curieusement, la présence de ces acteurs du métabolisme de l'HA n'a jamais été investiguée dans les ostéoclastes. En outre, il n'a jamais été déterminé quelles étaient les cellules responsables de l'activité de dégradation de l'HA détectée en 1965 dans le tissu osseux ni la ou les enzymes produisant cette activité. Les potentielles expression et fonction des hyaluronidases dans les différents types de cellules osseuses, et en règle générale dans le remodelage osseux, est par conséquent un sujet qui reste largement inexploré.

OBJECTIFS

Objectifs

Les constats qui ont été établis au début de ce travail de thèse et qui ont mené au lancement du projet sont les suivants. Plusieurs groupes de chercheurs ont démontré par le passé qu'HYAL1 est l'un des principaux acteurs du catabolisme de l'acide hyaluronique (HA) dans les tissus somatiques. Cependant, le modèle du catabolisme de l'HA reste imprécis, notamment en raison des doutes entourant la localisation subcellulaire de l'enzyme. D'autre part, bien qu'une analyse de la littérature souligne que de nombreux processus physiologiques sont influencés par l'HA de façon dépendante de sa masse moléculaire, l'implication d'HYAL1 dans plusieurs de ces régulations reste non démontrée. Sur base d'études réalisées in vitro, il a notamment été postulé que l'HA et ses fragments pourraient jouer un rôle dans le remodelage de l'os en modulant la prolifération, la différenciation et l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. Les résultats de ces études sont cependant parfois contradictoires quant au rôle promoteur ou inhibiteur de molécules d'HA de masses moléculaires différentes. Une observation préliminaire intrigante, provenant de données non publiées obtenues par van Meel, Boonen et al. lors de leur étude sur le trafic des hydrolases acides dans des ostéoclastes de souris, est que l'expression de l'ARNm d'HYAL1 pourrait être largement augmentée au cours de l'ostéoclastogenèse (communication personnelle de Marielle Boonen). De nombreuses questions demeurent cependant ouvertes, en grande partie en raison de l'absence de données reliant directement le catabolisme de l'HA à la régulation de la physiologie osseuse in vivo.

Dans ce travail, nous nous sommes fixés deux objectifs : le premier est de résoudre les questions relatives à la localisation subcellulaire d'HYAL1 en étudiant sa distribution intracellulaire et son trafic dans une lignée de macrophages de souris, appelée RAW264.7, ainsi que dans le foie de souris, l'organe qui possède l'expression la plus élevée de la protéine. Les cellules RAW264.7 ont été sélectionnées car l'expression endogène de l'enzyme y est aisément détectable. En outre, ces cellules peuvent être différenciées en ostéoclastes *in vitro* et présentent la plus forte accumulation de GAGs sur les biopsies articulaires des patients déficients pour HYAL1.

Le second objectif est d'étudier le rôle potentiel de l'enzyme HYAL1 dans les ostéoclastes et, de façon plus générale, dans le remodelage osseux. Cela inclut de caractériser l'expression, le trafic intracellulaire et l'activité enzymatique d'HYAL1 dans des ostéoclastes différenciés à partir de macrophages RAW264.7 ou de monocytes isolés à partir de la moelle osseuse de souris. Cette partie du projet consiste également à analyser le phénotype osseux d'un modèle de souris dans lequel le gène *Hyal1* a été invalidé et à investiguer le fonctionnement d'ostéoclastes différenciés *in vitro* à partir de monocytes de moelle osseuse des souris *Hyal1 -/-*.

RESULTATS

1. Etude du trafic intracellulaire d'HYAL1 dans les macrophages murins

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, une incertitude pesait sur la localisation intracellulaire d'HYAL1 lorsque nous avons débuté nos recherches. D'un côté, plusieurs indices suggéraient une localisation lysosomale : un optimum d'activité à pH acide et, dans les cellules déficientes en HYAL1, la détection d'une accumulation d'HA dans des vacuoles intracellulaires dont la morphologie est compatible avec celle des lysosomes. Toutefois, une étude réalisée par notre laboratoire en 2010 montrait une disparition rapide de l'activité d'HYAL1 endocytée, juste avant que la protéine n'atteigne le lysosome. De plus, HYAL1 était absente de la liste des protéines porteuses de signaux Man-6-P, qui comprend la majorité des hydrolases acides lysosomales.

Par conséquent, nous avons décidé d'étudier la question de la localisation subcellulaire d'HYAL1 et, plus généralement, du trafic intracellulaire de l'enzyme. Nous avons choisi de débuter cette étude en utilisant comme modèle la lignée cellulaire RAW264.7 de macrophages murins. Ces cellules expriment HYAL1 de façon endogène à un niveau suffisamment élevé pour que l'abondance et l'activité enzymatique de cette protéine puissent être analysées respectivement par *western blotting* et par zymographies. Nous avons aussi sélectionné des cellules de type macrophage car il a été rapporté que ces cellules présentent la plus forte accumulation d'HA dans les biopsies articulaires des patients déficients pour HYAL1.

Dans le but d'analyser la localisation subcellulaire d'HYAL1 dans les cellules RAW264.7, nous avons utilisé une combinaison de méthodes de fractionnements subcellulaires. Nous avons ensuite comparé le profil de distribution de notre protéine d'intérêt aux profils de distribution d'enzymes marqueurs des différents compartiments intracellulaires. Afin d'améliorer la distinction des lysosomes des autres organites, nous avons aussi procédé à l'induction d'une surcharge intralysosomale de saccharose, ce qui a pour effet de provoquer un glissement spécifique de la distribution des lysosomes dans un gradient de densité de Percoll[™] autoformé. Si le déplacement visualisé au niveau des profils de distribution des enzymes lysosomales est aussi observé pour la protéine d'intérêt, cela constitue un argument fort en faveur de sa localisation lysosomale. Pour détecter le niveau protéique et l'activité d'HYAL1 dans les diverses fractions collectées, nous avons utilisé les techniques de western blotting et de zymographies, celles-ci étant réalisées soit en conditions natives soit en conditions dénaturantes suivies d'une étape de renaturation des protéines. Nos résultats ont mis en évidence qu'HYAL1 existe sous deux formes dans les cellules RAW264.7 : une forme précurseur et une forme mature obtenue par clivage protéolytique. Ces deux formes sont porteuses d'une activité de dégradation de l'HA. La forme précurseur d'HYAL1 est localisée dans les compartiments prélysosomaux tandis que la forme mature s'accumule dans les lysosomes. Cependant, seule la zymographie en condition native permet de détecter l'activité de la forme mature d'HYAL1, alors que l'activité de la forme précurseur peut être détectée par les deux techniques de zymographie utilisées. Ceci explique probablement pourquoi l'activité d'HYAL1 n'était que peu présente dans les lysosomes, dans l'étude publiée par notre équipe en 2010. En effet dans ce travail, l'activité de l'enzyme avait été analysée par des zymographies comprenant une étape de dénaturation - renaturation [Gasingirwa et al., 2010].

Pour étudier le trafic intracellulaire d'HYAL1, nous avons suivi la maturation protéolytique d'une forme recombinante de l'HYAL1 humaine après son endocytose par les cellules. Ces expériences ont révélé que la forme mature est rapidement produite après l'endocytose, indiquant que le clivage protéolytique débute vraisemblablement dans les endosomes précoces. Par ailleurs, grâce à une analyse du pourcentage de liaison d'HYAL1 à un support chromatographique, exposant un fragment soluble du récepteur au Man-6-P, nous avons démontré que le transport d'HYAL1 vers les lysosomes est majoritairement indépendant du Man-6-P dans les cellules RAW264.7. Remarquant que le précurseur d'HYAL1 est porteur de chaînes oligosaccharidiques, dont certaines sont de type hautmannose, nous avons ensuite testé et validé l'hypothèse selon laquelle HYAL1 serait ciblée vers les lysosomes par un mécanisme de sécrétion constitutive suivie d'une ré-internalisation de la protéine. Ce processus d'endocytose implique le récepteur au mannose, qui est connu pour être capable d'internaliser d'autres hydrolases acides.

Ces résultats ont été acceptés pour publication le 04 février 2014 dans le journal « *Traffic* ». L'article est intitulé « *Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages* ». Les pages 69 à 84 contiennent une copie de cet article.

Traffic. 2014 May;15(5):500-15. doi: 10.1111/tra.12162. Epub 2014 Mar 11.

Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages.

Puissant E¹, Gilis F, Dogné S, Flamion B, Jadot M, Boonen M.

Author information

Abstract

The hyaluronidase Hyal-1 is an acid hydrolase that degrades hyaluronic acid (HA), a component of the extracellular matrix. It is often designated as a lysosomal protein. Yet few data are available on its intracellular localization and trafficking. We demonstrate here that in RAW264.7 murine macrophages, Hyal-1 is synthesized as a glycosylated precursor that is only weakly mannose 6-phosphorylated. Nevertheless, this precursor traffics to endosomes, via a mannose 6-phosphate-independent secretion/recapture mechanism that involves the mannose receptor. Once in endosomes, it is processed into a lower molecular mass form that is transported to lysosomes, where its activity could be detected using native gel zymography. Indeed, this activity co-distributed with lysosomal hydrolases in the densest fraction of a self-forming Percoll(TM) density gradient. Moreover, it shifted toward the lower density region, in parallel with those hydrolases, when a decrease of lysosomal density was induced by the endocytosis of sucrose. Interestingly, the activity of the processed form of Hyal-1 was largely underestimated when assayed by zymography after SDS-PAGE and subsequent renaturation of the proteins, by contrast to the full-length protein that could efficiently degrade HA in those conditions. These results suggest that noncovalent associations support the lysosomal activity of Hyal-1.

© 2014 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.

KEYWORDS: Hyal-1; lysosome; macrophages; mannose 6-phosphate; mannose receptor; maturation; secretion/recapture

PMID: 24502338 DOI: 10.1111/tra.12162

2. Etude de la localisation et de l'activité d'HYAL1 dans le foie murin

Dans le premier article présenté ci-dessus, nous avons montré que la forme mature d'HYAL1 s'accumule dans les lysosomes des macrophages murins. Il est cependant nécessaire d'utiliser une zymographie en condition native, sans SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) dans le gel, pour visualiser l'activité d'HYAL1 dans les fractions enrichies en lysosomes. Dans la technique de zymographie basée sur une séparation des protéines en présence de SDS, la forme mature d'HYAL1 semble incapable d'exercer son activité après migration et renaturation des protéines. Ceci pourrait expliquer le peu d'activité enzymatique retrouvée associée aux lysosomes lorsque la protéine est endocytée par les cellules du foie, suite à son injection intraveineuse chez la souris [Gasingirwa et al., 2010].

Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié le profil de distribution d'HYAL1 après fractionnement subcellulaire du foie de souris par centrifugation différentielle et ensuite par centrifugation isopycnique dans un gradient de saccharose. A l'instar de l'étude publiée par notre laboratoire en 2010, nous avons induit une diminution spécifique de la densité des lysosomes par un traitement préalable des souris avec du Triton WR1339 dans le but d'apporter une meilleure discrimination des lysosomes par rapport aux autres organites. Nous avons ensuite détecté HYAL1 dans les diverses fractions subcellulaires par les deux techniques de zymographie et comparé les profils de distribution obtenus avec ceux d'enzymes marqueurs. Ces résultats ont permis de démontrer que, comme montré dans les macrophages, la forme mature d'HYAL1 s'accumule dans les lysosomes du foie de souris. De plus, en utilisant des fractions subcellulaires provenant de souris déficientes pour HYAL1 comme contrôle, nous avons estimé qu'environ 80 % de l'activité hyaluronidasique totale détectée dans le foie de souris par la technique de Reissig est due à HYAL1. En outre, nous avons pu montrer que la part la plus importante de la population intracellulaire d'HYAL1 est constituée de sa forme mature qui réside dans les lysosomes.

L'ensemble de ces résultats est décrit dans l'article intitulé « *Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1* » publié le 22 mars 2014 dans le journal « *Biochemical and Biophysical Research Communications* ». Les pages 87 à 92 reprennent cette publication.

Biochem Biophys Res Commun, 2014 Apr 18;446(4):1155-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.070. Epub 2014 Mar 22.

Mouse liver lysosomes contain enzymatically active processed forms of Hyal-1.

<u>Boonen M¹, Puissant E¹, Gilis F¹, Flamion B², Jadot M³.</u>

Author information

Abstract

It has long been known that liver lysosomes contain an endoglycosidase activity able to degrade the high molecular mass glycosaminoglycan hyaluronic acid (HA). The identification and cloning of a hyaluronidase with an acidic pH optimum, Hyal-1, suggested it might be responsible for this activity. However, we previously reported that this hydrolase could only be detected in pre-lysosomal compartments of the mouse liver using a zymography technique that allows the detection of Hyal-1 activity after SDS-PAGE ("renatured protein zymography"). Present work reveals that the activity highlighted by this technique belongs to a precursor form of Hyal-1 and that the lysosomal HA endoglycosidase activity of the mouse liver is accounted for by a proteolytically processed form of Hyal-1 that can only be detected using "native protein zymography". Indeed, the distribution of this form follows the distribution of β -galactosidase, a well-established lysosomal marker, after fractionation of the mouse liver in a linear sucrose density gradient. In addition, both activities shift toward the lower density region of the gradient when a specific decrease of the lysosomal density is induced by Triton WR-1339 injection. The fact that only native protein Zymography but not renatured protein zymography is able to detect Hyal-1 activity in lysosomes points to a non-covalent association of Hyal-1 proteolytic fragments or the existence of closely linked partners supporting Hyal-1 enzymatic activity. The knockdown of Hyal-1 results in an 80% decrease of total acid hyaluronidase activity in the mouse liver, confirming that Hyal-1 is a key actor of HA catabolism in this organ.

Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEYWORDS: Fractionation; Hyal-1; Liver; Lysosome; Triton WR-1339; Zymography

PMID: 24667601 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.070

3. Etude de l'expression et du trafic intracellulaire d'HYAL1 dans les ostéoclastes

La présence d'HA dans la matrice osseuse ainsi que les effets rapportés de l'HA et de ses fragments sur la prolifération, la différenciation et l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes cultivés in vitro, nous ont amenés à nous demander si HYAL1 pouvait jouer un rôle dans le remodelage osseux. Lorsque nous nous sommes posé cette question, très peu d'informations avaient été publiées sur l'expression et le rôle des diverses hyaluronidases dans les cellules osseuses. Une activité de dégradation de l'HA avait été mise en évidence dans le tissu osseux dans les années 60 [Vaes and Jacques, 1965] mais, à l'époque, la ou les hyaluronidases responsables de cette activité n'avaient pas été identifiées. Une étude plus récente a montré qu'HYAL1 était absente des ostéoblastes [Adams et al., 2006]. Les ostéoclastes, quant à eux, pourraient potentiellement contenir de grandes quantités de l'enzyme HYAL1. En effet, une expression élevée de l'ARNm d'Hyal1 a été détectée dans les ostéoclastes de souris lors d'une analyse comparée, de l'expression relative de près de 42 000 gènes entre des ostéoclastes et les macrophages précurseurs de ces cellules (données non publiées obtenues lors du travail mené par van Meel, Boonen et al. en 2011, communication personnelle de Marielle Boonen). Cette observation a soulevé plusieurs questions. L'enzyme pourrait-elle être ciblée vers les lysosomes dans les ostéoclastes tout comme nous l'avons observé dans les macrophages ? Est-elle impliquée dans la dégradation de l'HA osseux extracellulaire ? HYAL1 régule-t-elle le remodelage osseux ? Sachant que les ostéoclastes contiennent de nombreux lysosomes de sécrétion enrichis spécifiquement en enzymes de dégradation de la matrice osseuse, telles que la cathepsine K, la détection de larges quantités d'HYAL1 dans ces organites serait un premier indice en faveur de l'implication de cette hydrolase dans le catabolisme de l'HA osseux. En effet, lors de la polarisation des ostéoclastes sur l'os, la résorption de la matrice osseuse prend place suite à l'exocytose du contenu des lysosomes de sécrétion, survenant au niveau de la lacune extracellulaire acidifiée qui se forme entre l'ostéoclaste et l'os. Précisons également que les effets rapportés dans la littérature de molécules d'HA de masses moléculaires différentes sur le comportement d'ostéoblastes et d'ostéoclastes cultivés in vitro sont parfois opposés (voir point 3.7. de l'introduction). Ces données de la littérature soulèvent néanmoins la possibilité qu'une fragmentation de l'HA par HYAL1 dans la lacune de résorption puisse moduler l'activité de ces cellules in vivo et, éventuellement, le remodelage osseux en général.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons travaillé sur deux axes de recherche. Dans le premier, nous avons étudié le trafic intracellulaire d'HYAL1 dans des ostéoclastes différenciés *in vitro* à partir de monocytes de moelle osseuse de souris ou à partir d'une lignée de macrophages RAW264.7. Ensuite (voir point 4), nous avons suivi le processus de différenciation et mesuré l'activité de résorption osseuse d'ostéoclastes déficients pour HYAL1 *in vitro*. En parallèle, nous avons caractérisé le phénotype osseux de souris *Hyal1 -/-*.

L'analyse des ostéoclastes différenciés en culture nous a permis de mettre en évidence une forte augmentation de l'expression génique et protéique d'HYAL1 au cours de l'ostéoclastogenèse. Il est intéressant de noter ici que seules deux autres enzymes lysosomales, sur environ soixante, sont hyperexprimées de la sorte dans les ostéoclastes, à savoir la cathepsine K et TRAP qui jouent toutes deux un rôle important dans le remodelage osseux.

Comme dans les macrophages, la forme mature d'HYAL1 est présente dans les lysosomes des ostéoclastes, probablement dans les lysosomes de sécrétion, tandis que la forme précurseur est détectée dans les compartiments biosynthétiques et dans le début de la voie de l'endocytose. L'enzyme est également transportée vers les lysosomes par une voie de transport majoritairement indépendante du Man-6-P. Cependant, la voie de sécrétion - ré-internalisation par le récepteur au mannose que nous avons identifiée dans les macrophages semble moins active dans les ostéoclastes. En effet, nous avons remarqué que le taux d'endocytose d'HYAL1 est ralenti dans les ostéoclastes qui, par ailleurs, présentent une diminution importante de l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur au mannose par rapport aux macrophages. Contrairement à ces derniers, les ostéoclastes sécrètent HYAL1 dans le milieu extracellulaire à travers deux voies, par la sécrétion constitutive et par l'exocytose du contenu des lysosomes, deux mécanismes qui libèrent respectivement des formes précurseurs et matures de l'enzyme dans le milieu extracellulaire. Prises ensemble, ces données suggèrent que les ostéoclastes sécrètent de grandes quantités d'HYAL1, qui pourraient se concentrer au niveau de la lacune de résorption extracellulaire. Ce processus fournirait à HYAL1 un environnement propice à la dégradation de l'HA osseux.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication parue sous le titre « *Monocytes/macrophages upregulate the hyaluronidase HYAL1 and adapt its subcellular trafficking to promote extracellular residency upon differentiation into osteoclasts* » dans le journal « *PLoS One* » le 18 octobre 2016. Cet article est inséré aux pages 95 à 118.

PLoS One. 2016 Oct 18;11(10):e0165004. doi: 10.1371/journal.pone.0165004. eCollection 2016.

Monocytes/Macrophages Upregulate the Hyaluronidase HYAL1 and Adapt Its Subcellular Trafficking to Promote Extracellular Residency upon Differentiation into Osteoclasts.

Puissant E¹, Boonen M¹.

Author information

Abstract

Osteoclasts are giant bone-resorbing cells originating from monocytes/macrophages. During their differentiation, they overexpress two lysosomal enzymes, cathepsin K and TRAP, which are secreted into the resorption lacuna, an acidified sealed area in contact with bone matrix where bone degradation takes place. Here we report that the acid hydrolase HYAL1, a hyaluronidase able to degrade the glycosaminoglycans hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulfate, is also upregulated upon osteoclastogenesis. The mRNA expression and protein level of HYAL1 are markedly increased in osteoclasts differentiated from RAW264.7 mouse macrophages or primary mouse bone marrow monocytes compared to these precursor cells. As a result, the HYAL1-mediated HA hydrolysis ability of osteoclasts is strongly enhanced. Using subcellular fractionation, we demonstrate that HYAL1 proteins are sorted to the osteoclast lysosomes even though, in contrast to cathepsin K and TRAP, HYAL1 is poorly mannose 6-phosphorylated. We reported previously that macrophages secrete HYAL1 proforms by constitutive secretion, and that these are recaptured by the cell surface mannose receptor, processed in endosomes and sorted to lysosomes. Present work highlights that osteoclasts secrete HYAL1 in two ways, through lysosomal exocytosis and constitutive secretion, and that these cells promote the extracellular residency of HYAL1 through downregulation of the mannose receptor. Interestingly, the expression of the other main hyaluronidase, HYAL2, and of lysosomal exoglycosidases involved in HA degradation, does not increase similarly to HYAL1 upon osteoclastogenesis. Taken together, these findings point out the predominant involvement of HYAL1 in bone HA metabolism and perhaps bone remodeling via the resorption lacuna.

PMID: 27755597 PMCID: PMC5068775 DOI: 10.1371/journal.pone.0165004

4. Analyse de l'impact de l'inactivation du gène *Hyal1* sur la différenciation et l'activité des ostéoclastes murins, et investigation du phénotype osseux de souris *Hyal1 -/-*

Dans cette dernière partie de notre travail expérimental, nous avons débuté l'analyse du rôle d'HYAL1 dans les ostéoclastes et plus largement dans le remodelage osseux. Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur l'impact de la perte d'HYAL1 sur le fonctionnement des ostéoclastes. En différenciant des ostéoclastes sauvages ou déficients pour HYAL1 *in vitro* à partir de monocytes isolés de souris contrôles ou *Hyal1 -/-*, nous avons établi que l'absence d'HYAL1 n'impacte pas l'ostéoclastogenèse. En revanche, en mesurant l'activité d'ostéoclastes différenciés sur de fines coupes d'os bovin, nous avons détecté une augmentation significative de la surface résorbée par les ostéoclastes *Hyal1 -/-*.

L'étude du rôle d'HYAL1 dans le remodelage osseux a été poursuivie par une analyse du phénotype osseux des souris déficientes pour l'enzyme. Nos résultats montrent qu'à l'âge d'un an, ces dernières présentent une diminution significative de leur densité minérale osseuse (mesurée par *peripheral Quantitative Computed Tomography*), associée à une diminution de la longueur de leurs fémurs. Par ailleurs, des analyses histologiques ont révélé une augmentation du nombre d'ostéoclastes, mais pas des ostéoblastes, au niveau de l'os épiphysaire et de la plaque de croissance en absence d'HYAL1. Couplées à la détection d'une accumulation d'HA dans les os des souris *Hyal1 -/-*, et aux données collectées dans nos analyses réalisées *in vitro*, ces observations indiquent que l'enzyme HYAL1 est requise pour un remodelage osseux normal chez la souris. En son absence, un phénotype d'ostéoclastes. Nous avons également détecté une diminution du niveau plasmatique d'un marqueur de formation osseuse par les ostéoblastes appelé PINP (*Procollagen type I N-terminal Propeptide*) chez les souris âgées déficientes pour HYAL1. Ceci suggère qu'une diminution progressive de l'activité des ostéoblastes pourrait également contribuer au phénotype de perte osseuse observé chez ces souris.

Un manuscrit reprenant les résultats de cette dernière partie de notre recherche a été préparé en vue d'une publication. Il est inséré ci-dessous.