



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.

DISCUSSION



1. Le trafic intracellulaire d'HYAL1

1.1. La localisation subcellulaire d'HYAL1

La première partie de ce travail de recherche avait pour but de répondre à la question non résolue de la localisation subcellulaire de l'enzyme HYAL1. En effet, bien que plusieurs indices pointaient vers une localisation lysosomale pour cette protéine, tels que son optimum d'activité à pH acide [Frost et al., 1997] et l'accumulation d'HA dans des structures ressemblant à des lysosomes dans les macrophages de patients déficients pour HYAL1 [Natowicz et al., 1996a; Imundo et al., 2011], d'autres observations remettaient en question cette hypothèse. Parmi celles-ci, une étude de la localisation subcellulaire de l'enzyme dans le foie de souris qui avait révélé la présence d'HYAL1 dans les endosomes mais pas dans les lysosomes [Gasingirwa et al., 2010]. De plus, contrairement à la très grande majorité des hydrolases acides, il avait été suggéré qu'HYAL1 n'est pas porteuse de signaux d'adressage vers les lysosomes de type mannose 6-phosphate (Man-6-P) [Natowicz and Wang, 1996b; Fiszer-Szafarz et al., 2005; Sleat et al., 2005; Sleat et al., 2006].

Afin d'élucider les mécanismes en charge du catabolisme de l'HA et ensuite déterminer leur implication dans la régulation des fonctions physiologiques de l'HA, souvent dépendantes de sa taille, nous avons jugé important d'investiguer la localisation subcellulaire d'HYAL1. Dans cette optique, nous avons analysé le profil de distribution d'HYAL1 entre les différentes fractions subcellulaires qui sont obtenues lorsqu'un homogénat de macrophages ou de foie de souris est soumis à un protocole de fractionnement qui combine la centrifugation différentielle et la centrifugation dans un gradient de densité. Nous avons aussi suivi l'endocytose d'une forme recombinante d'HYAL1 par les macrophages. Ces analyses ont révélé que, dans ces cellules et tissus, HYAL1 est présente sous deux formes qui possèdent des localisations différentes. La forme précurseur est vraisemblablement localisée dans les compartiments biosynthétiques ainsi que dans le début de la voie endocytaire, tandis que la forme mature issue d'un clivage protéolytique s'accumule dans les lysosomes. Cette conclusion a été renforcée par la démonstration que le profil de distribution de la forme mature d'HYAL1 dans un gradient de densité est déplacé vers une zone de plus faible densité, tout comme les hydrolases acides lysosomales, lorsqu'une surcharge lysosomale est provoquée. Cette dernière a été induite par une accumulation de saccharose endocyté dans les macrophages ou par une accumulation de lipides causée par une injection de Triton WR1339 chez les souris. Des résultats semblables ont été obtenus dans les ostéoclastes, indiquant que la maturation et la localisation d'HYAL1 sont similaires dans les macrophages et ostéoclastes ainsi que dans le foie, ou du moins dans les cellules non-parenchymateuses de ce tissu où l'enzyme est majoritairement retrouvée. En 1965, Aronson et Davidson avaient déjà montré que les lysosomes du foie de rat étaient dotés d'une activité hyaluronidasiq[ue] [Aronson and Davidson, 1965]. Détectée grâce à un test de Reissig peu spécifique, l'enzyme responsable de cette activité d'hydrolyse de l'HA n'avait cependant pas pu être identifiée. Aujourd'hui, sur base de nos analyses par fractionnement subcellulaire, nous pouvons affirmer

qu'environ 80 % de l'activité hyaluronidasique détectée dans les fractions subcellulaires de foie enrichies en lysosomes par un test de Reissig peut être attribuée à HYAL1. Par ailleurs, les résultats obtenus dans le cadre de notre étude confortent le modèle selon lequel les vacuoles dans lesquelles le matériel non dégradé, probablement de l'HA, s'accumule chez les patients déficients pour HYAL1 correspondent à des lysosomes [Natowicz et al., 1996a; Imundo et al., 2011]. Récemment, la présence d'HYAL1 a aussi été renseignée dans les lysosomes de cellules cancéreuses prostatiques par l'équipe de Mélanie Simpson qui a utilisé des méthodes de microscopie à fluorescence [McAtee et al., 2015].

Pourquoi HYAL1 était-elle alors uniquement détectée dans les endosomes dans l'étude antérieure de Gasingirwa et al. [Gasingirwa et al., 2010] ? Il se trouve que, dans ce travail, l'activité d'HYAL1 avait été détectée par des zymographies caractérisées par la dénaturation d'HYAL1 lors de sa migration dans un gel contenant du SDS, suivie d'une étape de renaturation de la protéine. Hors, nous avons remarqué lors de nos études avec des cellules et tissus d'origine murine que seule la forme précurseur d'HYAL1 peut être révélée par cette technique, l'activité de la forme mature n'apparaissant pas après dénaturation dans le gel. En utilisant une zymographie réalisée en condition native, c'est-à-dire en absence de SDS dans le gel, il est néanmoins possible de mettre en évidence l'activité de la forme mature d'HYAL1, ce qui a permis de démontrer de façon non équivoque sa présence dans les lysosomes.

L'absence de détection de l'activité de la forme mature d'HYAL1 suite à un cycle de dénaturation - renaturation au cours d'une zymographie pourrait avoir plusieurs explications. Sur base de nos résultats et de la littérature, trois hypothèses ont été émises.

- Premièrement, la forme mature d'HYAL1 pourrait présenter des difficultés à reprendre sa conformation initiale lors de l'étape de renaturation en raison de la réduction dans les lysosomes des ponts disulfures que cette protéine contient. En effet, il a été rapporté que l'activité du précurseur d'HYAL1, telle que détectée dans un gel de zymographie avec SDS, disparaît lorsque l'échantillon est préparé en présence de dithiothréitol (DTT), un agent qui réduit les ponts disulfures [Zhang et al., 2009]. En revanche, le dithiothréitol n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité d'HYAL1 lorsque celle-ci est analysée par zymographie en condition native, sans SDS. Ces résultats suggèrent que les ponts disulfures ne sont pas nécessaires à l'activité d'HYAL1 lorsque celle-ci a acquis sa conformation finale. Les ponts disulfures seraient néanmoins requis pour le repliement correct de la protéine dénaturée dans le gel contenant du SDS. Couplés à la découverte d'une thiol-réductase appelée GILT (*Gamma-Interferon-inducible Lysosomal Thiol reductase*) dans les lysosomes [Arunachalam et al., 2000], ces éléments suggèrent que la forme mature lysosomale d'HYAL1 pourrait avoir perdu ses ponts disulfures. Ceci expliquerait l'incapacité de la forme mature à se renaturer et à dégrader l'HA lors de la zymographie avec SDS. Au contraire, la forme précurseur présente dans les compartiments biosynthétiques et endosomes ne serait pas encore entrée en contact avec GILT et pourrait, par conséquent, se renaturer.

- La deuxième hypothèse qui pourrait expliquer l'absence d'activité de la forme mature d'HYAL1 dans la zymographie avec SDS est liée à la découverte que cette forme résulte d'un clivage endo-protéolytique. Ce dernier générerait deux fragments peptidiques dont l'association serait nécessaire à l'activité d'HYAL1 puisque sa partie C-terminale est indispensable à la dégradation de l'HA [Csóka et al., 1997; Zhang et al., 2009]. Au cours de l'électrophorèse en présence de SDS, si les deux fragments sont initialement associés par des interactions non covalentes, ils pourraient être séparés l'un de l'autre, expliquant ainsi la perte d'activité de la forme mature après dénaturation - renaturation. L'activité de la forme mature serait détectable en condition native puisque les deux fragments resteraient assemblés au cours de l'électrophorèse.
- Troisièmement, pour exercer son activité, la forme mature d'HYAL1 pourrait devenir dépendante de la présence d'un ou plusieurs partenaire(s) dont elle serait dissociée pendant la migration électrophorétique en présence de SDS. Selon cette hypothèse, les deux formes d'HYAL1 présenteraient une activité en absence de SDS puisque les interactions non covalentes sont préservées en condition native.

Nous concluons de nos analyses que la zymographie native est l'outil à privilégier pour distinguer l'activité du précurseur d'HYAL1 murin et celle de sa forme mature, sans sous-estimer l'activité de cette dernière. Il est à noter cependant que les formes précurseur et mature de l'HYAL1 humaine ne se séparent pas aussi bien dans un gel natif que les formes murines. Il est probable que cela s'explique par les différences de composition en acides aminés (73 % d'identité entre les deux espèces) et/ou par des associations avec des partenaires différents. Nos résultats suggèrent également que le fragment éliminé lors de la maturation protéolytique d'HYAL1 murine est de plus petite taille en comparaison avec la protéine humaine. En effet, une différence de 12 kDa a été identifiée entre les formes précurseurs et matures d'HYAL1 humaine alors que le clivage de la protéine murine élimine un fragment d'environ 7 - 8 kDa (Fig 12) [Csóka et al., 1997]. Dans les deux cas, nous avons observé que le clivage est inhibé par la leupeptine, un inhibiteur de protéases à sérine, thréonine et cystéine. Il reste cependant à déterminer quelle(s) enzyme(s) de ces familles est/sont responsable(s) du clivage, et si la/les même(s) enzyme(s) est/sont en charge du clivage des formes humaine et murine. Précisons aussi que, contrairement à HYAL1 murine, la forme humaine de l'enzyme présente une activité détectable lors des zymographies qui incluent une étape de dénaturation - renaturation des protéines. Nos résultats suggèrent cependant que cette activité est sous-estimée, probablement pour des raisons similaires à celles développées ci-dessus. Cette différence dans la détection de l'activité des formes humaine et murine d'HYAL1 pourrait être due aux variations dans leur composition en acides aminés.

1.2. Transport de l'enzyme HYAL1 vers les lysosomes

Malgré la démonstration de la localisation lysosomale d'HYAL1, cette dernière apparaît comme une hydrolase acide lysosomale atypique, notamment en raison de son transport intracellulaire. En effet, contrairement à la majorité des hydrolases lysosomales, son ciblage n'est pas basé sur la reconnaissance du Man-6-P comme signal d'adressage vers le lysosome. L'existence d'un mode de transport alternatif a été suggérée par l'absence d'augmentation de la concentration plasmatique d'HYAL1 chez les patients atteints de mucopolysaccharidose de type II ou III [Fischer-Szafarz et al., 2005; Natowicz and Wang, 1996b]. Ces derniers souffrent d'une déficience en NAcGln-1-phosphotransférase, l'enzyme responsable de la première étape de l'ajout du Man-6-P sur les hydrolases acides. En conséquence, ces patients présentent des concentrations plasmatiques anormalement élevées d'hydrolases acides puisque leurs précurseurs n'acquièrent pas le motif Man-6-P qui doit permettre leur adressage vers le lysosome. Elles sont alors, par défaut, sécrétées dans le milieu extracellulaire. D'autre part, HYAL1 n'a jamais pu être identifiée dans le protéome des hydrolases acides portant le signal Man-6-P [Sleat et al., 2005; Sleat et al., 2006]. Nos travaux ont démontré qu'HYAL1 n'utilisait pas, ou n'utilisait que très peu, la voie canonique d'adressage vers les lysosomes dépendante du signal Man-6-P. En effet, nous n'avons pas détecté d'accumulation d'HYAL1 dans la circulation sanguine des souris déficientes pour la NAcGln-1-phosphotransférase, une observation qui corrobore celles, rapportées plus haut, réalisées chez les patients atteints de mucopolysaccharidose de type II ou III. Nos conclusions ont été renforcées, de manière plus directe, par la démonstration que nous avons faite de l'absence de signal Man-6-P sur les chaînes oligosaccharidiques d'HYAL1, par une technique de chromatographie d'affinité basée sur l'utilisation d'une matrice porteuse du fragment soluble du récepteur du Man-6-P.

HYAL1 n'utilisant pas la voie canonique du Man-6-P pour être dirigée vers les lysosomes, quel est le mécanisme impliqué dans son transport vers cet organite ? Pour répondre à cette question, nous avons étudié le trafic intracellulaire d'HYAL1 dans les macrophages. Nos résultats nous ont permis de décrire la voie de transport d'HYAL1 (Fig 23). Cette voie implique sa sécrétion constitutive dans le milieu extracellulaire sous une forme précurseur non clivée, comme suggéré par les traitements avec des endoglycosidases que nous avons réalisés. Le précurseur exposant des chaînes oligosaccharidiques de type haut-mannose, HYAL1 interagit ensuite avec le récepteur au mannose (MRC1) présent en surface cellulaire avant d'être endocyté et transporté jusqu'aux lysosomes. En effet, l'ajout de mannan, un ligand du récepteur au mannose, dans le milieu de culture des macrophages inhibe l'endocytose d'HYAL1 par ces cellules. Le récepteur au mannose est un récepteur exprimé par les macrophages, les cellules dendritiques, endothéliales et lymphatiques mais également par des cellules spécialisées telles que les cellules mésangiales ou les cellules musculaires lisses de la trachée. Il a la particularité de posséder un domaine de liaison aux hydrates de carbone sulfatés ainsi que plusieurs sites d'interaction avec des chaînes oligosaccharidiques se terminant par des unités mannose, fucose ou NAcGln [Martinez-Pomares, 2012]. L'implication de ce récepteur au mannose dans l'internalisation d'hydrolases acides circulantes par les cellules sinusoidales du foie a été rapportée par plusieurs études [Hubbard et al., 1979; Lennartz et al., 1987; Taylor et al., 1990]. Dans des souris déficientes pour ce

récepteur, l'activité enzymatique de nombreuses hydrolases acides lysosomales dans les cellules sinusoidales du foie est d'ailleurs fortement amoindrie. Ces observations indiquent clairement que ces cellules dépendent largement du récepteur au mannose pour acquérir les enzymes nécessaires à la dégradation lysosomale des macromolécules [Elvevold, Simon-Santamaria et al., 2008]. Puisque nos résultats suggèrent qu'un mécanisme similaire se met en place pour HYAL1, il serait intéressant d'étudier le trafic intracellulaire de l'hyaluronidase dans des souris déficientes pour ce récepteur. Dans ce modèle, nous pourrions également analyser la clairance de l'HA dans le foie, le principal organe impliqué dans la dégradation de l'HA circulant [Jadin et al., 2012].

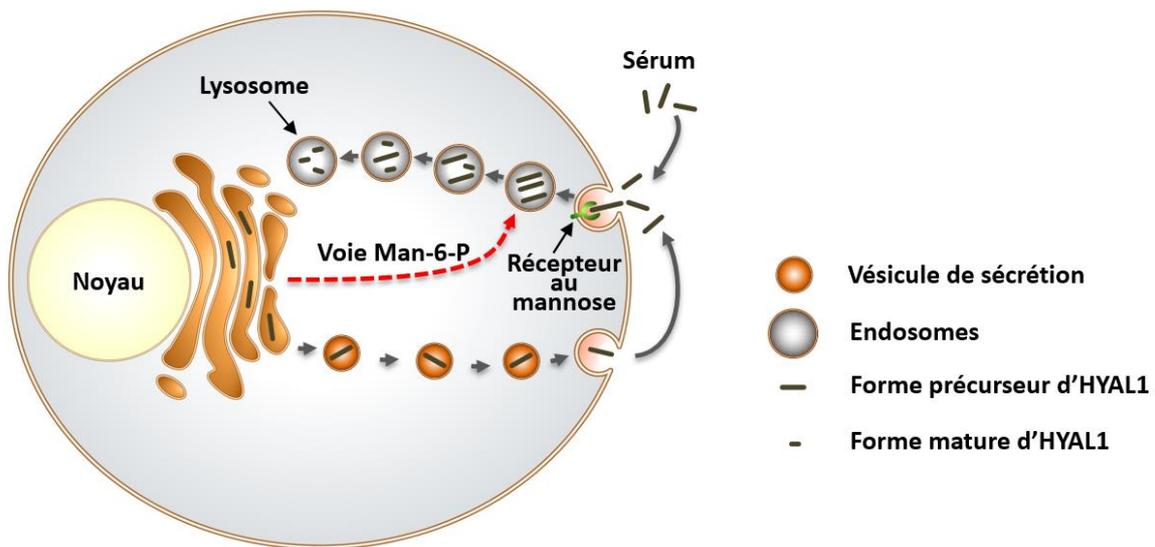


Figure 23: Illustration schématique du trafic d'HYAL1 dans les macrophages murins. L'ensemble de nos résultats suggèrent qu'HYAL1 est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui est glycosylé dans le réticulum endoplasmique. La protéine est ensuite envoyée vers l'appareil de Golgi où une partie des chaînes oligosaccharidiques *N*-liées portées par HYAL1 deviennent de type complexe. L'enzyme est ensuite sécrétée constitutivement dans le milieu extracellulaire avant d'être ré-internalisée par le récepteur au mannose. HYAL1 endocytée pourrait également provenir du sérum qui contient de grandes quantités de la protéine. Précisons qu'une fraction minoritaire d'HYAL1 semble porteuse de Man-6-P, indiquant que quelques molécules d'HYAL1 pourraient également être acheminées vers les endosomes par un transport dépendant du Man-6-P. Au cours de son transport endosomal, HYAL1 subit un clivage protéolytique qui donne naissance à une forme mature qui s'accumule dans les lysosomes. Il est à noter que les deux formes d'HYAL1, précurseur et mature, présentent une activité de dégradation de l'HA.

La voie de transport d'HYAL1 que nous avons décrite ne peut cependant pas expliquer l'adressage de la protéine dans tous les types de cellules. En effet, nous avons notamment observé que l'expression du récepteur au mannose est fortement diminuée au cours de la différenciation de macrophages en ostéoclastes. A l'instar des macrophages, la forme mature d'HYAL1 a pourtant été localisée dans les lysosomes des ostéoclastes. La sécrétion suivie de la ré-internalisation par le récepteur au mannose ne semble donc pas jouer un rôle majeur dans le ciblage d'HYAL1 vers les lysosomes dans les

ostéoclastes. Par ailleurs, le taux global d'endocytose d'HYAL1 par les ostéoclastes est aussi diminué par rapport aux cellules précurseurs ce qui semble favoriser l'accumulation extracellulaire d'HYAL1. Nous proposons par conséquent que, dans les ostéoclastes, HYAL1 pourrait être acheminée par une voie de transport entièrement intracellulaire, qui l'amènerait directement vers les endosomes et les lysosomes, depuis l'appareil de Golgi. Sachant qu'HYAL1 n'est pas un ligand des récepteurs du Man-6-P, il est possible que cette enzyme soit prise en charge par un récepteur de transport alternatif, comme cela a été montré pour plusieurs autres enzymes lysosomales. La protéine LIMP2 est un exemple de récepteur alternatif capable de transporter vers les lysosomes la β -glucocérébrosidase qui, comme HYAL1, est une hydrolase acide très peu porteuse de Man-6-P [Reczek et al., 2007]. Une autre possibilité serait que le transport d'HYAL1 vers les lysosomes soit « passif » et dépende de son interaction avec une autre protéine soluble lysosomale (« piggy-backing »). Le signal d'adressage lysosomal porté par l'autre protéine serait suffisant pour qu'elle-même et son partenaire HYAL1 soient transportés conjointement vers les lysosomes. Ce mécanisme de transport a été mis en évidence dans l'acheminement de protéines vers les granules de sécrétion, des organites dont les formes intermédiaires immatures sont acides et considérées comme proches des lysosomes de sécrétion [Blott and Griffiths, 2002]. Il a par exemple été rapporté que la chromogranine A serait capable d'emmener avec elle la pro-hormone pro-opiomélanocortine vers ces granules [Montero-Hadjadje, Elias et al., 2009; Koshimizu et al., 2010]. Des travaux supplémentaires seraient nécessaires pour tester l'hypothèse d'un trafic intracellulaire d'HYAL1 par liaison à un récepteur alternatif aux récepteurs du Man-6-P, ou par association à une autre protéine soluble lysosomale. Une recherche de partenaires d'interaction d'HYAL1 pourrait constituer un point de départ intéressant.

1.3. Localisation non lysosomale d'HYAL1

Nos travaux les plus récents ont montré, de manière intéressante, qu'HYAL1 n'est pas toujours localisée dans les lysosomes. En effet, HYAL1 n'a pas pu être détectée dans les lysosomes des cellules cancéreuses mammaires HCC1143 et BT-549. Précisons qu'au contraire, ces travaux ont révélé que l'enzyme est capable de rejoindre les lysosomes d'autres lignées cancéreuses mammaires à savoir les cellules T47D, MCF-7 et ZR-75-1. Des résultats préliminaires suggèrent que l'absence d'HYAL1 dans les lysosomes ne s'expliquerait pas par une sécrétion massive de l'enzyme puisque les quantités détectées d'HYAL1 dans les milieux conditionnés de ces cellules restent limitées (communication personnelle de Marielle Boonen). L'HYAL1 présente dans les lignées HCC1143 et BT-549 resterait-elle dans les compartiments biosynthétiques ? C'est une possibilité qui mériterait d'être investiguée dans le futur.

Notons que chez l'homme, HYAL1 est une enzyme très abondante dans le sérum, et qu'elle y réside sous sa forme précurseur. Ceci suggère, en accord avec nos observations dans les macrophages et ostéoclastes, que certaines cellules sont capables de sécréter HYAL1 vers le milieu extracellulaire par le biais de la voie de la sécrétion constitutive. Cette voie correspond à une sécrétion directement à

partir de l'appareil de Golgi, sans passage préalable par les endosomes ou les lysosomes où il est probable que la forme précurseur eût été transformée en forme mature. Par le passé, une sécrétion d'HYAL1, probablement par la voie constitutive, a également été mise en évidence à partir de fibroblastes humains [Stair-Nawy et al., 1999]. Une hypothèse intéressante que nous pouvons émettre est la suivante : une grande partie des molécules d'HYAL1 sériques pourraient provenir d'une sécrétion de l'enzyme par le foie, en particulier à partir des hépatocytes. En effet, une analyse de dix échantillons de foies humains révèle qu'entre 50 et 85 % de l'ARNm total d'HYAL1 détecté dans le foie est exprimé par les hépatocytes (données obtenues à partir du « Human Protein Atlas »). La signification biologique de l'abondance d'HYAL1 dans le sérum est difficile à cerner si nous considérons que cet environnement présente un pH neutre et que l'enzyme y est donc probablement très peu active. Le sérum servirait-il de réservoir d'HYAL1 pour les cellules capables de l'endocyter ? Comme nous l'avons mentionné précédemment, certaines hydrolases acides présentes dans le sérum sont endocytées par les cellules endothéliales du foie grâce au récepteur au mannose, et transportées jusqu'aux lysosomes. Les concentrations d'arylsulfatase et de cathepsine D sont par exemple respectivement diminuées de 20 et 30 fois dans les cellules endothéliales hépatiques de souris déficientes pour le récepteur au mannose [Elvevold, Simon-Santamaria et al., 2008]. En accord avec notre démonstration de la présence d'HYAL1 dans les lysosomes du foie, nous pensons que la forme circulante d'HYAL1 pourrait être transportée jusqu'aux lysosomes, en particulier dans les cellules endothéliales du foie, grâce au récepteur au mannose [De Saegui and Pigman, 1967]. L'HYAL1 résidant dans les lysosomes des cellules endothéliales hépatiques pourrait, par conséquent, être issue de l'endocytose du stock de l'hyaluronidase présent dans le sérum mais également d'une sécrétion par les cellules environnantes étant donné le niveau d'expression élevé d'HYAL1 dans le foie (Fig 24) [Csóka et al., 1999].

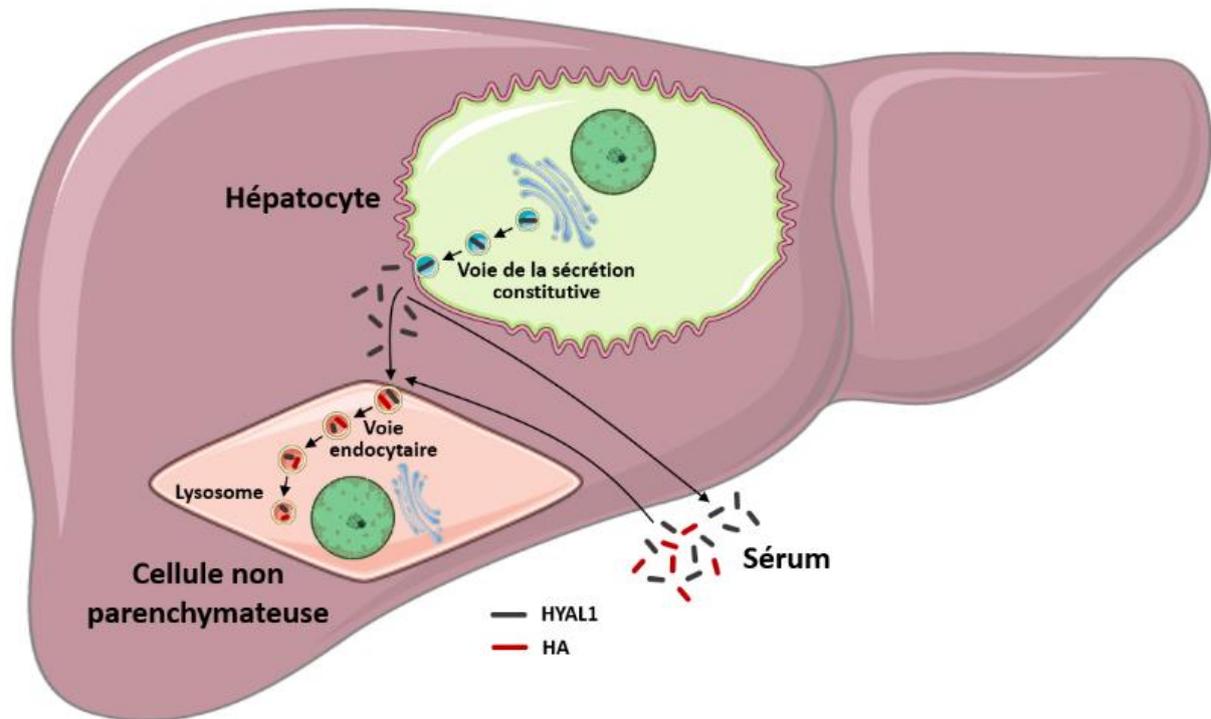


Figure 24: Représentation schématique du trafic d'HYAL1 et de la clairance de l'acide hyaluronique dans le foie. HYAL1 étant majoritairement exprimée par les hépatocytes dans le foie, nous émettons l'hypothèse que l'enzyme est sécrétée constitutivement dans le milieu extracellulaire par ces cellules sous une forme précurseur. Ensuite, HYAL1 sécrétée peut soit rejoindre le sérum où elle est présente en grande quantité soit être internalisée par les cellules non parenchymateuses. Il a en effet été démontré par notre laboratoire que ces cellules sont capables d'endocyter des quantités élevées d'HYAL1 [Gasingirwa et al., 2010]. Parmi les cellules non parenchymateuses, le type cellulaire principalement responsable de l'internalisation d'HYAL1 correspond probablement aux cellules endothéliales sinusoidales. Ces dernières sont connues pour exprimer le récepteur au mannose qui permettrait d'endocyter HYAL1 jusqu'aux lysosomes. Rapidement après son endocytose, HYAL1 subit un clivage protéolytique et donne naissance à une forme mature qui, comme le précurseur, est active. Le foie étant connu pour être le principal organe impliqué dans la clairance de l'HA circulant, ce mécanisme joue probablement un rôle important dans la dégradation de l'HA présent dans le sérum. Il a en effet été établi que l'HA circulant est majoritairement internalisé par les cellules endothéliales sinusoidales qui expriment le récepteur HARE et/ou LYVE-1. Il est dès lors envisageable que la dégradation de l'HA débute dans la voie d'endocytose grâce à l'action d'HYAL2 et d'HYAL1, elle-même endocytée par le récepteur au mannose, et se poursuive dans les lysosomes.

1.4. Contribution au modèle du catabolisme de l'acide hyaluronique

Considérées dans leur ensemble, les données obtenues au cours de notre travail permettent d'apporter de nouveaux éléments au modèle de dégradation de l'HA proposé par Robert Stern en 2003 et par l'équipe d'Eli Gilad l'année suivante [Stern, 2003; Bourguignon et al., 2004]. Selon ce modèle, le catabolisme de l'HA débiterait par sa liaison avec le récepteur CD44 et avec HYAL2 au niveau de cavéoles enrichies en NHE-1, un antiport Na^+/H^+ . Ce dernier générerait un microenvironnement légèrement acide à l'intérieur des cavéoles, ce qui permettrait à HYAL2 de cliver l'HA en fragments de

taille intermédiaire jusqu'à environ 20 kDa, qui seraient ensuite endocytés par la cellule. La dégradation de ces fragments se poursuivrait dans les lysosomes jusqu'à l'obtention de tétra- et hexasaccharides grâce à l'action d'HYAL1 qui serait aidée dans cette tâche par la β -hexosaminidase et la β -glucuronidase, deux enzymes respectivement capables d'éliminer les unités NAcGln et acide glucuronique qui composent l'HA.

L'existence d'un mécanisme de sécrétion suivie d'une internalisation d'HYAL1, que nous avons démontré dans notre travail, avait déjà été évoquée en 2007. Il avait en effet été observé que l'ajout d'HYAL1 dans le milieu de culture de cellules HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*) semblait suffisante pour augmenter la dégradation intracellulaire d'HA, lui-même endocyté [Harada and Takahashi, 2007]. Peu de temps après la publication de nos travaux dans le journal « *Traffic* » en 2014, l'équipe de Mélanie Simpson a confirmé qu'HYAL1 pouvait être sécrétée de façon constitutive avant d'être internalisée par les cellules cancéreuses prostatiques [McAtee et al., 2015]. De nouveaux éléments ont également été apportés par cette étude qui a notamment suggéré que l'endocytose de l'HA puisse dépendre de l'activité d'HYAL1. Il a en effet été montré que, contrairement à un mutant inactif d'HYAL1, la forme active de la protéine était capable de stimuler l'endocytose de l'HA, retrouvé ensuite co-localisé avec l'hyaluronidase dans des vésicules intracellulaires. Nos résultats sont en accord avec un modèle impliquant HYAL1 dans le clivage de l'HA prenant place dans le système endosomal/lysosomal. Nos travaux démontrent en outre qu'HYAL1 est déjà active sous sa forme précurseur et que, par conséquent, la dégradation de l'HA dans les cellules est vraisemblablement initiée dès l'arrivée du couple HYAL1 / HA dans la voie endocytaire, et éventuellement déjà au niveau des cavéoles. Il est intéressant de noter qu'HYAL1 a également été mise en évidence dans les endosomes de recyclage qui transportent du matériel des endosomes précoces vers la membrane plasmique [McAtee et al., 2015]. Il est donc possible qu'une fois les endosomes précoces atteints, l'HA endocyté puisse suivre deux voies différentes. Soit il poursuit la voie endocytaire vers un catabolisme complet dans les lysosomes, soit il est excrété dans le milieu extracellulaire, via des endosomes de recyclage, sous une forme partiellement dégradée par HYAL1 et/ou HYAL2.

Bien qu'il ait été montré que le CD44 est un récepteur majeur de l'HA [Harada and Takahashi, 2007], d'autres récepteurs interviennent dans la liaison à l'HA en fonction du type cellulaire. Par exemple, le récepteur HARE, connu pour être impliqué dans la clairance de l'HA, est exprimé par les cellules endothéliales hépatiques, des cellules qui jouent probablement un rôle prépondérant dans la dégradation de l'HA circulant [Jadin et al., 2012]. En regard de l'expression du récepteur au mannose dans ces cellules, nous pouvons postuler que l'HA circulant est internalisé par le récepteur HARE, et éventuellement LYVE-1, dans les cellules endothéliales hépatiques. L'HA serait ensuite dégradé dans les endosomes et les lysosomes notamment grâce à l'action d'HYAL1, elle-même endocytée par le récepteur au mannose à partir du milieu environnant (Fig 24). Ce modèle est cohérent avec l'accumulation très importante de l'HA dans le foie des souris déficientes pour HYAL1, et plus particulièrement dans les cellules sinusoidales hépatiques [Bourguignon and Flamion, 2016]. Par ailleurs, l'analyse des souris déficientes pour HYAL2 suggère que cette hyaluronidase peut également

jouer un rôle dans l'endocytose de l'HA circulant dans ces cellules [Bourguignon and Flamion, 2016]. Notons qu'il est probable qu'un mécanisme similaire se mette en place au niveau des cellules endothéliales de la rate et des ganglions lymphatiques qui expriment le récepteur au mannose ainsi que les récepteurs de l'HA HARE et/ou LYVE-1 [Linehan et al., 1999; Jadin et al., 2012].

Ce schéma du catabolisme de l'HA n'est cependant probablement pas applicable à tous les tissus. Par exemple, dans les ostéoclastes, seule l'expression des récepteurs CD44 et TLR4 a été renseignée jusqu'à présent et leurs rôles dans l'adhésion, la migration ou la différenciation de ces cellules ont été rapportés [Nakamura et al., 1995; Itoh et al., 2003; Ariyoshi et al., 2005; Chang et al., 2007; Chabadel et al., 2007]. Il pourrait être intéressant dans le futur d'étudier l'expression des récepteurs de l'HA, HARE ou LYVE-1, dans les ostéoclastes ainsi que leur fonction potentielle dans l'endocytose de l'HA par ces cellules. La mise en place, dans les ostéoclastes, du modèle du catabolisme de l'HA décrit ci-dessus est également peu probable en raison de l'expression amoindrie du récepteur au mannose dans les ostéoclastes en comparaison avec les macrophages. Il est intéressant de noter que l'internalisation d'HYAL1, qui est sécrétée par les ostéoclastes sous une forme précurseur et une forme mature respectivement par la voie constitutive et par exocytose du contenu des lysosomes de sécrétion, est diminuée au cours de l'ostéoclastogenèse. Par conséquent, les ostéoclastes semblent favoriser l'accumulation extracellulaire d'HYAL1, éventuellement au niveau de la lacune de résorption où HYAL1 pourrait exercer son activité en raison de l'environnement acidifié de cette zone (Fig 25). Il pourrait également être envisagé qu'HYAL1, et éventuellement son substrat, subisse une transcytose à travers les ostéoclastes et soit sécrétée au niveau baso-latéral comme cela a été décrit pour la cathepsine K et TRAP [Vääräniemi et al., 2004]. A l'instar des facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse, HYAL1 et/ou les fragments d'HA pourraient ainsi influencer le fonctionnement des ostéoclastes mais aussi d'autres types de cellules avoisinantes. Nous ne pouvons toutefois pas exclure qu'HYAL1 soit directement sécrétée au niveau baso-latéral par les ostéoclastes, et éventuellement ré-internalisée par d'autres cellules.

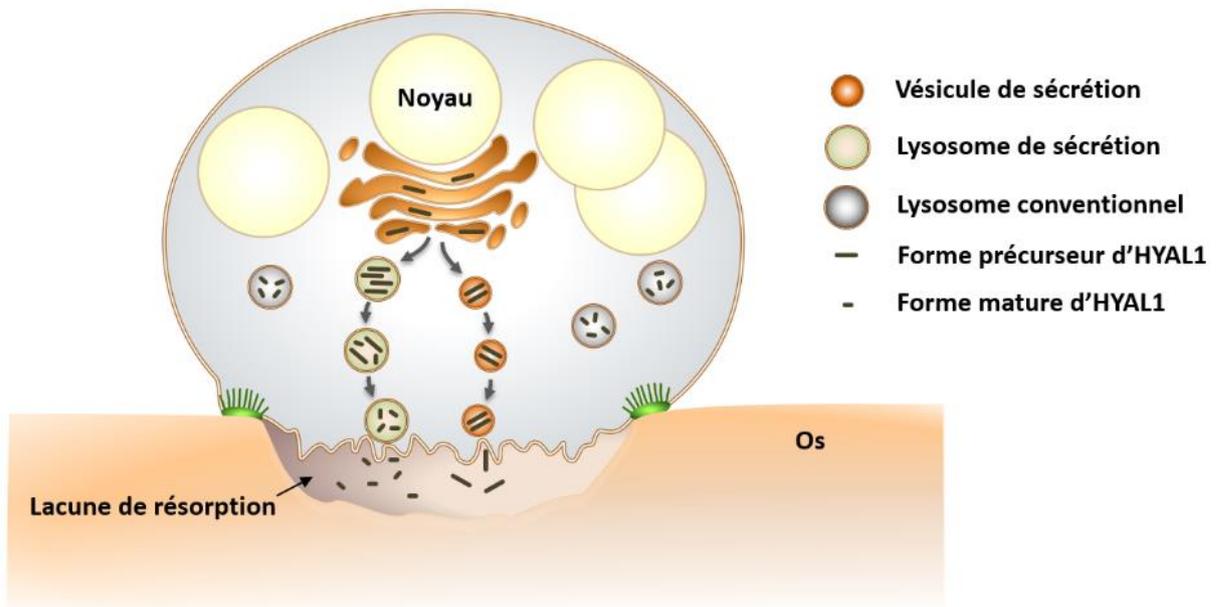


Figure 25: Illustration du trafic intracellulaire d'HYAL1 dans les ostéoclastes murins. Dans ces cellules, nous avons observé qu'HYAL1 est sécrétée sous forme d'un précurseur par la voie constitutive. Contrairement aux macrophages, HYAL1 est également présente dans le milieu extracellulaire sous une forme mature, probablement par exocytose du contenu des lysosomes de sécrétion. Le niveau d'endocytose d'HYAL1 étant diminué dans les ostéoclastes en comparaison avec les macrophages, HYAL1 semble être dirigée vers ces lysosomes de sécrétion par un mécanisme intracellulaire. Il n'est pas à exclure qu'HYAL1 soit également présente dans les lysosomes conventionnels. Lors de la polarisation de l'ostéoclaste sur l'os, la sécrétion d'HYAL1 pourrait être dirigée vers la lacune de résorption lors de l'exocytose régulée des lysosomes de sécrétion. Le pH acide de la lacune permettrait alors la mise en place de son activité.

2. Expression d'HYAL1 dans les ostéoclastes

Un de nos objectifs majeurs était d'investiguer l'expression d'HYAL1 dans les ostéoclastes murins. En 1965, une activité de dégradation de l'HA avait été détectée dans des homogénats de calvaria de rats, des structures qui comprennent les os de la voûte crânienne [Vaes and Jacques, 1965]. A l'époque, ni les enzymes responsables de cette activité, ni les cellules produisant ces dernières n'avaient pu être identifiées. Depuis lors, la présence d'une hyaluronidase dans le tissu osseux n'a plus jamais été étudiée en-dehors d'un article paru en 2006 montrant que les ostéoblastes expriment HYAL2, HYAL3 et HYAL4 mais pas HYAL1 [Adams et al., 2006]. A notre connaissance, notre étude est donc la première à décrire une expression importante d'HYAL1 dans les ostéoclastes par rapport à leurs cellules précurseurs. Rappelons que ces dernières sont les cellules dans lesquelles nous avons précédemment étudié la synthèse, le transport et la maturation de l'enzyme endogène. L'augmentation du niveau protéique d'HYAL1 d'environ 25 fois dans les ostéoclastes par rapport aux macrophages semble donc d'autant plus significative que les cellules précurseurs sont connues pour exprimer l'enzyme. L'activité responsable du catabolisme de l'HA mise en évidence dans le tissu osseux en 1965 peut, au moins en partie, s'expliquer par l'expression d'HYAL1 dans les ostéoclastes. En effet, l'activité hyaluronidasique avait été détectée par la technique de Reissig dont environ 80 % du signal obtenu peut être attribué à HYAL1 dans le foie de souris. En outre, la seule étude à avoir investigué la présence d'HYAL1 dans les ostéoblastes n'a pas pu mettre en évidence d'expression de son ARNm dans la lignée ostéoblastique MG63 [Adams et al., 2006]. Bien que ces résultats suggèrent que les ostéoclastes sont les cellules majoritairement responsables de la production de l'enzyme par le tissu osseux, une des perspectives de ce travail pourrait être d'analyser l'expression d'HYAL1 dans des ostéoblastes primaires afin de confirmer ou non les résultats obtenus par cette étude publiée en 2006. Nous ne pouvons pas non plus exclure qu'HYAL1 soit produit par les ostéocytes, des cellules issues de la différenciation des ostéoblastes, notamment capables de sécréter du RANKL en réponse à différents stimuli [Nakashima et al., 2011a]. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression d'HYAL1 dans les ostéocytes dont la culture *in vitro*, limitée par le passé, semble à présent plus abordable [Shah et al., 2016]. Afin d'obtenir une vue d'ensemble du métabolisme de l'HA, l'expression des HAS, les enzymes responsables de la biosynthèse de l'HA, pourrait être analysée au cours de l'ostéoclastogénèse.

Une question qui se pose dès lors est la suivante : quelles sont les voies de régulation qui provoquent l'augmentation de l'expression d'HYAL1 au cours de la différenciation des macrophages en ostéoclastes ? Une information intéressante a été apportée en 2013 par l'équipe de Gerard Karsenty qui a montré qu'une stimulation de l'ostéoclastogénèse par le RANKL provoquait la phosphorylation du facteur de transcription TFEB, ce qui a pour effet d'augmenter sa stabilité et donc son niveau protéique intracellulaire [Ferron et al., 2013]. Précisons que cette phosphorylation de TFEB par le RANKL, qui a pour effet de stabiliser le facteur de transcription, est à distinguer de la phosphorylation d'autres sérines décrite par le passé qui, quant à elle, inhibe la translocation nucléaire de TFEB et donc

son action d'induction de l'expression génique [Settembre et al., 2011b]. TFEB étant capable de réguler l'expression de la majorité des protéines lysosomales, ce facteur de transcription pourrait stimuler la biogenèse des lysosomes dans les ostéoclastes et ainsi influencer le processus de résorption osseuse. Ces auteurs ont en effet montré que, en absence de TFEB, l'augmentation d'expression de TRAP et de la cathepsine K accompagnant la différenciation des ostéoclastes est moins importante. L'activité des ostéoclastes est diminuée et les souris présentent une masse osseuse plus élevée. Cependant, contrairement à de nombreuses protéines lysosomales, HYAL1 ne ferait pas partie du réseau CLEAR car son promoteur ne semble pas posséder la séquence consensus de liaison à TFEB décrite par l'équipe de Ballabio [Sardiello et al., 2009]. La question de la régulation de l'expression d'HYAL1 au cours de l'ostéoclastogenèse reste donc entière.

A cet égard, il est intéressant de citer une étude de 2008, qui a démontré que la liaison des facteurs de transcription Egr-1 (*Early growth response protein 1*), AP-2 et NF- κ B au promoteur d'HYAL1 humain provoquait une augmentation de son expression [Lokeshwar et al., 2008]. Il faut également préciser que, contrairement aux petits fragments, l'HA de haute masse moléculaire est capable d'induire une augmentation de la liaison de ces facteurs de transcription au promoteur d'HYAL1 dans les cellules qui expriment l'hyaluronidase. Au contraire, l'HA ne semble pas moduler l'expression d'HYAL1 dans des cellules qui n'expriment pas HYAL1 en condition basale. Etant donné que la voie d'activation du NF- κ B est une des voies de signalisation stimulées dans les cellules précurseurs des ostéoclastes suite à la liaison du RANKL [Nakashima and Takayanagi, 2011b], il serait intéressant de tester si cette voie est responsable de l'augmentation de l'expression d'HYAL1 dans les ostéoclastes.

3. Le phénotype osseux des souris déficientes pour HYAL1

Une augmentation de leur expression étant une caractéristique commune à plusieurs enzymes importantes pour la résorption osseuse telles que la cathepsine K et TRAP [Czupalla et al., 2006], nous avons trouvé intéressante l'observation d'une surexpression d'HYAL1 au cours de l'ostéoclastogenèse. Nous pourrions en effet y voir un indice d'une implication de cette enzyme dans la résorption osseuse par ces cellules. Afin d'étudier cette possibilité, nous avons décidé d'analyser l'impact de l'inactivation du gène codant pour HYAL1 sur la densité osseuse des souris.

Pour rappel, la caractérisation initiale des souris *Hyal1* ^{-/-} avait mis en évidence le développement d'un phénotype d'arthrose [Martin et al., 2008]. Cette conclusion était basée sur la perte des protéoglycanes observée au niveau du cartilage articulaire et sur le développement d'excroissances osseuses appelées ostéophytes, deux éléments typiquement observés lors d'une arthrose [Martin et al., 2008]. Par ailleurs, il avait été rapporté que les souris déficientes pour HYAL2 dans le cartilage souffrent d'une arthrose associée à une perte progressive des protéoglycanes du cartilage articulaire [Higuchi et al., 2017]. Enfin, chez l'homme, il avait été déterminé que les patients atteints de MPS de type IX souffrent d'une arthrite juvénile idiopathique, sur base de l'apparition de manifestations cliniques caractérisées principalement par des douleurs et des masses au niveau des articulations [Natowicz et al., 1996a; Imundo et al., 2011]. Bien qu'une infiltration de la membrane synoviale par des macrophages ait été identifiée, les biopsies articulaires de ces individus ne présentaient pas d'accumulation de lymphocytes caractéristiques aux arthrites telles que l'arthrite rhumatoïde. Sur base de cette observation, l'arthrite développée par les patients atteints de MPS de type IX pourrait être rapprochée de l'arthrose qui est caractérisée par une inflammation chronique de bas grade [Imundo et al., 2011; Mora et al., 2018]. Il est à noter que l'inefficacité des traitements classiques de l'arthrite, comme la prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ou l'injection intra-articulaire de stéroïdes, dans le traitement des symptômes articulaires associés à la MPS de type IX, démontre le caractère atypique de l'arthrite juvénile idiopathique développée par ces patients [Natowicz et al., 1996a; Imundo et al., 2011].

Nos analyses étendent la caractérisation des conséquences liées à l'inactivation d'HYAL1 par la démonstration que les souris mâles *Hyal1* ^{-/-} âgées d'un an présentent une diminution significative de leur densité osseuse ainsi que du volume de leur tissu osseux. La densité osseuse a également été évaluée chez des souris mâles de huit semaines mais, bien qu'elle soit légèrement diminuée, la différence n'est pas statistiquement significative. Nous en concluons que la déficience en HYAL1 induit une perte de densité osseuse progressive chez ces rongeurs. Cette observation nous est apparue très surprenante puisque notre prédiction initiale était que l'inactivation d'une enzyme de dégradation d'un composant de la matrice osseuse causerait plutôt une augmentation de la densité de cette matrice, c'est-à-dire une ostéopétrose. Ce type de phénotype est en effet observé en réponse à une déficience d'un acteur de la résorption osseuse tel que TRAP ou la cathepsine K. Il apparaît que les

effets de l'absence d'HYAL1 sur le remodelage osseux sont plus complexes qu'attendus, potentiellement en raison des fonctions très diverses de l'HA, fonctions qui sont par ailleurs dépendantes de sa masse moléculaire et donc vraisemblablement de son catabolisme par les hyaluronidases.

3.1. Impact de l'absence d'HYAL1 sur les ostéoclastes

Afin d'investiguer la cause sous-jacente de la diminution de la densité osseuse dans les souris *Hyal1* $-/-$, nous avons analysé la formation et le fonctionnement d'ostéoclastes différenciés à partir de monocytes isolés de leur moelle osseuse. Nos résultats (résumés dans la Fig 26) démontrent que ces monocytes se différencient normalement en ostéoclastes *in vitro*. Ceci indique que la formation de ces cellules géantes multinucléées par fusion de monocytes-macrophages n'est pas impactée par l'expression d'HYAL1, du moins dans un environnement simple tel que celui de la culture en monocouche. Cependant, avons remarqué que les ostéoclastes déficients pour HYAL1 cultivés sur de fines coupes d'os présentent une activité de résorption de la matrice osseuse augmentée. En effet, par rapport aux ostéoclastes sauvages, le nombre de puits de résorption formés par les cellules *Hyal1* $-/-$ est augmenté, ainsi que leur surface. Ceci s'accompagne d'une élévation du nombre d'anneaux d'actine filamenteuse, ce qui indique que le nombre de points d'ancrages sur l'os est également augmenté. Par ailleurs, *ex vivo*, nous avons détecté une augmentation du nombre d'ostéoclastes dans les fémurs des souris déficientes pour l'enzyme.

<i>In vitro</i>		<i>Ex vivo</i>
Nombre d'ostéoclastes:	=	Densité osseuse: ↓
Activité des ostéoclastes:	↗	Taille des fémurs: ↓
Nombre d'anneaux d'actine:	↗	Nombre d'ostéoclastes: ↗
		Nombre d'ostéoblastes: =
		Marqueurs de résorption osseuse: =
		Marqueur de formation osseuse: ↓

Figure 26: Tableau récapitulatif des effets de l'absence d'HYAL1 sur le remodelage osseux. *In vitro*, nous avons pu observer que l'ostéoclastogénèse n'est pas impactée par l'absence d'HYAL1, qu'il s'agisse d'ostéoclastes polarisés ou non. Le nombre d'anneaux d'actine formés par les ostéoclastes *Hyal1*^{-/-} est toutefois plus élevé. *Ex vivo*, le nombre d'ostéoclastes est augmenté alors que nombre d'ostéoblastes demeure inchangé. Enfin, en cas de déficience en HYAL1, les marqueurs de résorption et de formation osseuse présentent des concentrations sériques qui sont respectivement normales et diminuées en comparaison avec les souris sauvages. La diminution de la densité osseuse observée chez les souris *Hyal1*^{-/-} pourrait, par conséquent, être attribuée à une augmentation du nombre d'ostéoclastes et d'anneaux d'actine ainsi que de l'activité de ces cellules associées à une diminution progressive de la formation osseuse (encadrés en rouge). Il est à noter que ce phénotype s'accompagne d'une réduction de la longueur des fémurs.

Chacune de ces observations, et les informations qu'elles apportent et qui pourraient contribuer à l'identification des mécanismes sous-jacents aux effets de la perte d'HYAL1 sur le remodelage osseux, sont discutées ci-dessous.

3.1.1. Effets potentiels de l'acide hyaluronique sur l'ostéoclastogénèse

Des expériences réalisées *in vitro* par d'autres groupes ont mis en évidence une inhibition de la différenciation et de l'activité des ostéoclastes lorsqu'ils sont différenciés en présence d'HA de haute masse moléculaire [Chang, Kim et al., 2007; Pivetta et al., 2011; Salbach, Kliemt et al., 2012]. A l'inverse, deux autres équipes ont montré qu'un HA de faible masse moléculaire augmente le nombre et la fonction des ostéoclastes *in vitro* [Ariyoshi et al., 2005; Chang, Kim et al., 2007]. Ces observations ne sont pas directement comparables à une situation *in vivo*, mais indiquent qu'un changement de taille ou d'abondance de l'HA dans l'environnement des ostéoclastes pourrait modifier leur nombre et/ou leur activité. Dans notre modèle de souris *Hyal1*^{-/-}, nous avons observé une accumulation d'HA dans l'os, mais nous ne savons pas, à ce stade, si le profil de masse moléculaire des molécules d'HA est altéré par rapport aux souris contrôles. Les données publiées par Bourguignon et Flamion en 2016, qui ont montré que les souris *Hyal1*^{-/-} présentent une accumulation d'HA dans de nombreux tissus sans

modification de la distribution de sa taille, suggèrent qu'il pourrait ne pas y avoir de changement majeur du profil de masse moléculaire de l'HA dans le tissu osseux. Dans ce cas de figure, la simple augmentation du niveau total d'HA dans les os des souris *Hyal1* *-/-* pourrait-elle expliquer le nombre plus élevé d'ostéoclastes détectés, et une activité de résorption plus élevée ? Dans les articles qui ont mis en avant un effet positif de l'HA sur le fonctionnement des ostéoclastes, il a été déterminé que les petits fragments stimulaient l'expression du récepteur RANK et augmentaient le taux de phosphorylation de p38 et ERK, des MAPK activées par le RANKL [Ariyoshi et al., 2005; Chang, Kim et al., 2007]. Afin de poursuivre ce projet, nous pourrions mesurer l'expression de RANK ainsi que le taux de phosphorylation de p38 et ERK dans des ostéoclastes sauvages et *Hyal1* *-/-* incubés en présence de sérum de souris déficientes pour l'hyaluronidase. Cette expérience pourrait nous permettre de tester les effets de l'HA accumulé en cas de perte d'HYAL1 et donc de se rapprocher des conditions *in vivo*.

Il est à noter que l'absence d'augmentation du nombre d'ostéoclastes *Hyal1* *-/-* quantifiés *in vitro* n'est peut-être pas surprenant. Même s'il a été rapporté que les ostéoclastes synthétisent de l'HA *in vitro* [Luben et al., 1976; Wong, 1979], il est probable que la concentration d'HA dans un large volume de milieu de culture, changé tous les deux jours, soit plus faible que dans l'environnement osseux.

3.1.2. Effets de l'acide hyaluronique sur la production de RANKL et d'OPG

Il a été décrit que la liaison de l'HA à son récepteur CD44 sur les cellules stromales de la moelle osseuse provoque une modification de leur sécrétion de RANKL et, par conséquent, influence l'ostéoclastogénèse [Cao et al., 2005; Ariyoshi et al., 2014]. Une augmentation de la production de RANKL et/ou une diminution de l'OPG, un récepteur soluble de ce dernier qui l'empêche d'agir sur son récepteur RANK à la surface des ostéoclastes, pourrait conduire à une élévation du nombre d'ostéoclastes *in vivo*. En accord avec nos observations, cette augmentation ne pourrait pas être observée *in vitro* étant donné que ces cytokines ne sont pas produites par les monocytes - macrophages et qu'une concentration fixe de RANKL est ajoutée par l'expérimentateur.

Précisons qu'il a été rapporté que l'HA ne lierait pas directement le RANKL et l'OPG [Salbach-Hirsch, Kraemer et al., 2013]. Néanmoins, en plus d'agir sur les cellules stromales pour impacter directement la production de RANKL, l'HA pourrait modifier la sécrétion de cette cytokine par une voie indirecte. En effet, via une interaction avec ses récepteurs CD44 et TLR4, l'HA serait capable d'agir sur le RANKL en augmentant ou en diminuant, selon sa masse moléculaire, l'expression et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- α par divers types cellulaires dont les macrophages, les fibroblastes ou les ostéoblastes [Khaldoyanidi et al., 1999; Lajeunesse et al., 2003; Campo et al., 2012; Baeva et al., 2014]. Ces deux interleukines et le TNF- α sont connus pour accroître le processus d'ostéoclastogénèse par l'intermédiaire d'une stimulation de la production de RANKL par les ostéoblastes et les ostéocytes [Hofbauer et al., 1999; Wu et al., 2017]. Précisons que ces cytokines sont également capables d'augmenter la différenciation et l'activité des ostéoclastes, indépendamment du RANKL, ainsi que de prolonger leur survie [Jimi et al., 1998; Jimi et al., 1999; Kobayashi et al., 2000;

Fuller et al., 2002; Kudo et al., 2003; Kim et al., 2009]. A ce stade, il est difficile de prédire l'impact que pourrait avoir la déficience en HYAL1 sur l'abondance et/ou la sécrétion d'IL-1, d'IL-6 ou de TNF- α puisque les effets de l'HA à ces niveaux semblent dépendre de sa masse moléculaire et de l'identité des cellules cibles. La distribution de la taille de l'HA accumulé dans différents tissus des souris *Hyal1* $-/-$ n'étant pas modifiée [Bourguignon and Flamion, 2016], il est probable que des fragments de tailles variées s'accumulent dans l'environnement osseux ce qui complique la prédiction des effets de l'HA sur ces cytokines dans notre modèle. Afin de tester si cette hypothèse mérite d'être explorée, nous pourrions dans un premier temps mesurer les concentrations d'OPG et de RANKL dans les os et le sérum de souris sauvages ou déficientes pour HYAL1, ainsi que des cytokines IL-1, IL-6 et TNF- α . L'efficacité d'inhibiteurs de ces cytokines à restaurer la densité osseuse de souris *Hyal1* $-/-$ pourrait également être évaluée.

3.1.3. Sécrétion de la cathepsine K et de TRAP par les ostéoclastes

Nous avons testé expérimentalement si l'augmentation de l'activité des ostéoclastes *Hyal1* $-/-$ observée *in vitro*, lors de leur culture sur des coupes d'os, pouvait être attribuée à une augmentation d'enzymes importantes pour le processus de résorption osseuse telles que la cathepsine K et TRAP. Lorsque nous mesurons l'abondance protéique de ces enzymes dans des ostéoclastes cultivés *in vitro* sur un substrat en plastique, nous détectons une diminution de leur expression dans les cellules déficientes pour HYAL1. Cette diminution n'est pas accompagnée par une modification de l'abondance de leurs ARNm respectifs, indiquant qu'une régulation transcriptionnelle n'est pas responsable de la diminution d'expression protéique observée. L'hypothèse que nous avons alors formulée est que TRAP et la cathepsine K pourraient être hypersécrétées dans le milieu de culture des ostéoclastes, aux dépens de leur présence dans la cellule. Une fois en contact avec l'os, ceci pourrait expliquer l'augmentation de la résorption osseuse que nous détectons *in vitro*, dans des conditions où le nombre d'ostéoclastes contrôles et déficients pour HYAL1 est identique. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'augmentation de la quantité de ces enzymes dans le milieu extracellulaire des cellules cultivées sur plastique. Nous ne savons pas à ce stade si cette observation est transférable à la situation des ostéoclastes en contact avec de l'os, étant donné qu'il n'est pas possible techniquement de mesurer la quantité d'hydrolases acides sécrétées dans l'espace fermé de la lacune de résorption. De plus, il n'y a, à notre connaissance, aucune donnée publiée sur l'impact éventuel de l'HA et/ou d'HYAL1 sur l'exocytose des lysosomes. Face à ce constat, nous pouvons uniquement conclure qu'une hypersécrétion de la cathepsine K et de TRAP par les ostéoclastes *Hyal1* $-/-$ en contact avec l'os n'est pas exclue. Cependant, en l'absence de preuves expérimentales, d'autres hypothèses peuvent aussi être formulées.

Une première idée, très spéculative, est que le pH de la lacune de résorption pourrait être plus acide après inactivation d'HYAL1. Une étude a montré que des fibroblastes traités avec de l'HA présentent une diminution de leur pH intracellulaire [Kathagen and Prehm, 2013]. En raison d'une accumulation

d'HA non digéré, due à la déficience en HYAL1, il pourrait être envisagé qu'une hyperacidification des lysosomes, et par conséquent de la lacune de résorption, favorise la dissolution de la matrice inorganique d'une part et augmente l'activité des hydrolases acides qui dégradent la matrice organique d'autre part.

Une autre hypothèse, supportée par une série d'indices provenant de la littérature est que les ostéoclastes pourraient adhérer plus longtemps à l'os, ce qui allongerait le temps qu'ils passent à résorber la matrice au niveau du site où ils sont fixés. Cette hypothèse et les éléments qui la supportent sont l'objet du point 3.1.4.

3.1.4. Adhésion des ostéoclastes

Il a été montré qu'un plus grand nombre d'ostéoclastes humains adhèrent à des surfaces en plastique lorsque ces dernières sont recouvertes d'HA. Cette adhésion implique l'interaction du récepteur CD44 avec son ligand HA [Spessotto et al., 2002]. Le CD44 est en effet localisé dans le noyau des podosomes des ostéoclastes, des structures qui sont impliquées dans l'adhésion et la polarisation cellulaire [Chabadel et al., 2007]. Les intégrines enrichies dans les podosomes interagissent avec des protéines de la matrice osseuse et induisent un remaniement de l'actine conduisant à la condensation des podosomes et à la formation de l'anneau d'actine [Georgess et al., 2014]. En plus de la localisation du CD44 dans le noyau des podosomes et dans l'anneau d'actine, l'équipe de Frédéric Saltel a montré que la liaison du CD44 avec de l'HA permettait de restaurer la formation des podosomes dans les ostéoclastes dépourvus de ces structures suite à la délétion du gène codant pour WIP, une protéine impliquée dans la régulation de la polymérisation de l'actine. Ces auteurs proposent que l'HA ou l'ostéopontine, deux ligands du CD44 présents dans la matrice osseuse, concentrent et activent le CD44, induisant ainsi la formation de l'anneau d'actine lorsque les ostéoclastes sont en contact avec de l'os [Chabadel et al., 2007]. En accord avec un rôle du CD44 dans l'adhésion et la formation des anneaux d'actine, les ostéoclastes déficients pour le CD44 présentent une taille moyenne et une activité de résorption réduites [Suzuki et al., 2002; Li, Zhong et al., 2015]. L'analyse des souris déficientes pour le CD44 n'a cependant pas révélé d'impact majeur du récepteur sur le phénotype osseux puisque seule une augmentation de l'épaisseur de l'os cortical accompagnée d'une diminution de la taille du tibia et de l'aire médullaire ont pu être identifiées [de Vries et al., 2005; Cao et al., 2005]. Cette observation peut paraître surprenante étant donné que les nombreux rôles de l'HA qui ont été proposés dans le remodelage osseux ont majoritairement été attribués au CD44.

Dans notre modèle de souris *Hyal1* ^{-/-}, il est intéressant de considérer que l'accumulation d'HA dans les os pourrait promouvoir l'adhésion des ostéoclastes sur la matrice osseuse et, par conséquent la résorption osseuse puisque celle-ci est dépendante de la formation d'un anneau d'actine scellant la lacune de résorption. Notons que dans nos expériences réalisées *in vitro*, les ostéoclastes sauvages et *Hyal1* ^{-/-} ont été incubés sur des coupes d'os provenant d'un même bovin sain. Il n'y a donc pas plus d'HA dans la matrice osseuse sur laquelle les ostéoclastes *Hyal1* ^{-/-} ont été différenciés, du moins au

début de la culture cellulaire. L'HA sécrété par les ostéoclastes, probablement en partie au niveau des lacunes de résorption et des podosomes, se lie-t-il à la matrice osseuse bovine ? Si oui, une absence de dégradation de l'HA par HYAL1 pourrait causer une accumulation périphérique d'HA qui pourrait expliquer l'augmentation du nombre d'anneaux d'actine que nous avons observée.

En outre, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, l'absence de l'enzyme HYAL1 pourrait promouvoir un attachement prolongé des ostéoclastes dans un état de résorption actif sur la matrice extracellulaire. En effet, des enzymes, telles que des métalloprotéases et des protéases à sérine ou cystéine, sont sécrétées au niveau des podosomes via des vésicules dont certaines semblent correspondre à des lysosomes [Tu et al., 2008]. Par conséquent, il est envisageable qu'HYAL1 puisse être en partie ciblée vers les podosomes qui composent l'anneau d'actine, d'autant plus qu'il a été rapporté par l'équipe de Mélanie Simpson en 2015 que l'hyaluronidase était localisée dans des vésicules de cellules cancéreuses souvent à proximité des adhésions focales, des structures proches des podosomes [McAtee et al., 2015]. Il n'est dès lors pas impossible qu'HYAL1, envoyée au niveau de l'anneau d'actine, puisse participer directement à la dissociation de l'interaction entre le CD44 et l'HA.

Il pourrait être intéressant d'explorer le phénotype osseux des souris doublement déficientes pour le CD44 et HYAL1, afin d'observer si les effets de l'absence de l'hyaluronidase impliquent un mécanisme exigeant la présence du récepteur. Nous pourrions également analyser, *in vitro*, l'adhésion et l'activité des ostéoclastes issus des souris déficientes pour ces deux protéines en comparaison avec les cellules *Hyal1*^{-/-} ou *CD44*^{-/-}.

3.2. Impact de l'absence d'HYAL1 sur des marqueurs de résorption et de formation osseuse

Afin de compléter l'analyse du phénotype osseux des souris *Hyal1*^{-/-}, les concentrations sériques de deux marqueurs de résorption osseuse ont été mesurées. Cette analyse a révélé que les concentrations de TRAP et des produits de dégradation du collagène de type I appelés CTX (*C-terminal Telopeptide of type I-collagen*), qui reflètent respectivement le nombre et l'activité des ostéoclastes, sont similaires à celles mesurées dans le sérum des souris contrôles que ce soit à 7 ou à 18 mois. Notons cependant qu'une modification du remodelage osseux ne se traduit pas toujours par une altération des niveaux sériques de ces marqueurs [Frisch et al., 2012; Pacheco-Costa et al., 2014; Xu et al., 2014].

Par ailleurs, dans notre modèle *Hyal1*^{-/-}, deux facteurs sont à prendre en considération. Premièrement, nos analyses ont mis en avant que la quantité de TRAP dans les ostéoclastes déficients pour HYAL1 est diminuée d'environ 55 % (un point discuté dans le paragraphe 2.2.2 ci-dessus). Dans ces conditions, le dosage sérique de TRAP pourrait ne plus refléter aussi fidèlement le nombre d'ostéoclastes. Deuxièmement, un dosage des fragments N-terminaux du collagène de type I a révélé une diminution de la biosynthèse de ce constituant de la matrice osseuse dans les souris *Hyal1*^{-/-}. Si

le niveau total de collagène est diminué, il est possible que l'augmentation d'activité des ostéoclastes *Hyal1*^{-/-} ne génère pas d'augmentation des niveaux circulants de CTX.

Comment l'inactivation génique d'HYAL1 impacte la synthèse du collagène par les ostéoblastes reste une question sans réponse à ce stade. Des études réalisées *in vitro* montrent globalement que l'HA possède un effet stimulateur sur l'activité de ces cellules [Huang et al., 2003; Zou et al., 2008; Mathews et al., 2014; Zhao et al., 2015]. A première vue, nous aurions donc pu nous attendre à une augmentation du fonctionnement des ostéoblastes, ce que nous n'avons pas observé dans notre modèle. Il est fort possible que les effets obtenus *in vitro*, avec de l'HA exogène de masse moléculaire choisie arbitrairement, ne reflètent pas la situation prévalant *in vivo*, lors d'une accumulation d'HA résultant d'une perturbation de son catabolisme.

3.3. HYAL1, acide hyaluronique et densité osseuse

Il est intéressant de noter que, chez l'homme, une analyse génomique a montré qu'une densité osseuse faible est corrélée avec des variations dans la région chromosomique 3p21 qui contient notamment la séquence qui code pour HYAL1 [Wilson et al., 2003].

Par ailleurs, plusieurs études ont rapporté des modifications de l'abondance de l'HA dans diverses pathologies osseuses. Il a notamment été observé que de l'HA s'accumule dans les tissus osseux lors d'un apport insuffisant en vitamine D, calcium ou phosphate qui peut entraîner une diminution de la densité osseuse [Dickson and Roughley, 1993]. Les os des patients atteints d'ostéogenèse imparfaite, une pathologie caractérisée par une fragilité osseuse, présentent également une augmentation de la concentration d'HA [Oohira and Nogami 1989]. En absence de données supplémentaires, il est difficile de déterminer la cause de l'accumulation d'HA dans ces pathologies osseuses. Il serait intéressant, dans le futur, de mesurer les niveaux protéique et d'activité d'HYAL1 dans le sérum et dans les os de ces patients afin de déterminer si la concentration et l'activité de l'enzyme sont diminuées, ce qui expliquerait l'accumulation d'HA observée. Notons qu'une étude de 2005 n'a pas mis en évidence de différence majeure dans les niveaux sériques d'HYAL1 de quatre patients atteints d'ostéoporose [Fischer-Szafarz et al., 2005]. Cette investigation mériterait néanmoins d'être poursuivie puisque la mesure a été réalisée de façon semi-quantitative et sans précision du type d'ostéoporose inclus dans l'étude.

D'autre part, il serait intéressant de mesurer HYAL1 dans le sérum de femmes atteintes d'ostéoporose consécutive à un manque d'estrogènes. En parallèle, nous pourrions investiguer la densité osseuse de souris femelles, avant et après l'induction d'une ostéoporose par ovariectomie. Que l'ostéoporose soit liée à la ménopause ou à une ovariectomie, elle est principalement provoquée par la diminution de la concentration des estrogènes. Ces hormones inhibent l'expression des cytokines IL-1, IL-6 et TNF- α par différents types cellulaires. En effet, par leurs interactions avec leurs récepteurs, les estrogènes

impactent négativement la production de ces cytokines par les lymphocytes T et les ostéoblastes [Takao et al., 2005; Wang et al., 2006]. En outre, un effet similaire a été observé dans les macrophages puisque l'absence d'estrogènes augmenterait l'expression du CD16 (*Cluster of Differentiation 16*), un récepteur dont l'activation induit une sécrétion d'IL-1, IL-6 et TNF- α [Kramer et al., 2004]. Comme expliqué précédemment, il est généralement admis que ces cytokines ont pour effet de stimuler la sécrétion de RANKL, l'ostéoclastogénèse et l'activité des ostéoclastes [Jimi et al., 1998; Jimi et al., 1999; Kobayashi et al., 2000; Fuller et al., 2002; Kudo et al., 2003; Kim et al., 2009]. En absence d'estrogènes, suite à la ménopause ou à une ovariectomie, la production des cytokines IL-1, IL-6 et TNF- α est donc augmentée ce qui a comme conséquence de stimuler la résorption osseuse [Feng and McDonald, 2011].

Une étude relativement récente a mis en évidence que l'expression d'HYAL1 est diminuée par les estrogènes dans certaines cellules cancéreuses mammaires [Edjekouane et al., 2016]. Des résultats obtenus par notre équipe indiquent cependant que, dans d'autres cellules cancéreuses mammaires, l'expression d'HYAL1 est augmentée par une incubation en présence d'estrogènes (communication personnelle de Marielle Boonen). De plus, parmi les quatre individus identifiés porteurs d'une déficience en HYAL1, la MPS de type IX, les deux patientes de sexe féminin présentent un phénotype plus marqué en comparaison avec les deux jeunes hommes [Natowicz et al., 1996a; Imundo et al., 2011]. Il serait dès lors intéressant de tester si l'expression d'HYAL1 est modifiée par les estrogènes chez l'homme et après ovariectomie dans des souris sauvages. Sur base des résultats que nous avons obtenus en analysant le phénotype osseux des souris déficientes en HYAL1, il nous apparaît qu'en cas de diminution du niveau d'HYAL1 après ovariectomie (ou diminution de la production des estrogènes au cours du vieillissement chez la femme), une accumulation d'HA pourrait être observée et que celle-ci pourrait contribuer au développement de l'ostéoporose. Cette accumulation d'HA pourrait moduler le fonctionnement des ostéoclastes et/ou des ostéoblastes, comme nous l'observons chez les souris *Hyal1* *-/-*, via les mécanismes discutés dans les paragraphes précédents.

3.4. Les effets de l'absence d'HYAL1 sur la croissance longitudinale des os

Nos observations ont révélé que les fémurs des souris déficientes pour HYAL1 sont de longueur moindre et présentent une épaisseur réduite de la plaque de croissance, suggérant que l'absence de l'enzyme pourrait affecter l'ossification endochondrale qui permet la croissance longitudinale des os.

Composée de cartilage, la plaque de croissance est subdivisée en quatre parties : les zones de réserve, de prolifération, de pré-hypertrophie et d'hypertrophie sont successivement observées de l'épiphyse vers la métaphyse [Baron, 2000]. Chaque région correspond à des étapes de différenciation différentes des chondrocytes qui s'hypertrophient progressivement et provoquent la minéralisation partielle du cartilage avant d'entrer en apoptose. Attirés par des facteurs angiogéniques, des vaisseaux sanguins

envahissent ensuite les espaces laissés libres par les chondrocytes et y transportent des ostéoblastes qui pourront synthétiser de la matrice osseuse. Un rôle de l'HA dans la croissance longitudinale osseuse avait déjà été suggéré en raison de la variation de sa distribution le long de la plaque de croissance, l'HA étant plus abondant au niveau de la zone d'hypertrophie [Genever and Dickson, 1996]. Dans cette région, l'accumulation d'HA dans l'espace péricellulaire entourant les chondrocytes hypertrophiques contribuerait à l'élargissement de cette lacune et ainsi à la croissance osseuse [Pavasant et al., 1996]. Il a été démontré qu'HYAL1 et HYAL2 sont exprimées dans les zones de prolifération et d'hypertrophie, et qu'une exocytose lysosomale prenant place dans les chondrocytes hypertrophiques provoque la sécrétion d'hyaluronidases dont probablement HYAL1 [Tanimoto et al., 2004; Bastow et al., 2012]. Il a également été proposé par Edward Bastow que la présence de ces hyaluronidases dans la zone d'hypertrophie catalyse la formation de petits fragments d'HA pro-angiogéniques qui favoriseraient l'invasion des vaisseaux sanguins [Bastow et al., 2008]. Ces hyaluronidases pourraient aussi jouer un rôle dans la dégradation des agrégats d'aggrécane, le protéoglycane majoritaire du cartilage composé d'une partie protéique et des GAGs sulfate de chondroïtine et sulfate de kératane. Les agrégats, formés par la liaison non covalente d'une seule chaîne d'HA à de nombreux monomères d'aggrécanes, pourraient ainsi être désassemblés sous l'action d'hyaluronidases. Dans cette région de la plaque de croissance, le catabolisme de l'HA, probablement en partie grâce à l'action d'HYAL1, serait donc nécessaire au déroulement de l'ossification endochondrale [Bastow et al., 2008]. Cette hypothèse est renforcée par la diminution de la longueur des os longs qui, en plus d'être observée dans les souris déficientes pour HYAL1, a aussi été documentée chez les souris déficientes pour HYAL2 ou pour KIAA1199, une protéine nouvellement décrite impliquée dans la dépolymérisation de l'HA [Shimoda et al., 2017; Higuchi et al., 2017].

HYAL1 pourrait également participer à l'ossification endochondrale à travers l'action des chondroclastes, des cellules assimilées aux ostéoclastes qui en diffèrent principalement par l'absence d'une bordure en brosse [Knowles et al., 2012]. L'identité exacte des chondroclastes est controversée puisque, selon les auteurs, ces cellules se formeraient au contact soit du cartilage non minéralisé soit du cartilage calcifié, soit encore à la surface de ces deux matrices [Ota et al., 2009; Wlodarsky et al., 2014]. D'autres études considèrent que les chondroclastes apparaissent en conditions pathologiques mais il a également été suggéré qu'il s'agisse en fait d'ostéoclastes qui, au contact du cartilage, ne forment pas de bordure en brosse [Knowles et al., 2012; Odgren et al., 2016]. Quel que soit le nom attribué à ces cellules, chondroclastes ou ostéoclastes, elles semblent impliquées dans la dégradation partielle du cartilage au cours de l'ossification endochondrale, avant que la matrice osseuse ne soit formée. Chez les souris *Hyal1* ^{-/-}, l'absence d'HYAL1 dans les chondroclastes pourrait dès lors perturber cette dégradation et, de ce fait, la formation de la matrice osseuse par les ostéoblastes amenés par les vaisseaux sanguins qui s'infiltreraient dans les espaces digérés.

4. Conclusion

L'ensemble des données générées dans le cadre de ce travail a permis d'apporter de nouveaux éléments dans la caractérisation d'HYAL1 ainsi que dans la description de sa fonction. Dans un premier temps, nous avons pu apporter la preuve de la présence d'HYAL1 dans les lysosomes et proposer un mécanisme de ciblage de l'enzyme vers cet organite. La réalisation de zymographies a révélé que l'utilisation de conditions natives était nécessaire à la détection de l'activité des deux formes d'HYAL1. L'analyse de l'activité de l'hyaluronidase suggère également l'existence d'interactions non covalentes non identifiées qui pourraient être explorées ultérieurement.

Dans un second temps, ce projet nous a permis de mettre en évidence une expression importante d'HYAL1 dans les ostéoclastes en comparaison avec leurs cellules précurseurs. Parmi les hydrolases acides lysosomales, deux enzymes, TRAP et la cathepsine K, présentent également une forte surexpression au cours de l'ostéoclastogenèse. Ces deux hydrolases jouant un rôle important dans le fonctionnement des ostéoclastes, la découverte de la surexpression d'HYAL1 suggère une fonction inédite de l'hyaluronidase dans le remodelage osseux.

La potentielle fonction d'HYAL1 dans ce processus a été investiguée par une analyse du phénotype osseux de souris déficientes pour HYAL1 qui a révélé une réduction significative de la densité osseuse de ces rongeurs à l'âge d'un an. Cette ostéopénie peut, au moins en partie, être attribuée à une augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes ainsi qu'à une diminution de la production du collagène de type I, un des constituants majeurs de la matrice osseuse. Dans le futur, il serait intéressant d'investiguer les mécanismes amenant à l'augmentation du nombre et de l'activité des ostéoclastes. Nous pourrions par exemple tester les hypothèses que nous avons émises et qui proposent que l'HA puisse influencer le rapport entre le RANKL et l'OPG, le processus d'ostéoclastogenèse, l'adhésion des ostéoclastes ou encore leur détachement de la matrice osseuse. Nous pourrions également explorer l'activité des ostéoblastes et le processus de minéralisation chez les souris déficientes pour HYAL1. Enfin, il serait aussi intéressant de déterminer si une dérégulation de l'activité d'HYAL1 contribue au développement de certaines pathologies du système squelettique, et si cibler cette enzyme pourrait conférer un avantage thérapeutique. Bien que de nombreux liens entre l'HA et la physiologie de l'os ont été mis en évidence au cours des années, sa fonction précise n'est pas encore bien comprise. Nous espérons dès lors que les résultats obtenus au cours de ce projet apporteront une nouvelle lumière sur les rôles de l'HA et de son catabolisme dans le remodelage osseux.

BIBLIOGRAPHIE

- Achord DT, Brot FE, Bell CE, Sly WS. Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vitro uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell*. 1978;15(1):269-78.
- Adams JR, Sander G, Byers S. Expression of hyaluronan synthases and hyaluronidases in the MG63 osteoblast cell line. *Matrix Biol*. 2006;25(1):40-6.
- Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(11):2430-7.
- Akkawi I, Zmerly H. Osteoporosis: Current Concepts. *Joints*. 2018;6(2):122-7.
- André B, Duterme C, Van Moer K, Mertens-Strijthagen J, Jadot M, Flamion B. Hyal2 is a glycosylphosphatidylinositol-anchored, lipid raft-associated hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;411(1):175-9.
- Appelmans F, Wattiaux R, de Duve C. Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem J*. 1955;59(3):438-45.
- Appelqvist H, Waster P, Kagedal K, Ollinger K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(4):214-26.
- Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*. 1999;190(12):1741-54.
- Ariyoshi W, Takahashi T, Kanno T, Ichimiya H, Takano H, Koseki T, et al. Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18967-72.
- Ariyoshi W, Okinaga T, Knudson CB, Knudson W, Nishihara T. High molecular weight hyaluronic acid regulates osteoclast formation by inhibiting receptor activator of NF-kappaB ligand through Rho kinase. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(1):111-20.
- Aronson NN, Jr., Davidson EA. Lysosomal Hyaluronidase. *J Biol Chem*. 1965;240:PC3222-4.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990;61(7):1303-13.
- Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):745-50.
- Atmuri V, Martin DC, Hemming R, Gutsol A, Byers S, Sahebjam S, et al. Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation. *Matrix Biol*. 2008;27(8):653-60.
- Aubin JE, Heersche JN, Merrilees MJ, Sodek J. Isolation of bone cell clones with differences in growth, hormone responses, and extracellular matrix production. *J Cell Biol*. 1982;92(2):452-61.
- Baeva LF, Lyle DB, Rios M, Langone JJ, Lightfoote MM. Different molecular weight hyaluronic acid effects on human macrophage interleukin 1beta production. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(2):305-14.
- Baggenstoss BA, Harris EN, Washburn JL, Medina AP, Nguyen L, Weigel PH. Hyaluronan synthase control of synthesis rate and hyaluronan product size are independent functions differentially affected by mutations in a conserved tandem B-X7-B motif. *Glycobiology*. 2017;27(2):154-64.
- Baranova NS, Nileback E, Haller FM, Briggs DC, Svedhem S, Day AJ, et al. The inflammation-associated protein TSG-6 cross-links hyaluronan via hyaluronan-induced TSG-6 oligomers. *J Biol Chem*. 2011;286(29):25675-86.
- Baron R. Anatomy and Ultrastructure of Bone - Histogenesis, Growth and Remodeling. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
- Bastow ER, Byers S, Golub SB, Clarkin CE, Pitsillides AA, Fosang AJ. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(3):395-413.
- Bastow ER, Last K, Golub S, Stow JL, Stanley AC, Fosang AJ. Evidence for lysosomal exocytosis and release of aggrecan-degrading hydrolases from hypertrophic chondrocytes, in vitro and in vivo. *Biol Open*. 2012;1(4):318-28.
- Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery*. 2012;30(2):47-53.

- Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):25-34.
- Bissig C, Hurbain I, Raposo G, van Niel G. PIKfyve activity regulates reformation of terminal storage lysosomes from endolysosomes. *Traffic.* 2017;18(11):747-57.
- Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(2):122-31.
- Bonifacino JS, Traub LM. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:395-447.
- Bonucci E. Bone mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:100-28.
- Boonen M, van Meel E, Oorschot V, Klumperman J, Kornfeld S. Vacuolization of mucopolipidosis type II mouse exocrine gland cells represents accumulation of autolysosomes. *Mol Biol Cell.* 2011;22(8):1135-47.
- Boonen M, Staudt C, Gilis F, Oorschot V, Klumperman J, Jadot M. Cathepsin D and its newly identified transport receptor SEZ6L2 can modulate neurite outgrowth. *J Cell Sci.* 2016;129(3):557-68.
- Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone.* 2003;32(2):136-41.
- Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem.* 1996;271(21):12517-24.
- Bottini M, Mebarek S, Anderson KL, Strzelecka-Kilizek A, Bozycki L, Simao AMS, et al. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018;1862(3):532-46.
- Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 2004;279(26):26991-7007.
- Bourguignon V, Flamion B. Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover. *FASEB J.* 2016;30(6):2108-14.
- Braulke T, Bonifacino JS. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):605-14.
- Bright NA, Davis LJ, Luzio JP. Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity. *Curr Biol.* 2016;26(17):2233-45.
- Brömme D, Okamoto K, Wang BB, Biroc S. Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 1996;271(4):2126-32.
- Burkhardt JK, Hester S, Argon Y. Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(18):7128-32.
- Campo GM, Avenoso A, Nastasi G, Micali A, Prestipino V, Vaccaro M, et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(9):1170-81.
- Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Prestipino V, Scuruchi M, Nastasi G, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis reduced inflammatory response in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. *Arch Biochem Biophys.* 2012;518(1):42-52.
- Cantagrel V, Lefebvre DJ, Ng BG, Guan Z, Silhavy JL, Bielas SL, et al. SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell.* 2010;142(2):203-17.
- Canuel M, Korkidakis A, Konnyu K, Morales CR. Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;373(2):292-7.
- Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, Boudignon B, Burghardt A, Kurimoto P, et al. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *J Bone Miner Res.* 2005;20(1):30-40.
- Chabadel A, Banon-Rodriguez I, Cluet D, Rudkin BB, Wehrle-Haller B, Genot E, et al. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol Biol Cell.* 2007;18(12):4899-910.
- Chang EJ, Kim HJ, Ha J, Kim HJ, Ryu J, Park KH, et al. Hyaluronan inhibits osteoclast differentiation via Toll-like receptor 4. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 1):166-76.

- Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry*. 2007;46(23):6911-20.
- Cherqui S, Kalatzis V, Trugnan G, Antignac C. The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J Biol Chem*. 2001;276(16):13314-21.
- Chowdhury B, Hemming R, Hombach-Klonisch S, Flamion B, Triggs-Raine B. Murine hyaluronidase 2 deficiency results in extracellular hyaluronan accumulation and severe cardiopulmonary dysfunction. *J Biol Chem*. 2013;288(1):520-8.
- Chowdhury B, Hemming R, Faiyaz S, Triggs-Raine B. Hyaluronidase 2 (HYAL2) is expressed in endothelial cells, as well as some specialized epithelial cells, and is required for normal hyaluronan catabolism. *Histochem Cell Biol*. 2016;145(1):53-66.
- Christensen EI, Zhou Q, Sorensen SS, Rasmussen AK, Jacobsen C, Feldt-Rasmussen U, et al. Distribution of alpha-galactosidase A in normal human kidney and renal accumulation and distribution of recombinant alpha-galactosidase A in Fabry mice. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(3):698-706.
- Cimaz R, La Torre F. Mucopolysaccharidoses. *Curr Rheumatol Rep*. 2014;16(1):389.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003;422(6927):37-44.
- Coutinho MF, Prata MJ, Alves S. Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol Genet Metab*. 2012;105(4):542-50.
- Coutinho MF, Matos L, Alves S. From bedside to cell biology: a century of history on lysosomal dysfunction. *Gene*. 2015;555(1):50-8.
- Cowman MK, Schmidt TA, Raghavan P, Stecco A. Viscoelastic Properties of Hyaluronan in Physiological Conditions. *F1000Res*. 2015;4:622.
- Csóka AB, Frost GI, Wong T, Stern R. Purification and microsequencing of hyaluronidase isozymes from human urine. *FEBS Lett*. 1997;417(3):307-10.
- Csóka AB, Frost GI, Heng HH, Scherer SW, Mohapatra G, Stern R. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics*. 1998;48(1):63-70.
- Csóka AB, Scherer SW, Stern R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics*. 1999;60(3):356-61.
- Csóka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol*. 2001;20(8):499-508.
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 2004;305(5688):1292-5.
- Cuozzo JW, Sahagian GG. Lysine is a common determinant for mannose phosphorylation of lysosomal proteins. *J Biol Chem*. 1994;269(20):14490-6.
- Czapalla C, Mansukoski H, Riedl T, Thiel D, Krause E, Hoflack B. Proteomic analysis of lysosomal acid hydrolases secreted by osteoclasts: implications for lytic enzyme transport and bone metabolism. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5(1):134-43.
- Dahms NM, Olson LJ, Kim JJ. Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors. *Glycobiology*. 2008;18(9):664-78.
- Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol*. 2005;26(12):637-43.
- DeCourcy K, Storrie B. Osmotic swelling of endocytic compartments induced by internalized sucrose is restricted to mature lysosomes in cultured mammalian cells. *Exp Cell Res*. 1991;192(1):52-60.
- de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*. 1955;60(4):604-17.
- de Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*. 1966;28:435-92.
- Delaisse JM. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep*. 2014;3:561.

- Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012;4:2302-21.
- Demirel O, Bangert I, Tampe R, Abele R. Tuning the cellular trafficking of the lysosomal peptide transporter TAPL by its N-terminal domain. *Traffic*. 2010;11(3):383-93.
- De Saiegui M, Pigman W. The existence of an acid-active hyaluronidase in serum. *Arch Biochem Biophys*. 1967;120(1):60-7.
- DeSelm CJ, Miller BC, Zou W, Beatty WL, van Meel E, Takahata Y, et al. Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. *Dev Cell*. 2011;21(5):966-74.
- Destaing O, Saltel F, Geminard JC, Jurdic P, Bard F. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*. 2003;14(2):407-16.
- de Vries TJ, Schoenmaker T, Beertsen W, van der Neut R, Everts V. Effect of CD44 deficiency on in vitro and in vivo osteoclast formation. *J Cell Biochem*. 2005;94(5):954-66.
- Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater*. 2014;10(4):1558-70.
- Dickson IR, Roughley PJ. The effects of vitamin D deficiency on proteoglycan and hyaluronate constituents of chick bone. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1181(1):15-22.
- Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):349-64.
- Divieti Pajevic P, Krause DS. Osteocyte regulation of bone and blood. *Bone*. 2019;119:13-8.
- Dole NS. Genetic Determinants of Skeletal Diseases: Role of microRNAs. PhD [dissertation]. Mansfield: University of Connecticut; 2015.
- Ecarot-Charrier B, Broekhuysse H. Proteoglycans synthesized by cultured mouse osteoblasts. *J Biol Chem*. 1987;262(11):5345-51.
- Edjekouane L, Benhadjeba S, Jangal M, Fleury H, Gevry N, Carmona E, et al. Proximal and distal regulation of the HYAL1 gene cluster by the estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(47):77276-90.
- Elmonem MA, Veys KR, Soliman NA, van Dyck M, van den Heuvel LP, Levtschenko E. Cystinosis: a review. *Orphanet J Rare Dis*. 2016;11:47.
- Elvevold K, Simon-Santamaria J, Hasvold H, McCourt P, Smedsrod B, Sorensen KK. Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity. *Hepatology*. 2008;48(6):2007-15.
- Emons J, Chagin AS, Savendahl L, Karperien M, Wit JM. Mechanisms of growth plate maturation and epiphyseal fusion. *Horm Res Paediatr*. 2011;75(6):383-91.
- Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*. 2003;13(3):137-45.
- Everts V, Delaisse JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res*. 2002;17(1):77-90.
- Falconi D, Aubin JE. LIF inhibits osteoblast differentiation at least in part by regulation of HAS2 and its product hyaluronan. *J Bone Miner Res*. 2007;22(8):1289-300.
- Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
- Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis*. 2017;2(1-2):1-71.
- Ferron M, Settembre C, Shimazu J, Lacombe J, Kato S, Rawlings DJ, et al. A RANKL-PKCbeta-TFEB signaling cascade is necessary for lysosomal biogenesis in osteoclasts. *Genes Dev*. 2013;27(8):955-69.
- Fischer-Szafarz B. Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. *Anal Biochem*. 1984;143(1):76-81.
- Fischer-Szafarz B, Czartoryska B, Tyłki-Szymanska A. Serum hyaluronidase aberrations in metabolic and morphogenetic disorders. *Glycoconj J*. 2005;22(7-9):395-400.

- Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997;242(1):27-33.
- Frisch BJ, Ashton JM, Xing L, Becker MW, Jordan CT, Calvi LM. Functional inhibition of osteoblastic cells in an in vivo mouse model of myeloid leukemia. *Blood.* 2012;119(2):540-50.
- Frost GI, Csóka AB, Wong T, Stern R. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(1):10-5.
- Fujiwara T, Ye S, Castro-Gomes T, Winchell CG, Andrews NW, Voth DE, et al. PLEKHM1/DEF8/RAB7 complex regulates lysosome positioning and bone homeostasis. *JCI Insight.* 2016;1(17):e86330.
- Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF α potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology.* 2002;143(3):1108-18.
- Gasingirwa MC, Thirion J, Costa C, Flamion B, Lobel P, Jadot M. A method to assess the lysosomal residence of proteins in cultured cells. *Anal Biochem.* 2008;374(1):31-40.
- Gasingirwa MC, Thirion J, Mertens-Strijthagen J, Wattiaux-De Coninck S, Flamion B, Wattiaux R, et al. Endocytosis of hyaluronidase-1 by the liver. *Biochem J.* 2010;430(2):305-13.
- Gatto F, Rossi B, Tarallo A, Polishchuk E, Polishchuk R, Carrella A, et al. AAV-mediated transcription factor EB (TFEB) gene delivery ameliorates muscle pathology and function in the murine model of Pompe Disease. *Sci Rep.* 2017;7(1):15089.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327(5966):656-61.
- Genasetti A, Vigetti D, Viola M, Karousou E, Moretto P, Rizzi M, et al. Hyaluronan and human endothelial cell behavior. *Connect Tissue Res.* 2008;49(3):120-3.
- Genever PG, Dickson IR. Influence of vitamin D status on hyaluronan localization in bone. *Bone.* 1996;18(5):429-35.
- Georgess D, Machuca-Gayet I, Blangy A, Jurdic P. Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adh Migr.* 2014;8(3):191-204.
- Ghosh P, Kornfeld S. The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1. *Arch Biochem Biophys.* 2004;426(2):225-30.
- Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 2007;80(21):1921-43.
- Goto Y, Niwa Y, Suzuki T, Uematsu S, Dohmae N, Simizu S. N-glycosylation is required for secretion and enzymatic activity of human hyaluronidase1. *FEBS Open Bio.* 2014;4:554-9. a.
- Goto Y, Niwa Y, Suzuki T, Dohmae N, Umezawa K, Simizu S. C-mannosylation of human hyaluronidase 1: possible roles for secretion and enzymatic activity. *Int J Oncol.* 2014;45(1):344-50. b.
- Graham JM. Isolation of lysosomes from tissues and cells by differential and density gradient centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001;Chapter 3:Unit 3 6.
- Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. The Cl⁻/H⁺ antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature.* 2008;453(7196):788-92.
- Guntenhöner MW, Pogrel MA, Stern R. A substrate-gel assay for hyaluronidase activity. *Matrix.* 1992;12(5):388-96.
- Guntur AR, Rosen CJ. Bone as an endocrine organ. *Endocr Pract.* 2012;18(5):758-62.
- Gushulak L, Hemming R, Martin D, Seyrantepe V, Pshzhetsky A, Triggs-Raine B. Hyaluronidase 1 and beta-hexosaminidase have redundant functions in hyaluronan and chondroitin sulfate degradation. *J Biol Chem.* 2012;287(20):16689-97.
- Hamilton SR, Fard SF, Paiwand FF, Tolg C, Veiseh M, Wang C, et al. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2007;282(22):16667-80.
- Harada H, Takahashi M. CD44-dependent intracellular and extracellular catabolism of hyaluronic acid by hyaluronidase-1 and -2. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5597-607.

- Harris EN, Kyosseva SV, Weigel JA, Weigel PH. Expression, processing, and glycosaminoglycan binding activity of the recombinant human 315-kDa hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE). *J Biol Chem.* 2007;282(5):2785-97.
- Hascall VC, Majors AK, De La Motte CA, Evanko SP, Wang A, Drazba JA, et al. Intracellular hyaluronan: a new frontier for inflammation? *Biochim Biophys Acta.* 2004;1673(1-2):3-12.
- Hascall V, Esko JD. Hyaluronan. In: nd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, et al., editors. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor (NY)2009.
- Hasegawa T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):289-304.
- Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development.* 1996;122(10):3151-62.
- Heldin P. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(8):967-73.
- Hemmatian H, Bakker AD, Klein-Nulend J, van Lenthe GH. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(5):401-11.
- Hemming R, Martin DC, Slominski E, Nagy JI, Halayko AJ, Pind S, et al. Mouse Hyal3 encodes a 45- to 56-kDa glycoprotein whose overexpression increases hyaluronidase 1 activity in cultured cells. *Glycobiology.* 2008;18(4):280-9.
- Higuchi Y, Nishida Y, Kozawa E, Zhuo L, Arai E, Hamada S, et al. Conditional knockdown of hyaluronidase 2 in articular cartilage stimulates osteoarthritic progression in a mice model. *Sci Rep.* 2017;7(1):7028.
- Hinton PV, Rackard SM, Kennedy OD. In Vivo Osteocyte Mechanotransduction: Recent Developments and Future Directions. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(6):746-53.
- Hipolito VEB, Ospina-Escobar E, Botelho RJ. Lysosome remodelling and adaptation during phagocyte activation. *Cell Microbiol.* 2018;20(4).
- Hirst J, Itzhak DN, Antrobus R, Borner GHH, Robinson MS. Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval. *PLoS Biol.* 2018;16(1):e2004411.
- Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* 1999;25(3):255-9.
- Honing S, Sosa M, Hille-Rehfeld A, von Figura K. The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor contains multiple binding sites for clathrin adaptors. *J Biol Chem.* 1997;272(32):19884-90.
- Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):3540-5.
- Hua Q, Knudson CB, Knudson W. Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Sci.* 1993;106 (Pt 1):365-75.
- Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, et al. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66(4):880-4.
- Hubbard AL, Wilson G, Ashwell G, Stukenbrok H. An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. I. Distribution of 125I-ligands among the liver cell types. *J Cell Biol.* 1979;83(1):47-64.
- Imundo L, Leduc CA, Guha S, Brown M, Perino G, Gushulak L, et al. A complete deficiency of Hyaluronoglucosaminidase 1 (HYAL1) presenting as familial juvenile idiopathic arthritis. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(5):1013-22.
- Ishidoh K, Kominami E. Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol Chem.* 2002;383(12):1827-31.
- Itano N, Sawai T, Yoshida M, Lenas P, Yamada Y, Imagawa M, et al. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem.* 1999;274(35):25085-92.

- Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, et al. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3609-14. a.
- Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*. 2002;54(4):195-9. b.
- Jackson DG. Hyaluronan in the lymphatics: The key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking. *Matrix Biol*. 2018.
- Jadin L, Wu X, Ding H, Frost GI, Onclinx C, Triggs-Raine B, et al. Skeletal and hematological anomalies in HYAL2-deficient mice: a second type of mucopolysaccharidosis IX? *FASEB J*. 2008;22(12):4316-26.
- Jadin L, Bookbinder LH, Frost GI. A comprehensive model of hyaluronan turnover in the mouse. *Matrix Biol*. 2012;31(2):81-9.
- Jadot M, Canfield WM, Gregory W, Kornfeld S. Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J Biol Chem*. 1992;267(16):11069-77.
- Jadot M, Boonen M, Thirion J, Wang N, Xing J, Zhao C, et al. Accounting for Protein Subcellular Localization: A Compartmental Map of the Rat Liver Proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(2):194-212.
- Jeong H, Then F, Melia TJ, Jr., Mazzulli JR, Cui L, Savas JN, et al. Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell*. 2009;137(1):60-72.
- Jimi E, Nakamura I, Ikebe T, Akiyama S, Takahashi N, Suda T. Activation of NF-kappaB is involved in the survival of osteoclasts promoted by interleukin-1. *J Biol Chem*. 1998;273(15):8799-805.
- Jimi E, Nakamura I, Duong LT, Ikebe T, Takahashi N, Rodan GA, et al. Interleukin 1 induces multinucleation and bone-resorbing activity of osteoclasts in the absence of osteoblasts/stromal cells. *Exp Cell Res*. 1999;247(1):84-93.
- Johnson KF, Kornfeld S. A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function. *J Biol Chem*. 1992;267(24):17110-5.
- Kajja H, Alatalo SL, Halleen JM, Lindqvist Y, Schneider G, Vaananen HK, et al. Phosphatase and oxygen radical-generating activities of mammalian purple acid phosphatase are functionally independent. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(1):128-32.
- Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(5):313-26.
- Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med*. 1997;186(4):489-95.
- Kaneiwa T, Mizumoto S, Sugahara K, Yamada S. Identification of human hyaluronidase-4 as a novel chondroitin sulfate hydrolase that preferentially cleaves the galactosaminidic linkage in the trisulfated tetrasaccharide sequence. *Glycobiology*. 2010;20(3):300-9.
- Kaplan A, Achord DT, Sly WS. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(5):2026-30.
- Karsdal MA, Neutzsky-Wulff AV, Dziegiel MH, Christiansen C, Henriksen K. Osteoclasts secrete non-bone derived signals that induce bone formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(2):483-8.
- Kathagen N, Prehm P. Regulation of intracellular pH by glycosaminoglycans. *J Cell Physiol*. 2013;228(10):2071-5.
- Kawaguchi K, Okamoto T, Morita M, Imanaka T. Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. *Sci Rep*. 2016;6:30183.
- Kawano M, Ariyoshi W, Iwanaga K, Okinaga T, Habu M, Yoshioka I, et al. Mechanism involved in enhancement of osteoblast differentiation by hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405(4):575-80.
- Khaldoyanidi S, Moll J, Karakhanova S, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: two different receptors trigger the release of interleukin-1beta and interleukin-6 from bone marrow macrophages. *Blood*. 1999;94(3):940-9.
- Kim E, Baba D, Kimura M, Yamashita M, Kashiwabara S, Baba T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18028-33.

- Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, et al. The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. *J Immunol.* 2009;183(3):1862-70.
- Kim JH, Kim N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab.* 2014;21(4):233-41.
- Kiss K, Kucsma N, Brozik A, Tusnady GE, Bergam P, van Niel G, et al. Role of the N-terminal transmembrane domain in the endo-lysosomal targeting and function of the human ABCB6 protein. *Biochem J.* 2015;467(1):127-39.
- Klumperman J, Raposo G. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016857.
- Knowles HJ, Moskovsky L, Thompson MS, Grunhen J, Cheng X, Kashima TG, et al. Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption. *Virchows Arch.* 2012;461(2):205-10.
- Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000;191(2):275-86.
- Kornfeld S, Sly WS. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, editors. *I cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy : disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization.* McGraw-Hill (NY)2001. p. 3469-82.
- Koshimizu H, Kim T, Cawley NX, Loh YP. Reprint of: Chromogranin A: a new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regul Pept.* 2010;165(1):95-101.
- Kramer PR, Kramer SF, Guan G. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum.* 2004;50(6):1967-75.
- Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 2003;32(1):1-7.
- Lacombe J, Karsenty G, Ferron M. Regulation of lysosome biogenesis and functions in osteoclasts. *Cell Cycle.* 2013;12(17):2744-52.
- Lafourcade C, Sobo K, Kieffer-Jaquinod S, Garin J, van der Goot FG. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One.* 2008;3(7):e2758.
- Lajeunesse D, Delalandre A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Hyaluronic acid reverses the abnormal synthetic activity of human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Bone.* 2003;33(4):703-10.
- Lamming DW, Bar-Peled L. Lysosome: The metabolic signaling hub. *Traffic.* 2019;20(1):27-38.
- Laurent UB, Dahl LB, Reed RK. Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver. *Exp Physiol.* 1991;76(5):695-703.
- Laurent-Matha V, Derocq D, Prebois C, Katunuma N, Liaudet-Coopman E. Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *J Biochem.* 2006;139(3):363-71.
- Lee CW, Seo JY, Choi JW, Lee J, Park JW, Lee JY, et al. Potential anti-osteoporotic activity of low-molecular weight hyaluronan by attenuation of osteoclast cell differentiation and function in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;449(4):438-43.
- Lennartz MR, Wileman TE, Stahl PD. Isolation and characterization of a mannose-specific endocytosis receptor from rabbit alveolar macrophages. *Biochem J.* 1987;245(3):705-11.
- Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2--less active, but more versatile? *Matrix Biol.* 2001;20(8):509-14.
- Lesley J, Kincade PW, Hyman R. Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur J Immunol.* 1993;23(8):1902-9.
- Lesley J, English N, Perschl A, Gregoroff J, Hyman R. Variant cell lines selected for alterations in the function of the hyaluronan receptor CD44 show differences in glycosylation. *J Exp Med.* 1995;182(2):431-7.
- Li M, Amizuka N, Takeuchi K, Freitas PH, Kawano Y, Hoshino M, et al. Histochemical evidence of osteoclastic degradation of extracellular matrix in osteolytic metastasis originating from human lung small carcinoma (SBC-5) cells. *Microsc Res Tech.* 2006;69(2):73-83.
- Li Y, Zhong G, Sun W, Zhao C, Zhang P, Song J, et al. CD44 deficiency inhibits unloading-induced cortical bone loss through downregulation of osteoclast activity. *Sci Rep.* 2015;5:16124.

- Li W, Nie T, Xu H, Yang J, Yang Q, Mao Z. Chaperone-mediated autophagy: Advances from bench to bedside. *Neurobiol Dis.* 2018.
- Liapis A, Chen FW, Davies JP, Wang R, Ioannou YA. MLN64 transport to the late endosome is regulated by binding to 14-3-3 via a non-canonical binding site. *PLoS One.* 2012;7(4):e34424.
- Linehan SA, Martinez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S. Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med.* 1999;189(12):1961-72.
- Little L, Alcouloumre M, Drotar AM, Herman S, Robertson R, Yeh RY, et al. Properties of N-acetylglucosamine 1-phosphotransferase from human lymphoblasts. *Biochem J.* 1987;248(1):151-9.
- Litwiniuk M, Krejner A, Speyrer MS, Gauto AR, Grzela T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds.* 2016;28(3):78-88.
- Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, et al. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med.* 2008;14(11):1247-55.
- Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:235060.
- Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, et al. Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression. identification of HYAL-1 promoter. *J Biol Chem.* 2008;283(43):29215-27.
- Luben RA, Goggins JF, Raisz LG. Stimulation by parathyroid hormone of bone hyaluronate synthesis in organ culture. *Endocrinology.* 1974;94(3):737-45.
- Luben RA, Wong GL, Cohn DV. Biochemical characterization with parathormone and calcitonin of isolated bone cells: provisional identification of osteoclasts and osteoblasts. *Endocrinology.* 1976;99(2):526-34.
- Luo J, Jiang L, Yang H, Song BL. Routes and mechanisms of post-endosomal cholesterol trafficking: A story that never ends. *Traffic.* 2017;18(4):209-17.
- Luzio JP, Hackmann Y, Dieckmann NM, Griffiths GM. The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(9):a016840.
- Markmann S, Thelen M, Cornils K, Schweizer M, Brocke-Ahmadinejad N, Willnow T, et al. Lrp1/LDL Receptor Play Critical Roles in Mannose 6-Phosphate-Independent Lysosomal Enzyme Targeting. *Traffic.* 2015;16(7):743-59.
- Martin DC, Atmuri V, Hemming RJ, Farley J, Mort JS, Byers S, et al. A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2008;17(13):1904-15.
- Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;250(1-2):114-21.
- Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol.* 2012;92(6):1177-86.
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci.* 2010;13(5):567-76.
- Mathews S, Mathew SA, Gupta PK, Bhonde R, Totey S. Glycosaminoglycans enhance osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014;8(2):143-52.
- Matsui W, Kirchhausen T. Stabilization of clathrin coats by the core of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Biochemistry.* 1990;29(48):10791-8.
- Maxwell CA, McCarthy J, Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 7):925-32.
- McAtee CO, Berkebile AR, Elowsky CG, Fangman T, Barycki JJ, Wahl JK, 3rd, et al. Hyaluronidase Hyal1 Increases Tumor Cell Proliferation and Motility through Accelerated Vesicle Trafficking. *J Biol Chem.* 2015;290(21):13144-56.
- Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, et al. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell.* 2011;21(3):421-30.
- Mesaki K, Tanabe K, Obayashi M, Oe N, Takei K. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One.* 2011;6(5):e19764.

- Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 1934;107:629-634.
- Midura RJ, Evanko SP, Hascall VC. Parathyroid hormone stimulates hyaluronan synthesis in an osteoblast-like cell line. *J Biol Chem.* 1994;269(18):13200-6.
- Midura RJ, Su X, Morcuende JA, Tammi M, Tammi R. Parathyroid hormone rapidly stimulates hyaluronan synthesis by periosteal osteoblasts in the tibial diaphysis of the growing rat. *J Biol Chem.* 2003;278(51):51462-8.
- Miller A, Schafer J, Upchurch C, Spooner E, Huynh J, Hernandez S, et al. Mucopolipidosis type IV protein TRPML1-dependent lysosome formation. *Traffic.* 2015;16(3):284-97.
- Mindell JA. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:69-86.
- Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front Immunol.* 2015;6:201.
- Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, Benard M, Tanguy Y, Turquier V, et al. Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem.* 2009;284(18):12420-31.
- Mora JC, Przkora R, Cruz-Almeida Y. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *J Pain Res.* 2018;11:2189-96.
- Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, et al. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res.* 2001;61(22):8079-84.
- Muggenthaler MM, Chowdhury B, Hasan SN, Cross HE, Mark B, Harlalka GV, et al. Mutations in *HYAL2*, Encoding Hyaluronidase 2, Cause a Syndrome of Orofacial Clefing and Cor Triatriatum Sinister in Humans and Mice. *PLoS Genet.* 2017;13(1):e1006470.
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-4. a.
- Nakashima T, Takayanagi H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2011;1240:E13-8. b.
- Nakatsu F, Ohno H. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct.* 2003;28(5):419-29.
- Natowicz MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, et al. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N Engl J Med.* 1996;335(14):1029-33. a.
- Natowicz MR, Wang Y. Plasma hyaluronidase activity in mucopolipidoses II and III: marked differences from other lysosomal enzymes. *Am J Med Genet.* 1996;65(3):209-12.
- Nesbitt SA, Horton MA. Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. *Science.* 1997;276(5310):266-9. b.
- Ni X, Morales CR. The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor. *Traffic.* 2006;7(7):889-902.
- Nightingale TD, Frayne ME, Clasper S, Banerji S, Jackson DG. A mechanism of sialylation functionally silences the hyaluronan receptor LYVE-1 in lymphatic endothelium. *J Biol Chem.* 2009;284(6):3935-45.
- Obermüller S, Kiecke C, von Figura K, Honing S. The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 1):185-94.
- Odgren PR, Witwicka H, Reyes-Gutierrez P. The cast of clasts: catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts. *Connect Tissue Res.* 2016;57(3):161-74.
- Onclinx C, Dogne S, Jadin L, Andris F, Grandfils C, Jouret F, et al. Deficiency in mouse hyaluronidase 2: a new mechanism of chronic thrombotic microangiopathy. *Haematologica.* 2015;100(8):1023-30.
- Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):325-41.
- Oohira A, Nogami H. Elevated accumulation of hyaluronate in the tubular bones of osteogenesis imperfecta. *Bone.* 1989;10(6):409-13.

- Orlow SJ. Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol.* 1995;105(1):3-7.
- Ota N, Takaishi H, Kosaki N, Takito J, Yoda M, Tohmonda T, et al. Accelerated cartilage resorption by chondroclasts during bone fracture healing in osteoprotegerin-deficient mice. *Endocrinology.* 2009;150(11):4823-34.
- Owada M, Neufeld EF. Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose 6-phosphate recognition? Evidence from I-cell disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;105(3):814-20.
- Pacheco-Costa R, Hassan I, Reginato RD, Davis HM, Bruzzaniti A, Allen MR, et al. High bone mass in mice lacking Cx37 because of defective osteoclast differentiation. *J Biol Chem.* 2014;289(12):8508-20.
- Palagano E, Menale C, Sobacchi C, Villa A. Genetics of Osteopetrosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2018;16(1):13-25.
- Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, et al. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet.* 2011;20(19):3852-66.
- Palokangas H, Mulari M, Vaananen HK. Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 15):1767-80.
- Pandey KN. Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:5339-60.
- Pandey MS, Weigel PH. Hyaluronic acid receptor for endocytosis (HARE)-mediated endocytosis of hyaluronan, heparin, dermatan sulfate, and acetylated low density lipoprotein (AcLDL), but not chondroitin sulfate types A, C, D, or E, activates NF-kappaB-regulated gene expression. *J Biol Chem.* 2014;289(3):1756-67.
- Pavasant P, Shizari T, Underhill CB. Hyaluronan contributes to the enlargement of hypertrophic lacunae in the growth plate. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 2):327-34.
- Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* 1991;173(5):1099-109.
- Pfeffer S, Dudek J, Zimmermann R, Forster F. Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1860(10):2122-9.
- Pillay CS, Elliott E, Dennison C. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J.* 2002;363(Pt 3):417-29.
- Pivetta E, Scapolan M, Wassermann B, Steffan A, Colombatti A, Spessotto P. Blood-derived human osteoclast resorption activity is impaired by Hyaluronan-CD44 engagement via a p38-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2011;226(3):769-79.
- Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. The cell biology of disease: lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol.* 2012;199(5):723-34.
- Platt FM, d'Azzo A, Davidson BL, Neufeld EF, Tiffit CJ. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4(1):27.
- Pols MS, van Meel E, Oorschot V, ten Brink C, Fukuda M, Swetha MG, et al. hVps41 and VAMP7 function in direct TGN to late endosome transport of lysosomal membrane proteins. *Nat Commun.* 2013;4:1361.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(1):33-45.
- Prehm P, Schumacher U. Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(7):1401-10.
- Prince CW, Navia JM. Glycosaminoglycan alterations in rat bone due to growth and fluorosis. *J Nutr.* 1983;113(8):1576-82.
- Pryor PR, Mullock BM, Bright NA, Gray SR, Luzio JP. The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J Cell Biol.* 2000;149(5):1053-62.
- Qian Y, Flanagan-Steet H, van Meel E, Steet R, Kornfeld SA. The DMAP interaction domain of UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase is a substrate recognition module. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(25):10246-51.
- Ralston SH. Bone structure and metabolism. *Medicine.* 2013;41(10):581-585.

- Rankin KS, Frankel D. Hyaluronan in cancer - from the naked mole rat to nanoparticle therapy. *Soft Matter*. 2016;12(17):3841-8.
- Raposo G, Tenza D, Murphy DM, Berson JF, Marks MS. Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol*. 2001;152(4):809-24.
- Reczek D, Schwake M, Schroder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, et al. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*. 2007;131(4):770-83.
- Reese KL, Aravindan RG, Griffiths GS, Shao M, Wang Y, Galileo DS, et al. Acidic hyaluronidase activity is present in mouse sperm and is reduced in the absence of SPAM1: evidence for a role for hyaluronidase 3 in mouse and human sperm. *Mol Reprod Dev*. 2010;77(9):759-72
- Reissig JL, Storminger JL, Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem*. 1955;217(2):959-66.
- Ruiz-Canada C, Kelleher DJ, Gilmore R. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell*. 2009;136(2):272-83.
- Rusmini P, Cortese K, Crippa V, Cristofani R, Cicardi ME, Ferrari V, et al. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy*. 2018:1-21.
- Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(23):13453-8.
- Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(9):623-35.
- Salbach J, Kliemt S, Rauner M, Rachner TD, Goettsch C, Kalkhof S, et al. The effect of the degree of sulfation of glycosaminoglycans on osteoclast function and signaling pathways. *Biomaterials*. 2012;33(33):8418-29.
- Salbach-Hirsch J, Kraemer J, Rauner M, Samsonov SA, Pisabarro MT, Moeller S, et al. The promotion of osteoclastogenesis by sulfated hyaluronan through interference with osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB ligand/osteoprotegerin complex formation. *Biomaterials*. 2013;34(31):7653-61.
- Salbach-Hirsch J, Ziegler N, Thiele S, Moeller S, Schnabelrauch M, Hintze V, et al. Sulfated glycosaminoglycans support osteoblast functions and concurrently suppress osteoclasts. *J Cell Biochem*. 2014;115(6):1101-11.
- Sandvig K, Kavaliauskiene S, Skotland T. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol*. 2018;150(2):107-18.
- Sapir-Koren R, Livshits G. Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS BoneKEy*. 2011;8(6):286-300.
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 2009;325(5939):473-7.
- Schneider DL. The acidification of rat liver lysosomes in vitro: a role for the membranous ATPase as a proton pump. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;87(2):559-65.
- Schröder BA, Wrocklage C, Hasilik A, Saftig P. The proteome of lysosomes. *Proteomics*. 2010;10(22):4053-76.
- Schwake M, Schröder B, Saftig P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic*. 2013;14(7):739-48.
- Screaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(24):12160-4.
- Sethi MK, Fanayan S. Mass Spectrometry-Based N-Glycomics of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):29278-304.
- Settembre C, Ballabio A. TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes. *Autophagy*. 2011;7(11):1379-81. a.
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science*. 2011;332(6036):1429-33. b.

- Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(5):283-96.
- Severson AR, Rothberg PF, Pratt RM, Goggins JF. Effect of parathyroid hormone on the incorporation of 3H-glucosamine into hyaluronic acid in bone organ culture. *Endocrinology.* 1973;92(4):1282-5.
- Shah KM, Stern MM, Stern AR, Pathak JL, Bravenboer N, Bakker AD. Osteocyte isolation and culture methods. *Bonekey Rep.* 2016;5:838.
- Shaheen R, Patel N, Shamseldin H, Alzahrani F, Al-Yamany R, A AL, et al. Accelerating matchmaking of novel dysmorphology syndromes through clinical and genomic characterization of a large cohort. *Genet Med.* 2016;18(7):686-95.
- Shimoda M, Yoshida H, Mizuno S, Hirozane T, Horiuchi K, Yoshino Y, et al. Hyaluronan-Binding Protein Involved in Hyaluronan Depolymerization Controls Endochondral Ossification through Hyaluronan Metabolism. *Am J Pathol.* 2017;187(5):1162-76.
- Shuttleworth TL, Wilson MD, Wicklow BA, Wilkins JA, Triggs-Raine BL. Characterization of the murine hyaluronidase gene region reveals complex organization and cotranscription of Hyal1 with downstream genes, Fus2 and Hyal3. *J Biol Chem.* 2002;277(25):23008-18.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2009;361(17):1651-61.
- Sims NA, Vrahnas C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:22-8.
- Sleat DE, Lackland H, Wang Y, Sohar I, Xiao G, Li H, et al. The human brain mannose 6-phosphate glycoproteome: a complex mixture composed of multiple isoforms of many soluble lysosomal proteins. *Proteomics.* 2005;5(6):1520-32.
- Sleat DE, Wang Y, Sohar I, Lackland H, Li Y, Li H, et al. Identification and validation of mannose 6-phosphate glycoproteins in human plasma reveal a wide range of lysosomal and non-lysosomal proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(10):1942-56.
- Spessotto P, Rossi FM, Degan M, Di Francia R, Perris R, Colombatti A, et al. Hyaluronan-CD44 interaction hampers migration of osteoclast-like cells by down-regulating MMP-9. *J Cell Biol.* 2002;158(6):1133-44.
- Spicer AP, Seldin MF, Olsen AS, Brown N, Wells DE, Doggett NA, et al. Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes. *Genomics.* 1997;41(3):493-7.
- Spicer AP, Tien JY. Hyaluronan and morphogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72(1):89-108.
- Stair-Nawy S, Csoka AB, Stern R. Hyaluronidase expression in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;266(1):268-73.
- Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. In: rd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, et al., editors. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor (NY)2015. p. 99-111.
- Staudt C, Puissant E, Boonen M. Subcellular Trafficking of Mammalian Lysosomal Proteins: An Extended View. *Int J Mol Sci.* 2016;18(1).
- Steenhuis P, Herder S, Gelis S, Braulke T, Storch S. Lysosomal targeting of the CLN7 membrane glycoprotein and transport via the plasma membrane require a dileucine motif. *Traffic.* 2010;11(7):987-1000.
- Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology.* 2003;13(12):105R-15R.
- Stern R, Kogan G, Jdrzejewski MJ, Soltes L. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnol Adv.* 2007;25(6):537-57.
- Stridh S, Palm F, Hansell P. Renal interstitial hyaluronan: functional aspects during normal and pathological conditions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012;302(11):R1235-49.
- Sun Y, Buki KG, Ettala O, Vaaraniemi JP, Vaananen HK. Possible role of direct Rac1-Rab7 interaction in ruffled border formation of osteoclasts. *J Biol Chem.* 2005;280(37):32356-61.
- Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CA, et al. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2002;17(8):1486-97.

- Tabas I, Kornfeld S. Biosynthetic intermediates of beta-glucuronidase contain high mannose oligosaccharides with blocked phosphate residues. *J Biol Chem.* 1980;255(14):6633-9.
- Takao T, Kumagai C, Hisakawa N, Matsumoto R, Hashimoto K. Effect of 17beta-estradiol on tumor necrosis factor-alpha-induced cytotoxicity in the human peripheral T lymphocytes. *J Endocrinol.* 2005;184(1):191-7.
- Takatsu H, Katoh Y, Shiba Y, Nakayama K. Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ADP-ribosylation factor-binding (GGA) proteins interact with acidic dileucine sequences within the cytoplasmic domains of sorting receptors through their Vps27p/Hrs/STAM (VHS) domains. *J Biol Chem.* 2001;276(30):28541-5.
- Tamasi JA, Vasilov A, Shimizu E, Benton N, Johnson J, Bitel CL, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is a mediator of the anabolic action of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res.* 2013;28(9):1975-86.
- Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Tamura T, Akatsu T, Stanley ER, et al. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest.* 1993;91(1):257-63.
- Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, et al. TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med.* 2009;15(7):757-65.
- Tanimoto K, Suzuki A, Ohno S, Honda K, Tanaka N, Doi T, et al. Hyaluronidase expression in cultured growth plate chondrocytes during differentiation. *Cell Tissue Res.* 2004;318(2):335-42.
- Taylor ME, Conary JT, Lennartz MR, Stahl PD, Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J Biol Chem.* 1990;265(21):12156-62.
- Taylor KR, Gallo RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006;20(1):9-22.
- Thayyullathil F, Rahman A, Pallichankandy S, Patel M, Galadari S. ROS-dependent prostate apoptosis response-4 (Par-4) up-regulation and ceramide generation are the prime signaling events associated with curcumin-induced autophagic cell death in human malignant glioma. *FEBS Open Bio.* 2014;4:763-76.
- Thouverey C, Strzelecka-Kiliszek A, Balcerzak M, Buchet R, Pikula S. Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *J Cell Biochem.* 2009;106(1):127-38.
- Torra A, Parent A, Cuadros T, Rodriguez-Galvan B, Ruiz-Bronchal E, Ballabio A, et al. Overexpression of TFEB Drives a Pleiotropic Neurotrophic Effect and Prevents Parkinson's Disease-Related Neurodegeneration. *Mol Ther.* 2018;26(6):1552-67.
- Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowicz MR. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(11):6296-300.
- Tu C, Ortega-Cava CF, Chen G, Fernandes ND, Cavallo-Medved D, Sloane BF, et al. Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer Res.* 2008;68(22):9147-56.
- Turley EA. Purification of a hyaluronate-binding protein fraction that modifies cell social behavior. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;108(3):1016-24.
- Väänänen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, et al. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol.* 1990;111(3):1305-11.
- Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 3):377-81.
- Vääräniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, Ylipahkala H, Alatalo SL, Andersson G, et al. Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2004;19(9):1432-40.
- Vaes G, Jacques P. Studies on bone enzymes. The assay of acid hydrolases and other enzymes in bone tissue. *Biochem J.* 1965;97(2):380-8.
- Vaes G. Hyaluronidase activity in lysosomes of bone tissue. *Biochem J.* 1967;103(3):802-4.
- Vaes G. On the mechanisms of bone resorption. The action of parathyroid hormone on the excretion and synthesis of lysosomal enzymes and on the extracellular release of acid by bone cells. *J Cell Biol.* 1968;39(3):676-97.

- van Meel E, Boonen M, Zhao H, Oorschot V, Ross FP, Kornfeld S, et al. Disruption of the Man-6-P targeting pathway in mice impairs osteoclast secretory lysosome biogenesis. *Traffic*. 2011;12(7):912-24.
- van Meel E, Lee WS, Liu L, Qian Y, Doray B, Kornfeld S. Multiple Domains of GlcNAc-1-phosphotransferase Mediate Recognition of Lysosomal Enzymes. *J Biol Chem*. 2016;291(15):8295-307.
- Varki A, Kornfeld S. Purification and characterization of rat liver alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *J Biol Chem*. 1981;256(19):9937-43.
- Varki A, Sherman W, Kornfeld S. Demonstration of the enzymatic mechanisms of alpha-N-acetyl-D-glucosamine-1-phosphodiester N-acetylglucosaminidase (formerly called alpha-N-acetylglucosaminylphosphodiesterase) and lysosomal alpha-N-acetylglucosaminidase. *Arch Biochem Biophys*. 1983;222(1):145-9.
- Vieira OV. Rab3a and Rab10 are regulators of lysosome exocytosis and plasma membrane repair. *Small GTPases*. 2018;9(4):349-51.
- Vigdorovich V, Strong RK, Miller AD. Expression and characterization of a soluble, active form of the jaagsiekte sheep retrovirus receptor, Hyal2. *J Virol*. 2005;79(1):79-86.
- Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, Karousou E, Viola M, Bartolini B, et al. Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis. *J Biol Chem*. 2012;287(42):35544-55.
- Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2452-9.
- Waheed A, Hasilik A, von Figura K. UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme precursor N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. Partial purification and characterization of the rat liver Golgi enzyme. *J Biol Chem*. 1982;257(20):12322-31.
- Wang Y, Liao E, Xiang G, Dai R, Xiao X, Luo X. Effects of 17beta-estradiol on the expression of IL-6, IL-11 and NF-kappaB in human MG-63 osteoblast-like cell line. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2006;26(1):53-8.
- Wattiaux R, Wibos M, Baudhuin P. Effect of the injection of Triton WR 1339 on the hepatic lysosomes of the rat. *Arch. Int. Physiol. Bioch*. 1963;71:140-142.
- Weber A, Chan PMB, Wen C. Do immune cells lead the way in subchondral bone disturbance in osteoarthritis? *Prog Biophys Mol Biol*. 2017.
- Weigel JA, Raymond RC, McGary C, Singh A, Weigel PH. A blocking antibody to the hyaluronan receptor for endocytosis (HARE) inhibits hyaluronan clearance by perfused liver. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9808-12.
- Weigel PH. Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior. *Int J Cell Biol*. 2015;2015:367579.
- Welti M. Regulation of dolichol-linked glycosylation. *Glycoconj J*. 2013;30(1):51-6.
- Wen C, LU WW, Chiu KY. Importance of subchondral bone in the pathogenesis and management of osteoarthritis from bench to bed. *J. Orthop. Translat*. 2014;2(1):16-25.
- Wilson SG, Reed PW, Bansal A, Chiano M, Lindersson M, Langdown M, et al. Comparison of genome screens for two independent cohorts provides replication of suggestive linkage of bone mineral density to 3p21 and 1p36. *Am J Hum Genet*. 2003;72(1):144-55.
- Wlodarski KH, Brodzikowska A, Kuzaka B. Are chondroclasts and osteoclasts identical? *Folia Biol (Krakow)*. 2014;62(2):143-7.
- Wong GL. Basal activities and hormone responsiveness of osteoclast-like and osteoblast-like bone cells are regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem*. 1979;254(14):6337-40.
- Wróbel T, Dziegiel P, Mazur G, Zabel M, Kuliczowski K, Szuba A. LYVE-1 expression on high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes. *Lymphology*. 2005;38(3):107-10.
- Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity In Vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(4):1360-9.
- Xu F, Dong Y, Huang X, Li M, Qin L, Ren Y, et al. Decreased osteoclastogenesis, osteoblastogenesis and low bone mass in a mouse model of type 2 diabetes. *Mol Med Rep*. 2014;10(4):1935-41.

- Yamada S, Sugahara K, Ozbek S. Evolution of glycosaminoglycans: Comparative biochemical study. *Commun Integr Biol.* 2011;4(2):150-8.
- Yamamoto H, Tobisawa Y, Inubushi T, Irie F, Ohyama C, Yamaguchi Y. A mammalian homolog of the zebrafish transmembrane protein 2 (TMEM2) is the long-sought-after cell-surface hyaluronidase. *J Biol Chem.* 2017;292(18):7304-13.
- Yoshida H, Nagaoka A, Kusaka-Kikushima A, Tobiishi M, Kawabata K, Sayo T, et al. KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(14):5612-7.
- Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *J Bone Miner Res.* 2003;18(8):1404-18.
- Yu F, Chen Z, Wang B, Jin Z, Hou Y, Ma S, et al. The role of lysosome in cell death regulation. *Tumour Biol.* 2016;37(2):1427-36.
- Zhang W, Watson CE, Liu C, Williams KJ, Werth VP. Glucocorticoids induce a near-total suppression of hyaluronan synthase mRNA in dermal fibroblasts and in osteoblasts: a molecular mechanism contributing to organ atrophy. *Biochem J.* 2000;349(Pt 1):91-7.
- Zhang L, Bharadwaj AG, Casper A, Barkley J, Barycki JJ, Simpson MA. Hyaluronidase activity of human Hyal1 requires active site acidic and tyrosine residues. *J Biol Chem.* 2009;284(14):9433-42.
- Zhang RK, Li GW, Zeng C, Lin CX, Huang LS, Huang GX, et al. Mechanical stress contributes to osteoarthritis development through the activation of transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1). *Bone Joint Res.* 2018;7(11):587-94.
- Zhao Q, Shao J, Chen W, Li YP. Osteoclast differentiation and gene regulation. *Front Biosci.* 2007;12:2519-29.
- Zhao H, Ito Y, Chappel J, Andrews NW, Teitelbaum SL, Ross FP. Synaptotagmin VII regulates bone remodeling by modulating osteoclast and osteoblast secretion. *Dev Cell.* 2008;14(6):914-25.
- Zhao N, Wang X, Qin L, Guo Z, Li D. Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(3):569-74.
- Zou L, Zou X, Chen L, Li H, Mygind T, Kassem M, et al. Effect of hyaluronan on osteogenic differentiation of porcine bone marrow stromal cells in vitro. *J Orthop Res.* 2008;26(5):713-20.

ANNEXES

Disease (gene)	Onset	Primary defect (Substrate/product)	Presenting symptoms	Approved therapies
Sphingolipidoses^a				
Fabry disease (<i>GLA</i>)	Juvenile (males) or adult (females) or non-classical adult (males)	α -Galactosidase A (Globotriaosylceramide)	<ul style="list-style-type: none"> • Acroparesthesias, gastroenteritis, nephropathy, angiokeratoma in a bathing suit distribution; cerebrovascular disease, stroke, corneal opacities (males): corneal verticillata, acroparesthesias, cerebrovascular disease and stroke (females) • Left ventricular hypertrophy, cardiomyopathy and arrhythmia; proteinuria or end-stage renal disease without other classical symptoms; or cerebrovascular disease with stroke or transient ischaemic attacks. Left ventricular hypertrophy might be the only manifestation in some cases (males or females) 	ERT and CT
Farber lipogranulomatosis (<i>ASAHI</i>)	Juvenile	Acid ceramidase (Ceramide)	Polyarticular arthritis, joint contractures, subcutaneous nodules, hoarse voice and cherry-red macula	S/S
Gaucher disease: type I, type II ^b , type III ^b and perinatal lethal form ^b (<i>GBA</i>)	Juvenile to adult (type I), infantile (type II), juvenile (type III) and perinatal lethal (perinatal lethal form)	β Glucocerebrosidase, also known as β -glucosidase (Glucocerebroside and glucosylsphingosine)	<ul style="list-style-type: none"> • Type I: hepatosplenomegaly, pancytopenia, bone disease, degenerative arthritis and elevated risk of multiple myeloma (can also be asymptomatic) • Type II: limited psychomotor development, bulbar signs including stridor and swallowing difficulty, stiffened opisthotonic posture, spasticity and trismus, epilepsy • Type III: oculomotor apraxia, abnormal horizontal saccadic eye movements and myoclonic or generalized epilepsy • Perinatal lethal form: hepatosplenomegaly, pancytopenia, skin abnormalities and non-immune hydrops fetalis 	ERT and SRT (types I, II and III), none (perinatal lethal form)
GM1 gangliosidosis: type I ^b , type II ^b and type III ^b (<i>GLB1</i>)	Infantile (type I), late infantile to juvenile (type II) and adult (type III)	β -Galactosidase (GM1 ganglioside, keratan sulfate and oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> • Type I: hypotonia, developmental regression by 6 months, seizures, cherry-red macula and severe gross motor decline • Type II: dysarthria progressing to absent speech, ataxia progressing to loss of ambulation, progressive cognitive decline and dysostosis multiplex (variable) • Type III: ataxia, dystonia, dysarthria and parkinsonism 	S/S
GM2 gangliosidosis, Tay-Sachs disease ^b (<i>HEXA</i>)	Infantile, juvenile and adult	β -Hexosaminidase (GM2 ganglioside, glycosphingolipids and oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: hypotonia, developmental regression before age 1 year, macrocephaly, seizures and cherry-red macula • Juvenile: progressive developmental regression in early childhood, cerebellar ataxia and dysarthria • Adult: cerebellar ataxia and frequent falls beginning in teens or twenties, dysarthria and psychosis 	S/S
GM2 gangliosidosis, Sandhoff disease ^b (<i>HEXB</i>)	Infantile, juvenile and adult	β -Hexosaminidase (GM2 ganglioside, GA2 glycolipid and oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: hypotonia, developmental regression before age 1 year, macrocephaly, seizures and cherry-red macula • Juvenile: progressive developmental regression in early childhood, cerebellar ataxia, dysarthria and sensory neuropathy • Adult: cerebellar ataxia and frequent falls beginning in teens or twenties, dysarthria and psychosis sensorineuropathy 	S/S
GM2 gangliosidosis, GM2 activator deficiency ^b (<i>GM2A</i>)	Infantile	GM2 ganglioside activator (GM2 ganglioside and glycosphingolipids)	Hypotonia, developmental regression, macrocephaly, seizures and cherry-red macula	S/S
Globoid cell leukodystrophy, also known as Krabbe disease ^b (<i>GALC</i>)	Infantile and juvenile	Galactosylceramidase (Galactocerebroside and psychosine)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: irritability, hypotonia, spasticity, feeding difficulties and psychomotor regression • Juvenile: variable onset and progression from childhood to adulthood, muscle weakness, vision loss and intellectual regression 	HSCT (infantile onset) and S/S

Table 1: Les maladies de surcharge lysosomale

Disease (gene)	Onset	Primary defect (Substrate/product)	Presenting symptoms	Approved therapies
Sphingolipidoses^a (cont.)				
Metachromatic leukodystrophy ^b (ARSA and PSAP)	Late infantile, juvenile and adult	Arylsulfatase A and prosaposin (Sulfatides)	<ul style="list-style-type: none"> • Late infantile: ataxia, weakness, loss of speech and cherry-red macula • Juvenile: behavioural problems and psychomotor regression • Adult: behavioural problems, psychiatric symptoms and cognitive decline 	HSCT
Niemann–Pick disease types A ^b and B (SMPD1)	Infantile (type A) and juvenile (type B)	Sphingomyelin phosphodiesterase (Sphingomyelin)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: hepatosplenomegaly, failure to thrive, psychomotor regression, interstitial lung disease and cherry-red macula • Juvenile: hepatosplenomegaly, recurrent pulmonary infections, thrombocytopenia, short stature and neurological impairment 	S/S
Mucopolysaccharidoses^a				
MPS I: Hurler syndrome ^b , Hurler–Scheie syndrome and Scheie syndrome (IDUA)	Infantile (Hurler) and juvenile (Hurler–Scheie and Scheie)	α -L-Iduronidase (Dermatan sulfate and heparan sulfate)	Coarse facial features, hepatosplenomegaly, hernias, corneal clouding, frequent otitis media, cognitive decline (except attenuated forms) and dysostosis multiplex	HSCT (Hurler) and ERT (Hurler–Scheie and Scheie)
MPS II, also known as Hunter syndrome ^{b,c} (IDS)	Infantile, juvenile (acute) and juvenile (attenuated)	Iduronate 2-sulfatase (Dermatan sulfate and heparan sulfate)	Coarse facial features, hepatosplenomegaly, dermal pebbling, frequent otitis media, hernias, no corneal clouding, spinal stenosis and dysostosis multiplex	ERT
MPS IIIA, also known as Sanfilippo syndrome A ^{b,c} (SGSH)	Late infantile	N-Sulfoglucosamine sulfohydrolase (Heparan sulfate)	Behavioural difficulties, sleep disturbance, progressive intellectual disability, coarse facial features, macrocephaly, hepatosplenomegaly, hernias and mild dysostosis multiplex	S/S
MPS IIIB, also known as Sanfilippo syndrome B ^{b,c} (NAGLU)	Juvenile	N-Acetyl- α -glucosaminidase (Heparan sulfate)	Similar to MPS IIIA	S/S
MPS IIIC, also known as Sanfilippo syndrome C ^{b,c} (HGSNAT)	Juvenile	Heparan- α -glucosaminide-N-acetyltransferase (Heparan sulfate)	Similar to MPS IIIA	S/S
MPS IIID, also known as Sanfilippo syndrome D ^{b,c} (GNS)	Juvenile	N-acetylglucosamine-6-sulfatase (Heparan sulfate)	Similar to MPS IIIA	S/S
MPS IVA, also known as Morquio syndrome A (GALNS)	Late infantile	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (Keratan sulfate and chondroitin 6-sulfate)	Short stature, severe skeletal dysplasia, hyperextensible joints, odontoid hypoplasia, corneal clouding and hernias	ERT
MPS IVB, also known as Morquio syndrome B (GLB1)	Late infantile and juvenile	β -Galactosidase (Keratan sulfate)	Similar to MPS IVA	S/S
MPS VI, also known as Maroteaux–Lamy syndrome (ARSB)	Late infantile and juvenile	Arylsulfatase B (Dermatan sulfate)	Skeletal dysplasia, short stature, contractures, macrocephaly, hernias, macroglossia, hepatosplenomegaly, sleep apnoea and corneal clouding	ERT
MPS VII, also known as Sly disease ^b (GUSB)	Infantile and late infantile	β -Glucuronidase (Dermatan sulfate, heparan sulfate and chondroitin 6-sulfate)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: hydrops fetalis • Late infantile: macrocephaly, hydrocephalus, coarse facial features, macroglossia, hepatosplenomegaly, heart valve abnormalities, hernias, corneal clouding, recurrent otitis media, progressive intellectual disability but not in all patients (late infantile) 	ERT
MPS IX (HYAL1)	Juvenile	Hyaluronidase 1 (Hyaluronan)	Periarticular soft tissue masses, mild short stature, acetabular erosion and recurrent otitis media	S/S
Glycogen storage disease (GSD)^a				
GSD II, also known as Pompe disease (GAA)	Infantile ^b and adult	Lysosomal α -glucosidase, also known as acid maltase (Glycogen)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: cardiomegaly and severe hypotonia. • Adult: muscle weakness and atrophy, including of the diaphragm 	ERT

Table 1: Les maladies de surcharge lysosomale

Disease (gene)	Onset	Primary defect (Substrate/product)	Presenting symptoms	Approved therapies
Glycoproteinoses^a				
α -Mannosidosis ^b : type I mild, type II moderate and type III severe (MAN2B1)	Infantile and juvenile	Lysosomal α -mannosidase (Mannose-rich oligosaccharides)	<ul style="list-style-type: none"> • Type I: mild skeletal deformities and cognitive impairment • Type II: dysmorphic facial features, immune deficiency, dysostosis multiplex, ataxia and progressive cognitive impairment • Type III: severe skeletal abnormalities in early infancy, progressive psychomotor deterioration 	ERT
β -Mannosidosis ^b (MANBA)	Juvenile and adult	β -Mannosidase (Man(β 1>4)N-acetylglucosamine)	Intellectual disability and speech impairment, angiokeratoma, hypotonia, behavioural disturbance	S/S
Fucosidosis ^b (FUCA1)	Infantile, late infantile and juvenile	α -L-Fucosidase (Fucose-rich oligosaccharides, glycoproteins and glycolipids)	Clinical spectrum ranging from severe neurological deterioration and death in childhood to milder psychomotor deterioration, angiokeratoma, anhidrosis and dysostosis multiplex	S/S
Aspartylglucosaminuria ^b (AGA)	Juvenile	Aspartoglucosaminidase (Aspartylglucosamine)	Progressive intellectual disability, dysmorphic facial features, recurrent respiratory infections, hepatomegaly, diarrhoea, mild dysostosis multiplex, seizures and movement disorder into adulthood	S/S
Schindler disease: type I ^b , also known as infantile-onset neuroaxonal dystrophy, type II ^b also known as Kanzaki disease, and type III ^b , intermediate severity (NAGA)	Infantile (type I), adult (type II) and juvenile (type III)	α -N-Acetyl-galactosaminidase (Sialylated or asialo glycopeptides and glycosphingolipids)	<ul style="list-style-type: none"> • Type I: rapid psychomotor deterioration and seizures • Type II: mild cognitive impairment, sensorineural hearing loss and angiokeratomas • Type III: developmental delay, seizures, cardiomyopathy, hepatomegaly and autism spectrum disorder 	S/S
Sialidosis type I, also known as cherry-red spot myoclonus syndrome (NEU1)	Adult	Neuraminidase-1 (Sialylated oligosaccharides and glycopeptides)	Gait disturbance and ataxia due to myoclonus, reduced visual acuity, cherry-red macula, seizures and preserved cognition	S/S
Sialidosis type II, also known as mucopolipidosis I ^b (NEU1)	Congenital, infantile and juvenile	Neuraminidase-1 (Sialylated oligosaccharides and glycopeptides, LAMP1 and amyloid precursor protein)	Hydrops fetalis, neonatal ascites, hepatosplenomegaly, spectrum of intellectual disability, dysostosis multiplex, coarse facial features, short stature, hearing loss, hypotonia, gingival hyperplasia, flat nasal widely spaced teeth, cherry-red macula, myoclonus, ataxia, tremor and angiokeratoma	S/S
Galactosialidosis (CTSA)	Early infantile, late infantile, juvenile or adult	Protective protein cathepsin A, and a secondary deficiency in β -galactosidase and neuraminidase-1 (Sialylated oligosaccharides and glycopeptides, LAMP2 and bioactive peptides)	<ul style="list-style-type: none"> • Early infantile: hydrops fetalis, inguinal hernia, hepatosplenomegaly, dysostosis multiplex, coarse facial features, cardiomegaly, cherry-red macula, renal disease • Late infantile: short stature, dysostosis multiplex, cardiac valve abnormalities, hepatosplenomegaly, coarse facial features, mild or no intellectual disability, hearing loss and cherry-red macula • Juvenile or adult: ataxia, myoclonus, seizures, progressive intellectual disability, angiokeratomas, spinal anomalies, vision and hearing loss 	S/S
Lipid storage diseases				
Acid lipase deficiency: Wolman disease ^b and cholesterol ester storage disease (LIPA)	Infantile, juvenile and adult	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase (Cholesteryl esters, triglycerides and other lipids)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: hepatosplenomegaly, jaundice, failure to thrive, vomiting, diarrhoea, malabsorption, calcification of the adrenal glands, anaemia, developmental delay and multiorgan failure • Juvenile and adult: hepatosplenomegaly, liver fibrosis, malabsorption, high cholesterol levels and atherosclerosis at an early age with increased risk of heart attack or stroke 	ERT

Table 1: Les maladies de surcharge lysosomale

Disease (gene)	Onset	Primary defect (Substrate/product)	Presenting symptoms	Approved therapies
<i>Post-translational modification defects</i>				
Multiple sulfatase deficiency (SUMF1)	Infantile, late infantile and juvenile	Formylglycine-generating enzyme (Sulfatides)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: seizures, severe psychomotor retardation, coarse facial features, ichthyosis, hypertrichosis, dysostosis multiplex and hepatosplenomegaly • Late infantile: normal early development followed by developmental plateau then regression, ichthyosis, dysostosis multiplex and coarse facial features • Juvenile: typical until middle to late childhood then plateau and psychomotor regression over a prolonged period and ichthyosis 	S/S
Mucopolipidosis II α/β , I-cell disease ^b (GNPTAB)	Infantile	N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits α/β (Oligosaccharides, glycosaminoglycans and glycosphingolipids)	Growth deficiency beginning at birth, coarse facial features, gingival hypertrophy, recurrent otitis media, cardiac valvular disease, recurrent pneumonia, hemias, severe psychomotor retardation, hepatosplenomegaly and severe dysostosis multiplex with kyphosis, clubfoot and joint deformity	S/S
Mucopolipidosis II α/β , pseudo-Hurler polydystrophy (GNPTAB)	Late infantile or juvenile	N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunits α/β (Oligosaccharides, glycosaminoglycans and glycosphingolipids)	Short stature, dysostosis multiplex, joint contractures, variable intellectual disability, thickened skin and restrictive lung disease	S/S
Mucopolipidosis III γ , variant pseudo-Hurler polydystrophy (GNPTG)	Juvenile or adult	N-Acetylglucosamine-1-phosphotransferase subunit γ (Oligosaccharides, glycosaminoglycans and glycosphingolipids)	Short stature, aortic valve abnormalities, dysostosis multiplex and normal to near-normal intelligence	S/S
<i>Integral membrane protein disorders</i>				
Cystinosis (CTNS)	Infantile or juvenile	Cystinosin (Cystine)	Renal tubular Fanconi syndrome, renal failure, failure to thrive, photophobia, corneal crystals, hypophosphataemic rickets, light pigmentation, heat intolerance, primary hypothyroidism and myopathy	SMT
Danon disease ^b (LAMP2)	Juvenile or adult and sex-linked dominant	LAMP2 (Cytoplasmic debris and glycogen)	Cardiomyopathy, myopathy, intellectual disability with males more severely affected than females and cardiac arrhythmia	S/S
Action myoclonus-renal failure syndrome ^b (SCARB2)	Adult	Lysosomal integral membrane protein (Unknown)	Tremor, action myoclonus, peripheral neuropathy, sensorineural hearing loss and proteinuria	S/S
Sialic acid storage disease: ISSD ^b , Salla disease ^b and intermediate severity Salla disease ^b (SLC17A5)	Congenital (ISSD) and infantile to late infantile (Salla)	Sialin (Sialic acids)	<ul style="list-style-type: none"> • Congenital: hydrops fetalis, developmental delay, hypotonia, failure to thrive, coarse facies, seizures, hepatosplenomegaly and cardiomegaly • Infantile to late infantile: hypotonia, intellectual disability, seizures, ataxia, spasticity and athetosis 	S/S
Niemann–Pick disease types C1 and C2 ^b (NPC1 and NPC2)	Juvenile	NPC intracellular cholesterol transporter 1 and 2 (Cholesterol and sphingolipids)	Ataxia, vertical supranuclear gaze palsy, dystonia, liver disease, splenomegaly, interstitial lung disease, difficulty swallowing, intellectual decline and seizures	SRT
Mucopolipidosis IV ^b (MCOLN1)	Infantile	Mucopolipin 1 (Lipids and mucopolysaccharides)	Psychomotor delay, hypotonia, spasticity, corneal clouding, retinopathy, achlorhydria and iron deficiency anaemia	S/S
<i>Neuronal ceroid lipofuscinoses</i>				
CLN1: Haltia–Santavuori disease and INCL ^b (PPT1)	Infantile, juvenile or adult	Palmitoyl-protein thioesterase 1 (Lipidated thioesters and saposins A and D)	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile: developmental regression by 18 months, hypotonia, deceleration of head growth and cerebral atrophy, myoclonus, epilepsy and vision loss • Juvenile: Intellectual decline in childhood, myoclonus, epilepsy and vision loss • Adult: ataxia and parkinsonism 	S/S
CLN2, also known as Jansky–Bielschowsky disease ^b (TPP1)	Late infantile or juvenile	Tripeptidyl peptidase 1 (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	<ul style="list-style-type: none"> • Late infantile: intractable epilepsy, cognitive arrest, myoclonus and ataxia • Juvenile: severe ataxia but milder developmental decline and myoclonus 	ERT

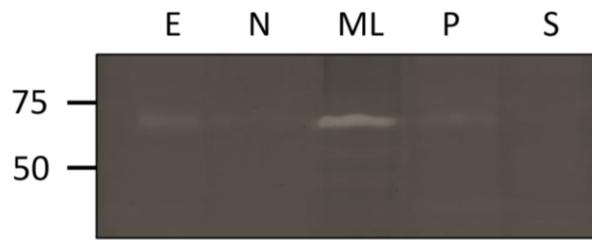
Table 1: Les maladies de surcharge lysosomale

Disease (gene)	Onset	Primary defect (Substrate/product)	Presenting symptoms	Approved therapies
<i>Neuronal ceroid lipofuscinoses (cont.)</i>				
CLN3, also known as Batten–Spielmeyer–Sjogren disease ^b (CLN3)	Juvenile	Battenin (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	Progressive visual loss, developmental regression and later hypokinesia including muscle rigidity and slow or diminished movements	S/S
CLN4: Parry disease and Kufs type A and B ^a (DNAJC5)	Adult	Cysteine string protein (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	<ul style="list-style-type: none"> • Kufs type A: marked myoclonus, progressive epilepsy, dementia, ataxia • Kufs type B: behavioural changes, dementia, facial dyskinesia 	S/S
CLN5: Finnish variant late infantile ^b (CLN5)	Late infantile, juvenile or adult	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 (lysosomal protein of unknown function) (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	Developmental regression, myoclonic epilepsy, ataxia and vision loss	S/S
CLN6: Lake–Cavanagh or Indian variant ^b (CLN6)	Juvenile or adult (Kufs A)	Transmembrane ER protein (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	<ul style="list-style-type: none"> • Juvenile: developmental regression, epilepsy, ataxia, myoclonus, dysarthria and vision loss • Adult: ataxia, epilepsy, dysarthria and progressive loss of intellectual function without visual loss 	S/S
CLN7: Turkish variant ^b (MFSD8)	Late infantile or juvenile	Major facilitator superfamily domain containing 8 (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	Epilepsy, developmental regression, myoclonus, ataxia, speech impairment and vision loss	S/S
CLN8: northern epilepsy, epilepsy mental retardation ^b (CLN8)	Late infantile or juvenile	Protein CLN8 (Subunit c of mitochondrial ATP synthase)	<ul style="list-style-type: none"> • Late infantile: developmental delay with progressive myoclonus, seizures, retinopathy and regression • Juvenile: intractable epilepsy with progressive decline 	S/S
CLN9 ^b (N/A)	Juvenile	N/A	Clinically indistinguishable from CLN3 but more-rapid course	S/S
CLN10 ^b (CTSD)	Congenital, late infantile, juvenile or adult	Cathepsin D (Saposins A and D)	<ul style="list-style-type: none"> • Congenital: microcephaly, neonatal epilepsy, respiratory insufficiency and rigidity • Late infantile, juvenile or adult: ataxia, visual loss and cognitive decline 	S/S
CLN11 ^b (GRN)	Adult	Granulin (Unknown)	Progressive visual loss, seizures, cerebellar ataxia and atrophy	S/S
CLN12 ^b : Kufor–Rakeb syndrome or PARK9 (ATP13A2)	Juvenile	Cation-transporting ATPase 13A2 (Inorganic cations)	Mood disturbance, akinesia, rigidity and dysarthria	S/S
CLN13 ^b (CTSF)	Adult (Kufs B)	Cathepsin F (Unknown)	Behavioural abnormalities and dementia	S/S
CLN14 ^b (KCTD7)	Infantile	Potassium channel tetramerization domain containing 7 (Unknown)	Progressive myoclonic epilepsy, abnormal eye movements and developmental regression	S/S

Table 1: Les maladies de surcharge lysosomale

CNS: *Central Nervous System* ; CT: *Chaperone Therapy* ; ER: *Endoplasmic Reticulum* ; ERT: *Enzyme Replacement Therapy* ; GM1: *GM1-ganglioside* ; HSCT: *Haematopoietic Stem Cell Therapy* ; INCL: *Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis* ; ISSD: *Infantile Sialic Acid Storage Disease* ; N/A: *Not Applicable* ; PARK9: *Parkinson Disease 9* ; SMT: *Small-molecule Therapy* ; SRT: *Substrate Reduction Therapy* ; S/S: *Symptomatic and Supportive Therapy*.

^a Désigne des pathologies liées à une déficience enzymatique. ^b Désigne des pathologies qui impliquent le CNS. ^c Désigne des pathologies avec des formes sévères et atténuées [Platt et al., 2018].



Zymographie d'échantillons obtenus après un fractionnement subcellulaire de macrophages murins. Des cellules de la lignée RAW264.7 ont été fractionnées selon un protocole de centrifugation différentielle. L'activité d'HYAL1 dans les cinq fractions obtenues appelées E, N, ML, P et S a ensuite été analysée par zymographie comprenant une étape de dénaturation - renaturation des protéines. Des quantités égales de protéines ont été chargées sur le gel d'acrylamide et séparées dans des conditions non réductrices. Il est à noter que les échantillons utilisés sont les mêmes que ceux analysés par western blotting dans la figure 1 de notre article publié dans le journal « *Traffic* » et qui est présenté dans la partie « Résultats ».

Subcellular Trafficking of Mammalian Lysosomal Proteins: An Extended View.

Staudt C¹, Puissant E², Boonen M³.

⊕ Author information

Abstract

Lysosomes clear macromolecules, maintain nutrient and cholesterol homeostasis, participate in tissue repair, and in many other cellular functions. To assume these tasks, lysosomes rely on their large arsenal of acid hydrolases, transmembrane proteins and membrane-associated proteins. It is therefore imperative that, post-synthesis, these proteins are specifically recognized as lysosomal components and are correctly sorted to this organelle through the endosomes. Lysosomal transmembrane proteins contain consensus motifs in their cytosolic regions (tyrosine- or dileucine-based) that serve as sorting signals to the endosomes, whereas most lysosomal acid hydrolases acquire mannose 6-phosphate (Man-6-P) moieties that mediate binding to two membrane receptors with endosomal sorting motifs in their cytosolic tails. These tyrosine- and dileucine-based motifs are tickets for boarding in clathrin-coated carriers that transport their cargo from the trans-Golgi network and plasma membrane to the endosomes. However, increasing evidence points to additional mechanisms participating in the biogenesis of lysosomes. In some cell types, for example, there are alternatives to the Man-6-P receptors for the transport of some acid hydrolases. In addition, several "non-consensus" sorting motifs have been identified, and atypical transport routes to endolysosomes have been brought to light. These "unconventional" or "less known" transport mechanisms are the focus of this review.

KEYWORDS: alternative receptor; lysosome; mannose 6-phosphate; sorting motif; trafficking; unconventional

PMID: 28036022 PMCID: [PMC5297682](#) DOI: [10.3390/ijms18010047](#)