

Université de Sherbrooke

Régulation de l'ostéoclaste humain par l'épissage alternatif de *TBC1D25* et *LGALS8*

Par
Michèle Roy
Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *philosophiae doctor* (Ph.D.)
en Immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Novembre 2023

Membres du jury d'évaluation
Pre Claire Dubois, Ph.D., Département d'immunologie et de biologie cellulaire
Pr Steve Jean, Ph.D., Département d'immunologie et de biologie cellulaire
Pr Pierre Moffatt, Ph.D., Département de génétique humaine, Faculté de médecine dentaire et des
sciences de la santé orale, Université McGill
Pre Sophie Roux, M.D., Ph.D., Département de médecine

© Michèle Roy, 2023

*À ma famille: Denis, Nancy, Dominic et Jennifer,
source d'inspiration et de soutien*

Ad maiora

RÉSUMÉ

Régulation de l'ostéoclaste humain par l'épissage alternatif de *TBC1D25* et *LGALS8*

Par
Michèle Roy
Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en immunologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées avec une capacité unique à résorber la matrice osseuse. Chez les ostéoclastes humains hyperactifs, le laboratoire de Dre Roux a précédemment identifié des événements de l'épissage alternatif dans *TBC1D25* et *LGALS8*. Ces deux gènes et leurs protéines correspondantes n'ont jamais été impliqués dans la biologie de l'ostéoclaste. Cependant, les deux protéines possèdent des fonctions connues dans des processus cellulaires essentiels à la régulation des ostéoclastes. *TBC1D25* participe à la régulation du trafic vésiculaire et joue un rôle dans l'autophagie. La galectine-8 a une variété de fonctions, y compris la régulation de l'adhésion cellulaire au niveau extracellulaire et est impliquée dans le trafic de protéines ainsi que l'autophagie en tant que récepteur de danger au niveau intracellulaire. Par conséquent, les objectifs de notre étude étaient d'évaluer l'expression et la fonction de *TBC1D25* et de la galectine-8 ainsi que de leurs isoformes dans l'ostéoclaste humain afin de déterminer l'effet de l'altération de leur épissage alternatif sur la régulation et l'activité des ostéoclastes.

Nos travaux ont montré l'implication de *TBC1D25* et de la galectine-8 dans la régulation des ostéoclastes et de la résorption osseuse. *TBC1D25* est localisée à la zone de scellement et, dans une moindre mesure, à la membrane plissée des ostéoclastes actifs. La réduction de son expression diminue la capacité de résorption des ostéoclastes, suggérant son implication directe dans ce processus en raison de sa localisation. De plus, la réduction de l'expression de *TBC1D25* affecte la nucléarité des ostéoclastes. La galectine-8 régule la signalisation de *MTORC1*, l'initiation de l'autophagie et la nucléarité des ostéoclastes. De plus, l'expression réduite de la galectine-8 diminue la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes, principalement en raison de la fonction de son isoforme courte. L'isoforme courte participe directement à la régulation de la résorption par son interaction avec les protéines lysosomales, *CLCN7* et *LAMP1*, suggérant son implication dans le trafic vésiculaire associé à l'activité des ostéoclastes humains.

En conclusion, nous avons identifié deux nouvelles protéines impliquées dans la maturation terminale de l'ostéoclaste avec un rôle direct dans la résorption osseuse. Nos résultats soulignent l'importance de l'épissage alternatif de ces gènes dans la régulation de l'ostéoclaste permettant la régulation de l'expression de la forme active de *TBC1D25* et la modulation de l'expression de l'isoforme courte de la galectine-8 principalement impliquée dans la résorption osseuse.

Mots clés: Ostéoclaste humain, Résorption osseuse, *TBC1D25*, Galectine-8, Épissage alternatif, Maladie de Paget

SUMMARY

Regulation of the human osteoclast by alternative splicing of *TBC1D25* and *LGALS8*

By
Michèle Roy
Immunology program

Thesis presented at the Faculty of medicine and health sciences for the obtention of Doctor degree diploma *philosophiae doctor* (Ph.D.) in immunology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Osteoclasts are multinucleated cells derived from the monocyte-macrophage lineage, with a unique ability to resorb the bone matrix. The laboratory of Dre Roux has previously identified alternative splicing events in *TBC1D25* and *LGALS8* in hyperactive human osteoclasts. These two genes and their corresponding proteins have not been previously implicated in osteoclasts. However, both proteins function in cellular processes that are essential to osteoclast regulation. *TBC1D25* is involved in the regulation of vesicular trafficking and plays a role in the terminal stages of autophagy. Galectin-8 has a variety of functions, including regulation of cell adhesion at the extracellular level and is involved in protein trafficking and autophagy as a danger receptor at the intracellular level. Therefore, the aims of our study were to evaluate the expression and function of *TBC1D25* and galectin-8 and their isoforms in human osteoclasts to determine the effect of altering their alternative splicing on osteoclast regulation and activity.

Our work has shown the involvement of *TBC1D25* and galectin-8 in the regulation of osteoclasts and bone resorption. *TBC1D25* was localized in the sealing zone and, to a lesser extent, at the ruffled border of active osteoclasts. Reducing its expression diminishes the resorptive capacity of osteoclasts, suggesting its direct involvement in this process due to its localization. In addition, the reduction of the expression of *TBC1D25* affects osteoclast nuclearity. Galectin-8 regulates MTORC1 signaling, autophagy initiation, and osteoclast nuclearity. Reduced expression of galectin-8 diminishes the bone resorption capacity of osteoclasts, mainly due to the function of its short isoform. The short isoform participates directly in the regulation of bone resorption through its interaction with lysosomal proteins *CLCN7* and *LAMP1*, suggesting its involvement in vesicular trafficking associated with human osteoclast activity.

In conclusion, we identified two new proteins involved in osteoclast terminal maturation with a direct role in bone resorption. Our results underline the importance of alternative splicing of these genes in osteoclast regulation, allowing the regulation of the expression of the active form of *TBC1D25* and modulation of the expression of the short isoform of galectin-8 mainly involved in bone resorption.

Keywords: Human osteoclast, Bone resorption, *TBC1D25*, Galectin-8, Alternative Splicing, Paget's disease of bone

TABLE DES MATIERES

Résumé	<i>i</i>
Summary	<i>ii</i>
Table des matières	<i>iii</i>
Liste des figures	<i>vi</i>
Liste des tableaux	<i>viii</i>
Liste des abréviations	<i>ix</i>
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Présentation clinique de la maladie de Paget	1
1.2 Le remodelage osseux	3
1.2.1 Les cellules mésenchymateuses impliquées dans le remodelage osseux	5
1.2.2 Régulation du remodelage osseux par les cellules de la BMU	6
1.2.3 Le remodelage osseux dans la maladie de Paget	8
1.3 L'ostéoclaste	9
1.3.1 L'ostéoclastogénèse	9
1.3.2 La résorption osseuse	10
1.3.3 La régulation de la différenciation, la survie et la résorption osseuse de l'ostéoclaste	14
1.3.3.1 La signalisation engendrée par M-CSF	15
1.3.3.2 RANK/RANKL/OPG	16
1.3.3.3 La signalisation de MTORC1	18
1.3.3.4 L'autophagie	19
1.3.3.5 L'apoptose	23
1.4 L'ostéoclaste pagétique	25
1.4.1 Étiologie multifactorielle de la maladie de Paget	25
1.4.2 Contribution de l'épissage alternatif	27
1.5 Le gène <i>TBC1D25</i>	29
1.5.1 <i>TBC1D25</i> et ses protéines correspondantes	29
1.5.2 La régulation du transport vésiculaire par les rabs	31
1.5.3 Le système endomembranaire de l'ostéoclaste	34
1.5.3.1 Les rabs impliqués dans la résorption osseuse	35
1.5.4 Les fonctions connues de <i>TBC1D25</i>	39
1.5.4.1 Rôle de <i>TBC1D25</i> dans l'autophagie	39
1.5.4.2 Régulation de l'activation de TAK1 par <i>TBC1D25</i>	40

1.5.4.3 Rôles potentiels de TBC1D25 en fonction de ses substrats	41
1.6 Le gène <i>LGALS8</i>	43
1.6.1 Les galectines	43
1.6.1.1 <i>LGALS8</i> et ses protéines correspondantes	44
1.6.2 Les fonctions extracellulaires	48
1.6.2.1 La régulation des fonctions extracellulaires	51
1.6.3 Les fonctions intracellulaires	53
1.6.4 Rôle des galectines dans la régulation de l'ostéoclaste	56
1.6.4.1 Régulation du remodelage osseux par la galectine-8	59
1.7 Hypothèses et objectifs	61
1.7.1 <i>TBC1D25</i>	61
1.7.2 <i>LGALS8</i>	61
Chapitre 2 : Article 1	63
Résumé	64
Abstract	65
1. Introduction	66
2. Materials and methods	67
3. Results	71
4. Discussion	80
5. Conclusion	84
6. References	86
7. Supplementary data	90
Chapitre 3 : Article 2	93
Résumé	95
Abstract	96
1. Introduction	97
2. Results	98
4. Discussion	113
3. Materials and methods	116
5. References	123
6. Supplemental materials	128
Chapitre 4 : Discussion	141
4.1 Effet de l'épissage alternatif et le rôle de l'isoforme courte	142

4.1.1 Le rôle de l'isoforme courte de TBC1D25.....	142
4.1.2 L'isoforme courte de LGALS8	143
4.2 Rôle dans l'autophagie	144
4.2.1 TBC1D25 et l'autophagie dans l'ostéoclaste humain.....	145
4.2.2 Régulation de MTORC1 par la galectine-8	147
4.2.2.1 Rôle extracellulaire de la galectine-8.....	150
4.3 Signalisation influençant la survie de l'ostéoclaste	151
4.3.1 Régulation de l'activation de TAK1.....	152
4.3.2 Régulation de la survie par la galectine-8	152
4.4 Régulation du recyclage des ostéoclastes	153
4.4.1 Rôle de la galectine-8 dans le recyclage des ostéoclastes	154
4.4.2 Implication de TBC1D25 dans le recyclage des ostéoclastes	155
4.4.2.1 Partenaires d'interaction de TBC1D25.....	156
4.5 L'ostéoclastogénèse	158
4.5.1 Fonctions potentielles de TBC1D25 dans l'ostéoclastogénèse	159
4.5.2 Régulation de l'ostéoclastogénèse par les isoformes de la galectine-8.....	160
4.6 Fonction de TBC1D25 dans la résorption osseuse	160
4.6.1 L'implication de la localisation de TBC1D25 à la membrane plissée	161
4.6.2 L'implication de la localisation de TBC1D25 à la zone de scellement	165
4.7 La galectine-8 dans la résorption osseuse.....	167
4.7.1 L'isoforme courte de la galectine-8 dans la résorption osseuse	168
4.7.2 Mieux caractériser le rôle des protéines d'intérêt dans la résorption osseuse	172
4.8 Implication de l'épissage alternatif dans le phénotype de l'ostéoclaste pagétique.....	173
Conclusion	177
Remerciements.....	178
Liste des références.....	180
Annexe I	225

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1: Le remodelage osseux.....	4
Figure 2: Régulation des cellules de la BMU par les facteurs de couplage.....	7
Figure 3: L'ostéoclastogénèse	10
Figure 4: Les domaines de l'ostéoclaste actif	11
Figure 5: L'acidification de la lacune de résorption osseuse	13
Figure 6: Voies de signalisation essentielles à l'ostéoclaste	16
Figure 7: Signalisation de MTORC1	19
Figure 8: L'autophagie et les rôles supplémentaires de LC3.....	21
Figure 9: L'épissage alternatif de <i>TBC1D25</i>	30
Figure 10: La cascade des rabs	32
Figure 11: Les rabs dans l'ostéoclaste actif.....	36
Figure 12: Les galectines	43
Figure 13: L'épissage alternatif de <i>LGALS8</i>	46
Figure 14: Les rôles extracellulaires de la galectine-8	49
Figure 15: Les rôles intracellulaires des galectines	54
Figure 16: Fonctions des galectines dans la régulation de l'ostéoclaste	58

Chapitre 2 : Article 1

Figure 1: TBC1D25 and LAMP2 expression using confocal microscopy.....	72
Figure 2: Co-labeling of TBC1D25 and proteins expressed at the ruffled membrane.	73
Figure 3: Co-labeling of TBC1D25 and integrin ($\alpha 2\beta 1$) and F-actin.	74
Figure 4: TBC1D25 expression during osteoclast formation, and its modulation by DsiRNA.....	76
Figure 5: Bone resorption.	78
Figure 6: Formation of multinucleated cells.	79
Supplemental Figure 1: Immunofluorescence staining and colocalization. 7	90
Supplemental Figure 2: TBC1D25 and F-actin ring. 8	91
Supplemental Figure 3: Evaluation of autophagy flux in mature osteoclasts after TBC1D25 down regulation. 9	92

Chapitre 3 : Article 2

Résumé graphique - Graphical abstract.....	94
Figure 1: Expression of galectin-8 and its isoforms in human osteoclasts	99
Figure 2: Modulation of galectin-8 expression using siRNAs	100
Figure 3: MNC formation and galectin-8 inhibition	102
Figure 4: Osteoclast bone resorption and galectin-8 inhibition.	103
Figure 5: Impact of galectin-8 inhibition on MTORC1 signaling.....	105
Figure 6: Effect of inhibiting galectin-8 expression on autophagy flux.....	106

Figure 7: Identification of proteins interacting with galectin-8	109
Figure 7: Identification of proteins interacting with galectin-8	110
Figure 8: Co-immunofluorescence staining of galectin-8 and the chloride channels CLCN3 and CLCN7.	111
Figure 9: Co-immunofluorescence staining of galectin-8 and the lysosomal membrane proteins LAMP1 and LAMP2.	112
Supplemental Figure 1: Impact of galectin-8 isoform-specific inhibition on autophagy and mTORC1 signaling.....	128
Supplemental Figure 2: Spearman's rank correlation matrices of biological replicates.....	129
Supplemental Figure 3: Sequences of galectin-8 isoforms.....	130
Supplemental Figure 4: Analyses of colocalisation between galectin-8 and its interacting partners	131
Supplemental Figure 5: Galectin-8 and LAMP1 expression in a heterogenous cell culture of mononucleated and multinucleated cells.....	132

Chapitre 4 : Discussion

Figure 17: Localisation de TBC1D25 dans l'ostéoclaste actif en condition standard et lors de l'induction de l'autophagie.....	146
Figure 18: Implication de la galectine-8 dans la régulation de l'ostéoclaste	149
Figure 19: Interactome de TBC1D25	157
Figure 20: Colocalisation entre TBC1D25 et LC3B dans l'ostéoclaste actif.....	162
Figure 21: Régulation de l'ostéoclaste mature par TBC1D25	166
Figure 22: Régulation de la résorption osseuse par la galectine-8 et l'isoforme courte	169

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 : Introduction

Tableau 1: L'épissage alternatif dans l'ostéoclaste pagétique.....	28
--	----

Chapitre 2 : Article 1

Table 1: Primer and DsiRNA sequences	69
--	----

Chapitre 3: Article 2

Supplemental Table 1: Interactome of the short and long galectin-8 isoforms.....	133
Supplemental Table 2: CRD ratios.....	137
Supplemental Table 3: Grouping of GO terms.....	138
Supplemental Table 4: Immunoblot antibodies information	139
Supplemental Table 5: Immunofluorescence antibodies information	139
Supplemental Table 6: Sequences of small interfering RNAs (DsiRNA, siRNA)	140

Annexe I

Tableau supplémentaire 1 : Interactome de TBC1D25.....	225
--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AKT1	Sérine/thréonine kinase AKT1	<i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
ATG	Liée à l'autophagie	<i>Autophagy-related</i>
BMP	Protéine morphogénétique osseuse	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMU	Unité multicellulaire de base	<i>Basic multicellular unit</i>
CA2	Anhydrase carbonique 2	<i>Carbonic anhydrase 2</i>
CADM1	Molécule 1 d'adhésion cellulaire	<i>Cell adhesion molecule 1</i>
CBL	Proto-oncogène CBL	<i>CBL proto-oncogene</i>
C-FMS (CSF1R)	Récepteur du facteur 1 de stimulation de colonies	<i>Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CLCN7	Canal de chlore 7 voltage dépendant	<i>Chloride voltage-gated channel 7</i>
CSF2	Facteur de stimulation des colonies 2	<i>Colony stimulating factor 2</i>
CTHRC1	Triple hélice de collagène contenant des répétitions 1	<i>Collagen triple helix repeat containing 1</i>
CTSK	Cathepsine K	<i>Cathepsin K</i>
DKK1	Dickkopf 1 inhibiteur de la voie de signalisation WNT	<i>Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>
4EBP1 (EIF4EBP1)	Protéine 1 de liaison au facteur 4E d'initiation de la traduction eucaryote	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
ERK1/2 (MAPK1 & MAPK3)	Protéine kinase 1 & 3 activée par un mitogène	<i>Mitogen-activated protein kinase 1 & 3</i>
FASLG	Ligand de Fas	<i>Fas ligand</i>
GAP	Protéine activant les GTPases	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	Inhibiteur de dissociation de la guanosine	<i>Guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosine diphosphate	<i>Guanosine diphosphate</i>
GEF	Facteur d'échange de nucléotides guanines	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GTP	Guanosine triphosphate	<i>Guanosine triphosphate</i>
GTPase	Guanosine triphosphatase	<i>Guanosine triphosphatase</i>
IGF1	Facteur de croissance analogue à l'insuline 1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IKBIP	Protéine interagissant avec IKBKB	<i>IKBKB interacting protein</i>
IKBKB	Inhibiteur de la kinase du facteur nucléaire kappa B sous-unité bêta	<i>Inhibitor of nuclear factor-kappa B kinase subunit beta</i>
IL	Interleukine	<i>Interleukin</i>
JNK (MAPK8)	Protéine kinase 8 activée par un mitogène	<i>Mitogen-activated protein 8</i>
LacNac	N-acétyl-D-lactosamine	<i>N-acetyl-D-lactosamine</i>
LAMP	Protéine associée à la membrane lysosomale	<i>Lysosomal-associated membrane protein</i>
LC3 (MAP1LC3)	Protéine 1 chaîne légère 3 associée aux microtubules	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>

LIR	Domaine de liaison aux protéines de la famille d'ATG8	<i>ATG8 family protein-interacting region</i>
M-CSF (CSF1)	Facteur 1 de stimulation des colonies	<i>Colony-stimulating factor 1</i>
MITF	Facteur de transcription associé aux mélanocytes	<i>Melanocyte inducing transcription factor</i>
MMP	Métallopeptidase matricielle	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MTOR	Kinase cible mécanistique de la rapamycine	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>
MTORC1	Complexe 1 de MTOR	<i>MTOR complex 1</i>
MTORC2	Complexe 2 de MTOR	<i>MTOR complex 2</i>
NFATC1	Facteur 1 nucléaire des lymphocytes T activés	<i>Nuclear factor of activated T cells 1</i>
NFKB	Facteur nucléaire kappa B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NMD	Dégradation des ARNm non-sens	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
OPG (TNFRSF11B)	Ostéoprotégérine	<i>Osteoprotegerin</i>
p62 (SQSTM1)	Séquestosome 1	<i>Sequestosome 1</i>
p70 S6K (RPS6)	Protéine ribosomale S6 kinase B2	<i>Ribosomal protein S6 kinase B2</i>
p38 (MAPK14)	Protéine kinase 14 activée par un mitogène	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>
PE	Phosphatidyléthanolamine	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
PI3K (PI3KCA)	Sous-unité catalytique alpha phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 kinase	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 kinase catalytic subunit alpha</i>
PLEKHM1	Membre 1 de la famille M contenant le domaine d'homologie de la pleckstrine	<i>Pleckstrin homology and RUN Domain Containing M1</i>
PSI	Indice de l'épissage alternatif	<i>Splicing index</i>
RANK (TNFRSF11A)	Membre 11a de la superfamille de récepteurs TNF	<i>TNF receptor superfamily member 11a</i>
RANKL (TNFSF11)	Membre 11 de la superfamille TNF	<i>TNF superfamily member 11</i>
RE	Réticulum endoplasmique	<i>Endoplasmic reticulum</i>
RGD	Arginine – Glycine – Acide aspartique	<i>Arginine – Glycine – Aspartic acid</i>
RILP	Protéine escorte des rabs	<i>Rab escort protein</i>
RILP	Protéine lysosomale interagissant avec les rabs	<i>Rab-interacting lysosomal protein</i>
RUNX2	Facteur de transcription 2 de la famille RUNX	<i>RUNX family transcription factor 2</i>
S1P	Sphingosine-1-phosphate	<i>Sphingosine-1-phosphate</i>
SLC4A2	Membre 2 de la famille de transporteurs SLC4	<i>Solute carrier family 4 member 2</i>
SYK	Protéine tyrosine kinase associée à la rate	<i>Spleen associated tyrosine kinase</i>
TAK1 (MAP3K7)	Protéine kinase-kinase kinase 7 activée par un mitogène	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>
TGFB1	Facteur de croissance transformant bêta 1	<i>Transforming growth factor-beta 1</i>
TNF	Facteur de nécrose tumorale	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF	Facteur aux récepteurs TNF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAIL (TNFSF10)	Membre 10 de la superfamille TNF	<i>TNF superfamily member 10</i>

TRAP (ACP5)	Phosphatase acide 5 tartrate-résistante	<i>Acid phosphatase 5, tartrate resistant</i>
UBA	Domaine associé à l'ubiquitine	<i>Ubiquitin-associated domain</i>
V-ATPASE	ATPase vacuolaire de type H ⁺	<i>Vacuolar-type H⁺-ATPase</i>

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Présentation clinique de la maladie de Paget

En 2021, le recensement de la population souligne l'importance de mettre de l'avant les enjeux de santé publique de la population âgée, puisqu'environ un cinquième de la population canadienne est âgé de plus de 65 ans, et 2,3 % sont âgés de plus de 85 ans. (Statistique Canada, 2022a) Par ailleurs, il est estimé que d'ici 25 ans, la population âgée de plus de 85 ans aura triplé. (Statistique Canada, 2022b) Les principaux enjeux sont les risques de chutes et leurs traumatismes subséquents qui augmentent considérablement avec l'âge. Parmi les traumatismes associés, 39 % sont des fractures et 34 % des hospitalisations liés aux chutes sont causés par une fracture de la hanche. De plus, ces événements entraînent des coûts importants pour le système de santé au moment de l'événement, mais aussi sur le long terme, avec la détérioration de la qualité de vie de l'individu suivie généralement de son placement en institution. (Agence de la santé publique du Canada, 2022, 2020; Statistique Canada, 2021)

Plusieurs facteurs influencent le risque de chutes et les traumatismes associés, dont les maladies métaboliques osseuses qui augmentent le risque de fractures. (Zimmermann et al., 2015) Il est bien connu que la première cause de l'augmentation du risque de fracture avec l'âge est l'ostéoporose, la maladie métabolique osseuse ayant la plus grande prévalence au Canada. L'ostéoporose est caractérisée par une diminution de la densité osseuse diminuant la force de l'os. En 2016, environ 12% de la population canadienne âgée de 40 ans avait reçu un diagnostic d'ostéoporose et parmi cette population, 80% étaient des femmes. La forte prévalence de l'ostéoporose chez les femmes corrèle avec la proportion plus élevée de femmes qui sont hospitalisées suite à un traumatisme lié à une chute. (Agence de la santé publique du Canada, 2022, 2020)

Bien que l'augmentation du risque de fractures soit moindre comparée à l'ostéoporose, la maladie de Paget, la deuxième maladie métabolique osseuse la plus fréquente contribue à la fragilisation de l'os. En plus de l'augmentation du risque de fractures associé à la maladie de Paget, certains symptômes de cette maladie rendent les patients plus susceptibles aux chutes tels que les troubles de la marche ou la douleur. (Agence de la santé publique du Canada, 2014; Gendron et al., 2023)

La maladie de Paget constitue le centre d'intérêt de plusieurs études du laboratoire. Elle est caractérisée par une résorption osseuse excessive suivie d'une formation osseuse désordonnée qui

fragilise l'os. Cette maladie à révélation tardive est très rare avant l'âge de 40 ans. Il est estimé qu'environ 2 % de la population âgée 50 ans en est atteint et que ce taux augmente avec l'âge, atteignant 5 % à 10 % chez la population âgée de 80 ans et plus. (Banaganapalli et al., 2023) La prévalence est très variable d'une région à l'autre du globe et même dans différentes régions à l'intérieur d'un pays. La plus haute prévalence a été observée au Royaume-Uni, mais elle reste élevée dans d'autres pays d'Europe (France, Italie et Espagne) ainsi que dans plusieurs pays ayant connu une forte immigration provenant de ces pays dans le passé (Canada, Australie, États-Unis, Nouvelle-Zélande et Afrique du Sud). Bien que la prévalence de la maladie soit en baisse depuis les dernières décennies, la maladie de Paget reste tout de même la deuxième maladie métabolique osseuse la plus fréquente. (Alaya et al., 2018; Singer, 2015)

Le remaniement pagétique affecte majoritairement le squelette axial : le bassin, les vertèbres et le crâne; ainsi que les os des membres inférieurs supportant le poids du corps : le fémur et le tibia. Bien que la proportion des cas impliquant ces différents sites varie selon les cohortes étudiées, au moins un de ces os est affecté dans 95 % des cas. (Gendron et al., 2023; Tan et Ralston, 2014; Wermers et al., 2008) Historiquement, l'affection était majoritairement polyostotique, c'est-à-dire qu'il y avait plusieurs os touchés, sans affecter l'intégralité du squelette. La sévérité de la maladie a toutefois diminué dans les dernières décennies et il y a une augmentation des diagnostics monostotiques, c'est-à-dire qu'un seul os est affecté par le remaniement pagétique. (Gendron et al., 2023; Guay-Bélanger et al., 2015) La maladie est dite « à progression lente » alors qu'il est estimé que les lésions lytiques progressent d'un peu moins d'un centimètre par année. Au niveau des os longs des membres inférieurs, le front lytique est plus facilement distinguable et débute à l'extrémité de l'os, généralement à l'épiphyse ou la métaphyse proximale, pour s'étendre graduellement à l'entièreté de celui-ci sans franchir l'articulation. (Malghem et al., 2005; Renier et al., 1996) Le front lytique du remaniement pagétique des os du squelette axial est difficilement distinguable. De plus, le site d'initiation semble varié au niveau du crâne ou du bassin alors que la radiographie peut identifier différents sites affectés. Dans le cas des vertèbres, le site d'initiation est impossible à identifier puisque l'atteinte s'étend à l'entièreté du corps vertébral même lors de la phase initiale montrant des lésions lytiques. (Cundy, 2018; Dell'Atti et al., 2007) À la suite du diagnostic, il n'y a habituellement pas de nouvelles lésions lytiques, probablement du fait de l'installation de la maladie qui débute bien avant son diagnostic. (Singer, 2015) Toutefois, la maladie de Paget est souvent asymptomatique et est diagnostiquée de manière fortuite, à la suite d'analyses

sanguines ou de radiographies prescrites dans diverses situations qui ne sont pas reliées aux symptômes communs de la maladie. (Alaya et al., 2018)

Le remaniement pagétique entraîne des complications dans environ 30 % des cas, qui diminuent la qualité de vie des sujets sans affecter leur espérance de vie. La douleur constitue le symptôme le plus courant. Elle peut être due à diverses complications, ou alors associée au remaniement pagétique lorsque localisée aux sites affectés. La fragilisation de l'os résultant du remaniement pagétique augmente le risque de fractures, en particulier aux membres inférieurs du corps, mais les fractures ne se produisent pas exclusivement aux membres inférieurs puisque la fracture est le symptôme le plus courant lors d'une atteinte au niveau des vertèbres. (Dell'Atti et al., 2007; Lombardi et al., 2022; Tuck et al., 2017) L'hypertrophie osseuse peut entraîner des déformations des os pagétiques causant diverses complications neurologiques, telles que des compressions de nerfs ou la perte d'audition lors d'atteintes des os crâniens. (Alaya et al., 2018; Tan et Ralston, 2014; Wermers et al., 2008) Parmi les symptômes les plus communs se trouve aussi l'arthrose secondaire nécessitant plus souvent une arthroplastie. (Alaya et al., 2018; Arif et al., 2023) Bien que la sévérité diminue, certains symptômes fréquemment observés et invalidants restent couramment associés à la maladie. Parmi eux, la douleur, la perte d'audition et l'arthrose secondaire sont les plus fréquents chez les patients atteints de la maladie de Paget au Québec dans les dernières décennies. (Gendron et al., 2023) Ainsi, une meilleure compréhension de la maladie est nécessaire afin d'élaborer des stratégies pour la diagnostiquer et la traiter avant l'apparition de symptômes invalidants. Cela permettrait aussi de mieux caractériser la biologie de l'ostéoclaste et pourrait contribuer à l'élaboration de nouveaux traitements pour des maladies osseuses causées par une résorption osseuse excessive.

1.2 Le remodelage osseux

Afin de maintenir l'intégrité du squelette, le tissu osseux s'active métaboliquement en réponse aux stimuli systémiques et locaux. À l'âge adulte, le remodelage osseux constant permet à la fois la réparation des micro-dommages subis par le squelette, et le renouvellement de l'os pour maintenir sa force, sa densité et sa rigidité. Ceci permet entre autres au squelette de maintenir la structure du corps humain, d'être impliqué dans le mouvement et de protéger les organes vitaux.

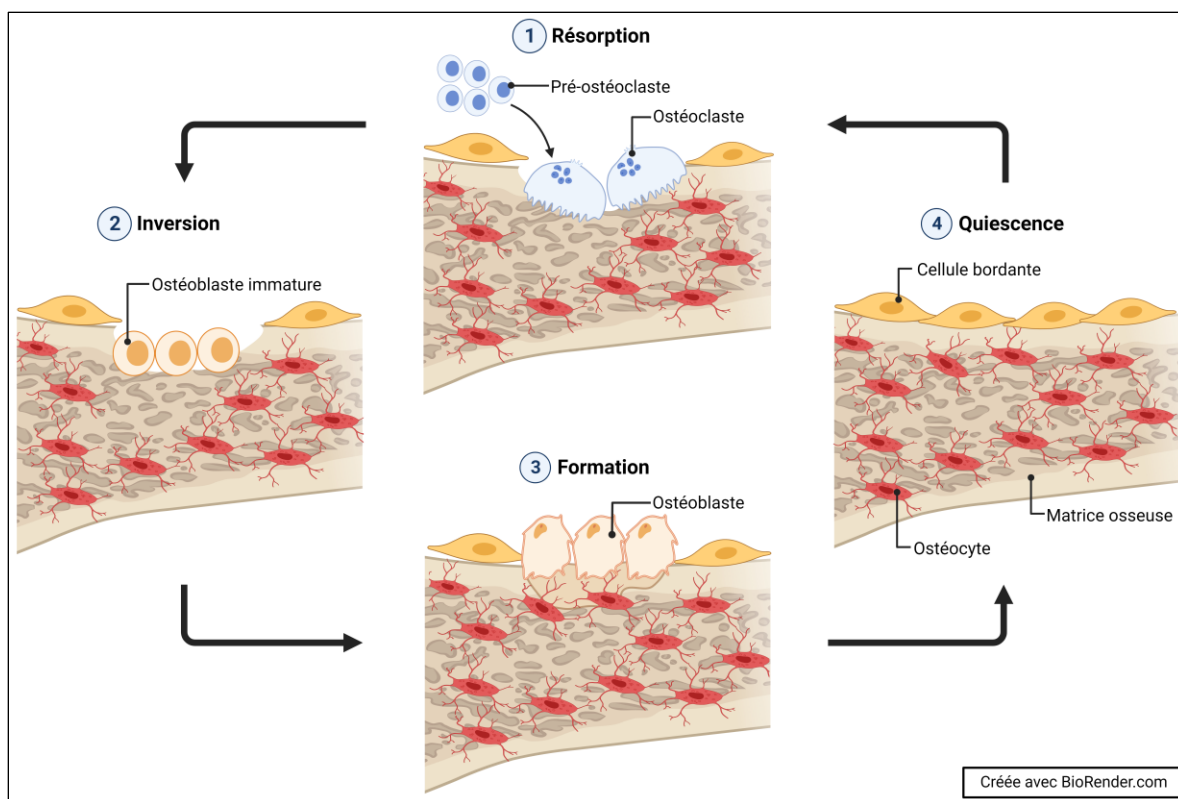


Figure 1: Le remodelage osseux

L'initiation du remodelage débute par le recrutement des précurseurs ostéoclastiques. Lorsqu'ils sont matures, les ostéoclastes en contact avec la matrice osseuse procèdent à la résorption. L'étape d'inversion permet le recrutement des précurseurs ostéoblastiques au site et leur différenciation en ostéoblastes matures, qui synthétisent la nouvelle matrice osseuse. Finalement, durant la période de quiescence, certains ostéoblastes deviennent des cellules bordantes à la surface de la nouvelle matrice pour empêcher le contact des ostéoclastes avec la matrice osseuse jusqu'à l'initiation d'un nouveau cycle.

Lors du remodelage osseux, il y a création de l'unité multicellulaire de base (BMU), où quatre types cellulaires sont influencés par divers stimuli et communiquent entre eux pour coordonner leurs activités. La BMU est composée d'ostéoclastes, d'ostéoblastes, d'ostéocytes et de cellules bordantes. La première étape du remodelage osseux est le recrutement des précurseurs ostéoclastiques. Lorsqu'ils sont matures et en contact avec la matrice osseuse, les ostéoclastes procèdent à la dégradation de l'os. Ensuite, la phase d'inversion permet le recrutement des précurseurs ostéogéniques. Les ostéoblastes devenus matures procèdent alors à la synthèse de nouvelle matrice osseuse organique, suivie par la minéralisation de celle-ci. Lors de la minéralisation, certains ostéoblastes sont incorporés dans la matrice minéralisée et subissent un changement phénotypique donnant naissance aux ostéocytes. (Florencio-Silva et al., 2015; Siddiqui et Partridge, 2016) Une autre portion de la population ostéoblastique devient quiescente. Ces cellules représentent les cellules bordantes et sont localisées à la surface de la nouvelle matrice

osseuse pour la protéger de la dégradation. (Figure 1) Ce processus permet le renouvellement d'environ 5 % à 10 % du squelette adulte annuellement. (Walsh, 2015) En condition physiologique, la fine régulation du processus permet l'obtention d'un équilibre grâce au couplage spatial et temporel de la résorption osseuse et de la formation osseuse. (Boyle et al., 2003)

1.2.1 Les cellules mésenchymateuses impliquées dans le remodelage osseux

Trois des quatre types cellulaires présents dans la BMU sont des cellules ostéogéniques provenant de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Ces cellules stromales peuvent se différencier en ostéoblastes, en adipocytes ou en chondrocytes. La présence de facteurs spécifiques est donc nécessaire pour leur engagement dans la voie ostéogénique menant à leur différenciation en ostéoblaste mature. Parmi les facteurs spécifiques se trouve le facteur de transcription 2 de la famille RUNX (RUNX2) exprimé grâce à l'activation des voies de signalisation des protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), WNT et des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGFB1) et le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1). (Q. Chen et al., 2016; Ponzetti et Rucci, 2021) L'augmentation de l'expression de RUNX2 permet la prolifération des précurseurs ostéogéniques et l'expression de divers récepteurs pour les étapes de différenciation ultérieures. En réponse à l'activation de voies de signalisation supplémentaires telles que celle du TGFB1, les ostéoblastes immatures expriment ostérix, un second facteur de transcription crucial à leur différenciation terminale. De nouveau influencé par les voies de signalisation de WNT, TGFB1 et par des facteurs de croissance, l'ostéoblaste mature exprime alors les gènes nécessaires à la formation de la nouvelle matrice osseuse, qui sera effectuée en deux étapes. (Amarasekara et al., 2021; Florencio-Silva et al., 2015; Long, 2011)

Dans un premier temps, la composante organique de la matrice osseuse est formée, composée majoritairement de fibres de collagènes de type 1 déposées en couches alternées, formant une structure lamellaire. (Tranquilli Leali et al., 2009; Walsh, 2015). Il y a aussi sécrétion de protéines ostéogéniques telles que l'ostéocalcine, l'ostéopontine et les sialoprotéines osseuses qui non seulement forment la matrice organique du tissu conjonctif, mais régulent aussi sa minéralisation. Dans un deuxième temps, des ions calcium et phosphate s'accumulent à l'intérieur de vésicules extracellulaires, déposées sur les fibres de collagène. Lorsque la concentration en ions au sein des vésicules dépasse le point de solubilité, des cristaux d'hydroxyapatite se forment et ces derniers augmentent en taille durant le processus afin de permettre la minéralisation de la matrice organique. (Burr, 2019; Capulli et al., 2014) Durant cette seconde étape, certains ostéoblastes sont

emprisonnés dans la matrice osseuse et subissent plusieurs changements morphologiques permettant leur différenciation en ostéocyte. Les ostéocytes possèdent des ramifications qui s'étendent à l'intérieur des canalicules de l'os. Ces ramifications leur permettent d'interagir entre eux et avec les cellules à la surface osseuse, par l'entremise de jonctions communicantes et des fluides interstitiels des canalicules. Après leurs activités, les ostéoblastes matures peuvent perdre leurs organites sécrétoires caractéristiques et devenir des cellules bordantes quiescentes à la surface de la matrice nouvellement synthétisée. L'arrêt de l'activité ostéoblastique peut aussi être induit par apoptose. (Capulli et al., 2014; Florencio-Silva et al., 2015) Les signaux dictant la destinée de l'ostéoblaste à la suite de la formation de nouvelle matrice osseuse restent inconnus, mais il a été établi qu'entre 50% et 70% des ostéoblastes entrent en apoptose alors que 5% à 20% se différencient en ostéocytes. (Delgado-Calle and Bellido, 2022; Franz-Odenaal et al., 2006; Katsimbri, 2017) Ces proportions varient avec l'âge alors qu'une diminution du nombre de cellules bordantes et d'ostéocytes a été observée suggérant une augmentation du nombre d'ostéoblastes destinés à l'apoptose. (Burr, 2019; Franz-Odenaal et al., 2006; Sfeir et al., 2022)

1.2.2 Régulation du remodelage osseux par les cellules de la BMU

Comme mentionné auparavant, le couplage spatial et temporel de la résorption et de la formation osseuse permet d'obtenir un équilibre entre les deux processus pour le maintien de l'intégrité de l'os. Plusieurs facteurs exprimés et sécrétés par les cellules de la BMU permettent ce couplage crucial lors du remodelage osseux. Des stimuli locaux permettent l'initiation du remodelage osseux ainsi que le couplage entre la résorption et la formation osseuse. (Delaisse et al., 2020; Matsuo and Irie, 2008)

Bien qu'ils soient intégrés dans la matrice osseuse, les ostéocytes sont responsables de l'intégration des signaux mécaniques pour initier et moduler le remodelage osseux. Ainsi, l'ostéocyte agit comme mécanorécepteur. Une force excessive ou une sous-utilisation de l'os provoque leur apoptose suivie de la sécrétion du membre 11 de la superfamille TNF (TNFSF11) aussi connu comme le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANKL) par les ostéocytes adjacents. L'ostéocyte est d'ailleurs la source la plus importante de RANKL, facteur ostéoclastogénique. Les ostéocytes peuvent aussi réguler la différenciation et l'activité des ostéoclastes par la sécrétion d'un second facteur ostéoclastogénique, le facteur 1 de stimulation des colonies (M-CSF (CSF1)), et de l'ostéoprotégérine (OPG (TNFRSF11B)), un récepteur leurre qui séquestre RANKL. L'importance de ces facteurs dans la différenciation et l'activité des ostéoclastes

sera discutée en détail dans la section suivante. De plus, les ostéocytes régulent négativement la différenciation des ostéoblastes par la sécrétion de dickkopf 1 inhibiteur de la voie de signalisation WNT (DKK1) et de la sclérostine, deux antagonistes de la voie de signalisation de WNT. (Figure 2) (Delgado-Calle et Bellido, 2022; Palumbo et Ferretti, 2021)

Les cellules bordantes influencent aussi l'initiation du remodelage osseux sans toutefois être les principales régulatrices du processus. Leur rôle principal est de couvrir la matrice osseuse pour empêcher le contact de l'ostéoclaste avec celle-ci. Toutefois, les cellules bordantes peuvent aussi réguler l'ostéoclastogénèse puisqu'elles expriment RANKL et OPG. Bien qu'elles soient considérées comme quiescentes, les cellules bordantes favorisent l'adhésion des ostéoclastes via la sécrétion de métallopeptidases matricielles (MMPs) qui exposent les fibres de collagène de la matrice osseuse et favorise l'initiation du remodelage osseux. (Delaisse et al., 2020; Florencio-Silva et al., 2015)

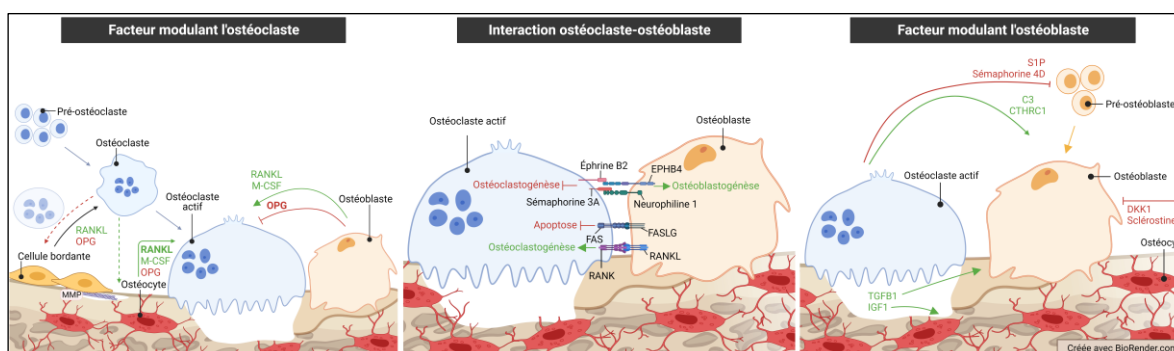


Figure 2: Régulation des cellules de la BMU par les facteurs de couplage

Les cellules de la BMU influencent leurs activités par la sécrétion de facteurs ou la communication cellule-cellule. Les cellules mésenchymateuses modulent les activités de l'ostéoclaste par la sécrétion de RANKL, de M-CSF et de l'OPG. Plusieurs contacts cellule-cellule entre l'ostéoclaste et l'ostéoblaste modulent leurs activités et facilite le passage de la résorption vers la formation osseuse. De plus, les cellules de la BMU, dont l'ostéoclaste, régulent positivement et négativement l'ostéoblaste par la sécrétion de facteurs. Finalement, durant la résorption osseuse, l'ostéoclaste libère des facteurs de la matrice osseuse qui influencent le remodelage osseux.

Tout comme les ostéocytes et les cellules bordantes, les ostéoblastes favorisent l'ostéoclastogénèse par la sécrétion de RANKL et M-CSF. (Kim et al., 2020; O'Brien, 2010) De plus, ils peuvent inhiber la différenciation et l'activité des ostéoclastes par l'expression d'OPG. L'ostéoblaste est d'ailleurs la plus grande source d'OPG dans le micro-environnement osseux dont l'expression est induite par la voie de signalisation de TGF β 1. (Delgado-Calle et Bellido, 2022; Thirunavukkarasu et al., 2001) La communication cellule-cellule entre l'ostéoblaste et l'ostéoclaste module aussi les événements séquentiels du remodelage osseux. Le ligand de Fas (FASLG) peut mettre fin à l'activité des ostéoclastes et induire leur apoptose via un contact cellule-cellule. (Chen et al., 2018; Kim et al., 2020) La proximité des cellules de la BMU favorise aussi leur régulation via la

signalisation bidirectionnelle lors de contacts cellule-cellule. Divers signaux bidirectionnels dirigent la transition de l'étape de résorption à l'étape de formation osseuse. La signalisation inverse impliquant l'éphrine B2 à la surface des ostéoclastes, et le récepteur EPHB4, à la surface des ostéoblastes, inhibe l'ostéoclastogénèse en bloquant la cascade de signalisation de RANKL et favorise la différenciation et la survie des ostéoblastes par l'activation du récepteur tyrosine kinase. (Durdan et al., 2022; Matsuo et Otaki, 2012) De plus, l'interaction entre sémaphorine 3A, retrouvée à la surface des ostéoclastes, et neurophiline-1, à la surface des ostéoblastes, facilite le passage vers la phase de formation osseuse en inhibant l'ostéoclastogénèse et en favorisant l'ostéoblastogénèse par l'activation de la voie canonique de WNT. (Kim et al., 2020; Teti, 2013)

Les cellules mésenchymateuses de la BMU ne sont pas les seules à réguler le remodelage osseux. Certains facteurs tels que spingosine-1-phosphate (S1P) et sémaphorine 4D sont sécrétés par les ostéoclastes afin de réguler négativement les ostéoblastes, permettant à la cellule de procéder à la résorption osseuse. Cependant, les ostéoclastes sécrètent des facteurs tels que la triple hélice de collagène contenant des répétitions 1 (CTHRC1) et des ligands des voies de signalisation de WNT et des BMPs pour favoriser la différenciation et l'activité des ostéoblastes. (Teti, 2013; Zhu et al., 2018) Enfin, durant la résorption osseuse, les ostéoclastes libèrent IGF1 de la matrice osseuse. IGF1 favorise la différenciation de l'ostéoblaste et influence les fonctions de mécanorécepteurs de l'ostéocyte. (Tian et al., 2018) La résorption osseuse libère aussi le TGF β 1 de la matrice osseuse, qui est important pour la maturation des ostéoblastes ainsi que l'expression d'OPG. (Kim et al., 2020; Park-Min et Lorenzo, 2022; Thirunavukkarasu et al., 2001) Tous les types cellulaires composant la BMU assurent donc la fine régulation du remodelage osseux.

1.2.3 Le remodelage osseux dans la maladie de Paget

Des défauts de différenciation ou d'activité d'une des cellules mènent à une perturbation de l'équilibre entre la résorption et la formation osseuse, affectant la structure de l'os. Cette altération de l'équilibre est présente lors du remaniement pagétique avec un remodelage osseux accéléré. Les os affectés par la maladie présentent initialement des lésions lytiques, signe d'hyperactivité des ostéoclastes. Ces lésions prendront progressivement l'apparence de lésions sclérotiques causées par une surcompensation des ostéoblastes. De nouvelles fibres de collagènes sont alors déposées de manière anarchique pour remplacer la matrice osseuse dégradée, donnant forme à une structure d'os tissé. Par conséquent, le nouvel os est de moindre qualité et hypertrophié. (Alaya et al., 2018; Valenzuela et Pietschmann, 2017) Les ostéoclastes ont été identifiés comme responsables du

désordre, en raison de la phase initiale de résorption excessive et de leurs caractéristiques phénotypiques anormales. Même si leur morphologie reste normale, certaines évidences suggèrent une altération du phénotype des ostéoblastes et des ostéocytes lors du remaniement pagétique. Les ostéoblastes pagétiques expriment de manière augmentée l'inhibiteur de la voie WNT, DKK1, ce qui influence négativement leur différenciation. De plus, une production diminuée d'ostéocalcine et de sialoprotéines osseuses par les ostéoblastes pagétiques *in vitro* suggère que ces cellules ont un phénotype immature aux sites du remaniement pagétique. (Naot et al., 2007) Très récemment, les ostéocytes ont également été impliqués dans le remodelage osseux anormal observé dans la maladie de Paget. Toutefois, leurs caractéristiques atypiques seraient causées par le phénotype anormal des ostéoclastes qui produisent plus d'IGF1 dans le micro-environnement osseux et altèrent le phénotype des ostéocytes des os pagétiques. Les ostéocytes pagétiques produisent moins de sclérostine, un inhibiteur de la voie WNT, et ont une production plus élevée de RANKL. (Miyagawa et al., 2023) Bien que le phénotype des cellules mésenchymateuses puisse également être anormal, les ostéoclastes restent certainement le principal acteur du remodelage osseux désordonné, dû à son phénotype altéré et à sa production augmentée de facteurs de couplage, affectant les cellules adjacentes et menant à la formation d'un os fragilisé.

1.3 L'ostéoclaste

1.3.1 L'ostéoclastogénèse

L'ostéoclaste étant la cellule responsable de l'initiation du désordre du remodelage osseux de la maladie de Paget, le laboratoire de Dre Roux s'est intéressé spécifiquement à caractériser son phénotype dans cette pathologie osseuse. L'ostéoclaste est une cellule multinucléée dérivée de la fusion de cellules mononucléées hématopoïétiques appartenant à la lignée monocyte-macrophage. (Figure 3) Dans un premier temps, le facteur de transcription SPI1, aussi connu sous le symbol PU.1, est essentiel à l'engagement des cellules hématopoïétiques myéloïdes vers la lignée monocyttaire, induisant ainsi l'expression du récepteur du facteur 1 de stimulation de colonies (C-FMS (CSF1R)), le récepteur du M-CSF. Ce dernier induit la première voie de signalisation nécessaire à la différenciation, la survie et l'activité de la cellule. L'activation de ce récepteur favorise également la prolifération et la survie des précurseurs. (Asagiri et Takayanagi, 2007) De plus, il permet l'expression du membre 11a de la superfamille de récepteurs TNF (RANK (TNFRSF11A)) et du facteur de transcription associé aux mélanocytes (MITF), un second facteur de transcription important dans l'ostéoclastogénèse. (Touaitahuata et al., 2014) Une fois la voie de signalisation de RANK activée,

Les précurseurs de la lignée monocyte-macrophage s'engagent vers la lignée ostéoclastique. La signalisation de RANK active le facteur nucléaire kappa B (NF κ B), et en collaboration avec JUN et FOS, ils permettent l'expression du facteur 1 nucléaire des lymphocytes T activés (NFATC1). Ce dernier est un facteur de transcription essentiel pour l'expression de gènes impliqués dans la fusion des précurseurs mononucléés et l'activité de résorption. (Boyce, 2013; Teitelbaum et Ross, 2003) Les ostéoclastes matures obtenus grâce à cette fusion peuvent contenir un nombre variable de noyaux, allant de 3 à 20 en condition physiologique et pouvant atteindre jusqu'à 100 noyaux par cellule en condition pathologique. (Roodman et Windle, 2005) L'ostéoclaste mature diffère des macrophages par la présence du récepteur de la calcitonine (CTR), de RANK et surtout par leur capacité à résorber l'os grâce à l'expression d'intégrines α V β 3, de phosphatases telles que la phosphatase acide 5 tartrate-résistante (TRAP), d'enzymes protéolytiques telles que la cathepsine K (CTSK) et de MMPs telles que MMP9. (Takeshita et al., 2000; Wang et al., 2011)

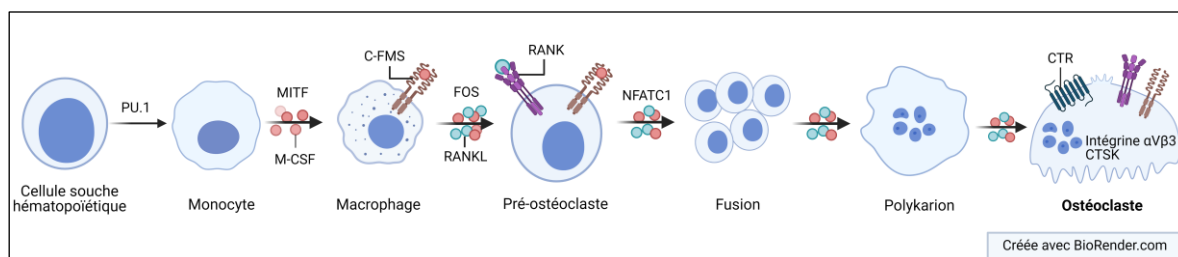


Figure 3: L'ostéoclastogénèse

L'ostéoclaste est une cellule multinucléée provenant de la fusion des cellules hématopoïétiques de la lignée monocyte-macrophage. Sa différenciation est régulée par plusieurs facteurs de transcription, ainsi que par M-CSF et RANKL. L'activation de C-FMS permet l'expression de RANK. Par la suite, l'activation de RANK permet l'expression de l'un des principaux facteurs de transcription de l'ostéoclaste, NFATC1, qui à son tour active l'expression des gènes nécessaires à la fusion et à l'activité de résorption de l'ostéoclaste.

1.3.2 La résorption osseuse

L'ostéoclaste mature s'active et ne procède à la résorption osseuse qu'au contact de la matrice osseuse. Lorsque ses intégrines reconnaissent des séquences arginine-glycine-acide aspartique (RGD), il se polarise et forme quatre domaines distincts. (Figure 4) Le domaine apical de l'ostéoclaste actif comprend deux structures caractéristiques de la résorption osseuse: la zone de scellement et la membrane plissée. Les deux domaines additionnels participent aux échanges avec le milieu extracellulaire. Les parois latérales de la cellule forment le domaine basolatéral, qui contient de nombreuses protéines transmembranaires favorisant les échanges d'ions et de métabolites avec le milieu extracellulaire. Le domaine fonctionnel sécrétoire, pour sa part, se situe au sommet de

l'ostéoclaste actif et permet l'exocytose des produits issus de la dégradation osseuse. (Cappariello et al., 2014; Salo et al., 1996)

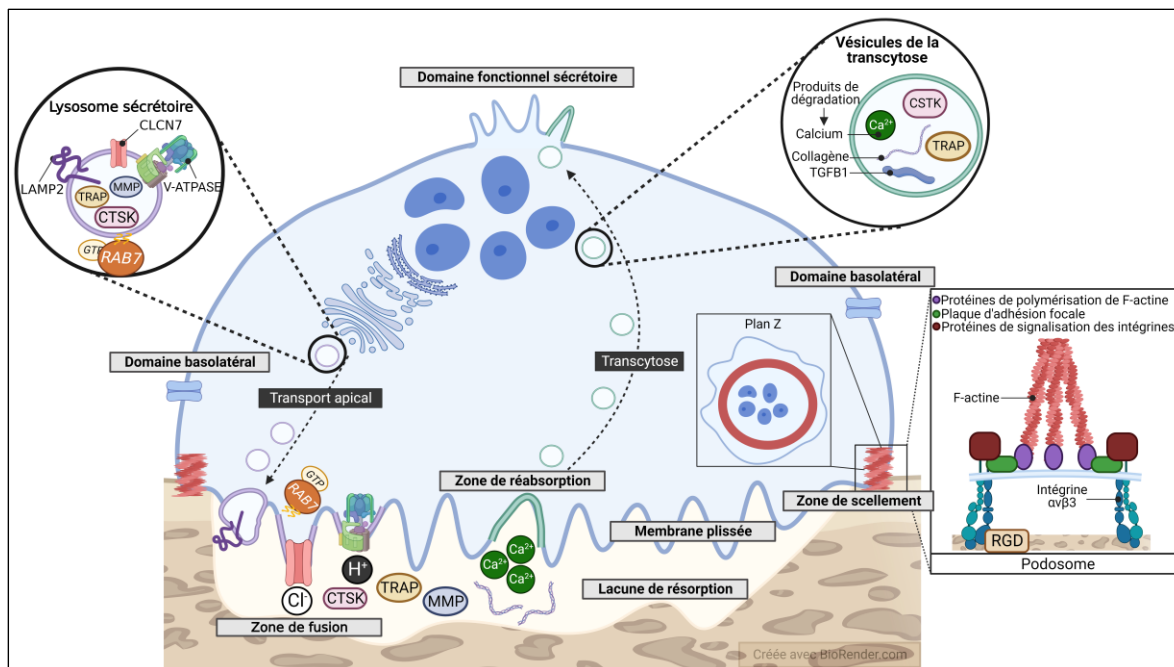


Figure 4: Les domaines de l'ostéoclaste actif

Lorsque des motifs RDG sont reconnus à l'intérieur de la matrice osseuse, l'ostéoclaste subit un réarrangement de son cytosquelette et se polarise. La cellule polarisée possède alors quatre domaines distincts. La zone de scellement est formée de podosomes très rapprochés, créant une zone hermétique entre la cellule et la matrice osseuse. La membrane plissée est formée par le transport apical des lysosomes sécrétoires et leur fusion avec la membrane plasmique adjacente à l'os, qui permet l'insertion de protéines membranaires telles que CLCN7 et V-ATPASE et la sécrétion d'enzymes telles que TRAP, CTSK et des MMPs. La fusion des lysosomes se produit en périphérie de la membrane plissée, tandis que l'endocytose des produits de dégradation de la matrice osseuse a lieu à la zone de réabsorption au centre du domaine. Les produits sont transportés par transcytose au domaine sécrétoire fonctionnel, où ils sont sécrétés. Les domaines basolatéraux sont situés aux parois latérales de l'ostéoclaste actif.

Au début du processus, la reconnaissance de la matrice déclenche l'adhésion puis la réorganisation du cytosquelette, menant à la polarisation de l'ostéoclaste. La création de la zone de scellement est le résultat du réarrangement du cytosquelette à la suite de la polarisation. Cette structure crée un environnement hermétique entre la cellule et la matrice osseuse, permettant l'acidification du compartiment de résorption et favorisant la dégradation de l'os isolé du milieu extracellulaire. (Soysa et Alles, 2016) La zone de scellement est composée de nombreux podosomes très rapprochés contenant un noyau de F-actine. La zone de scellement se distingue par sa hauteur et sa largeur imposante (environ 4 μm). En plus de l'actine, l'intérieur du podosome contient des protéines associées à sa polymérisation. En périphérie, le podosome est composé de protéines de

signalisation régulant la réorganisation du cytosquelette qui sont recrutées par les intégrines. (Georgess et al., 2014) L'intégrine $\alpha V\beta 3$ est caractéristique de la zone de scellement des ostéoclastes et régule l'organisation des podosomes par sa signalisation de l'extérieur vers l'intérieur. L'activation des intégrines par la reconnaissance de séquences RGD, présentes notamment dans l'ostéopontine et les sialoprotéines osseuses, permet le recrutement de la protéine tyrosine kinase signalétique SRC, qui à son tour recrute et active le proto-oncogène CBL (CBL) et la sous-unité catalytique phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K). Cette cascade de signalisation active des guanosines triphosphatases (GTPases) RHO, RAC1 et CDC42, et recrute des protéines formant les plaques d'adhésion focale. (Soysa et Alles, 2016; Touaitahuata et al., 2014) Le noyau d'actine et la structure périphérique formée par l'intégrine sont liés à la myosine et à l'actinine, et sont aussi stabilisés par les microtubules. (Jurdic et al., 2006; McMichael et al., 2010a) Ces structures ont une courte durée de vie et sont constamment renouvelées. Lorsque l'ostéoclaste migre vers un nouveau site de résorption osseuse, les podosomes s'espacent. Ce motif de podosomes espacés peut également être observé chez les ostéoclastes non polarisés qui adhèrent à une matrice autre que l'os. (Georgess et al., 2014; Touaitahuata et al., 2014)

À l'intérieur de la zone de scellement se trouve la membrane plissée qui présente plusieurs extensions de la membrane plasmique de formes variées. Ces extensions résultent de la fusion des lysosomes sécrétoires avec la membrane plasmique adjacente à l'os. Les vésicules sécrétoires contiennent des enzymes protéolytiques telles que la CTSK et des protéines membranaires caractéristiques du lysosome, telles que RAB7, les protéines associées à la membrane lysosomale (LAMPs), le canal de chlore 7 voltage-dépendant (CLCN7) et l'ATPase vacuolaire de type H^+ (V-ATPASE). (M. Mulari et al., 2003; Stenbeck et Horton, 2004) Elles sont transportées à la membrane plasmique apicale par l'intermédiaire des microtubules, où elles fusionnent avec celle-ci grâce à la synaptotagmine 7. (Zhao et al., 2008; Zhao and Ross, 2007) La fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique adjacente à l'os permet la sécrétion du contenu de la vésicule dans la lacune de résorption ainsi que l'insertion des protéines membranaires du lysosomes dans la membrane plissée.

Tout comme la zone de scellement, la membrane plissée participe à l'acidification de la lacune de résorption pour permettre la dégradation de la matrice osseuse. L'acidification de l'environnement hermétique formé par la zone de scellement implique dans un premier temps l'anhydrase carbonique 2 (CA2) qui se retrouve dans le cytosol de l'ostéoclaste et produit des protons intracellulaires. CA2 catalyse la conversion de dioxyde de carbone (CO_2) et d'eau (H_2O) en

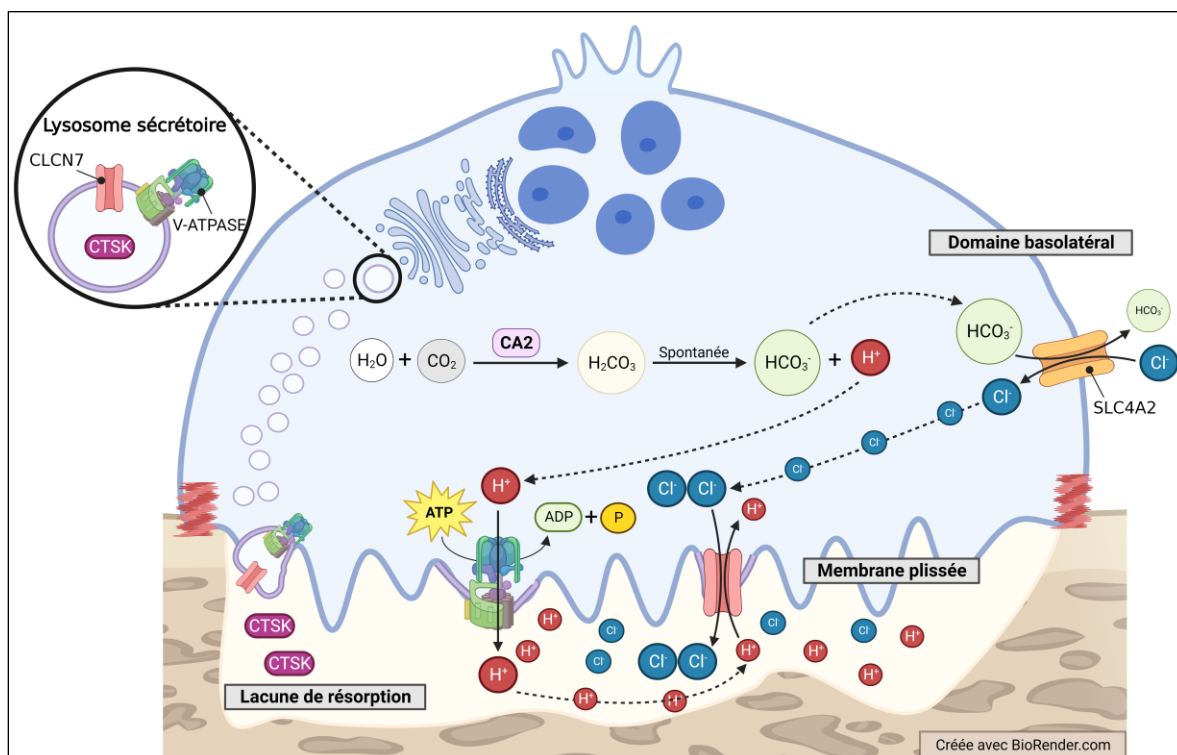


Figure 5: L'acidification de la lacune de résorption osseuse

CA2 intracellulaire catalyse la conversion d'eau et de dioxyde de carbone en acide carbonique qui se dissocie spontanément en ions hydrogène et bicarbonate. La V-ATPASE, insérée dans la membrane plissée, hydrolyse l'ATP produisant l'énergie nécessaire au transfert d'ions hydrogène vers la lacune de résorption osseuse. Les ions bicarbonates intracellulaires sont échangés par des ions chlore extracellulaires par le transporteur SLC4A2 au domaine basolatéral. Deux ions chlore sont par la suite transportés vers la lacune de résorption osseuse en échange d'un ion hydrogène par CLCN7, deuxième protéine de la membrane plissée essentielle à l'acidification de la lacune de résorption. L'acidité de la lacune permet la dégradation de la matrice inorganique en plus d'activer les protéines lysosomales telles que CTSK.

acide carbonique (H_2CO_3). L'acide carbonique se dissocie spontanément en ions hydrogène et bicarbonate. (Gruber, 2015; Ribet et al., 2021) Parmi les protéines insérées dans la membrane plissée, la V-ATPASE permet l'hydrolyse d'ATP intracellulaire produisant l'énergie nécessaire au transfert des ions hydrogène vers le compartiment de résorption et ainsi est essentielle à son acidification. (Ribet et al., 2021; Väänänen et al., 1990) Les ions bicarbonate intracellulaires sont échangés contre des ions chlore extracellulaires par le membre 2 de la famille de transporteurs SLC4 (SLC4A2) localisé au domaine basolatéral. Les ions chlore sont ensuite exportés dans la lacune de résorption osseuse par CLCN7. (Gruber, 2015; Ribet et al., 2021) CLCN7, seconde protéine transmembranaire caractéristique de la membrane plissée, permet l'entrée de deux ions chlore intracellulaires dans la lacune de résorption osseuse en échange d'un proton localisé dans la lacune de résorption osseuse. (Kornak et al., 2001) L'équilibre ionique de l'ostéoclaste est donc préservé

grâce à des échangeurs, des pompes et des canaux ioniques. (Ribet et al., 2021) CLCN7 et V-ATPASE insérés dans la membrane plissée permettent l'acidification de la lacune de résorption et maintiennent le pH à 4,5 ce qui permet la dissolution de la matrice inorganique de l'os. Comme mentionné auparavant, la fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane plasmique adjacente à l'os entraîne également la libération de CTSK, une enzyme lysosomale activée par le milieu extracellulaire acide, qui dégrade le collagène. (Figure 5) TRAP et certaines MMPs telles que MMP9 sont aussi présentes dans la lacune de résorption, mais leur rôle respectif n'est pas encore bien défini. (Cappariello et al., 2014; Soysa et Alles, 2016)

La membrane plissée est divisée en deux sous-domaines. La zone de fusion se trouve en périphérie, près de la zone de scellement, et est l'endroit où les lysosomes sécrétoires fusionnent avec la membrane plasmique. Le domaine d'absorption procède pour sa part à l'endocytose des produits de la dégradation pour la transcytose. (M. T. K. Mulari et al., 2003) La lacune de résorption contient une concentration élevée de calcium, de phosphate et de fragments de collagène issus de la dégradation de la matrice osseuse. Ces produits sont endocytés par l'ostéoclaste au niveau central de la membrane plissée, puis transportés par transcytose au domaine fonctionnel sécrétoire, où leur exocytose prend place. La CTSK et TRAP sont aussi localisées à l'intérieur de ces vésicules et poursuivent la dégradation matricielle, favorisant ainsi la sécrétion des facteurs séquestrés dans la matrice. Ces produits sécrétés, tels que TGF β 1 et IGF1, modulent l'activité des cellules de la BMU, et contribue au couplage entre la résorption et la formation osseuse. (Figure 4) (Mirkka J Hirvonen et al., 2013; Kim et al., 2020; Salo et al., 1997)

L'ostéoclaste mature activé est une cellule très dynamique qui alterne entre des périodes de résorption osseuse où elle est immobile et fixée à la matrice osseuse; et des périodes de migration, caractérisées par le relâchement des podosomes de la zone de scellement, permettant ainsi à l'ostéoclaste de rejoindre un nouveau site de résorption osseuse. Les signaux régulant l'alternance entre les deux états de la cellule ne sont cependant pas encore définis. (Georgess et al., 2014)

1.3.3 La régulation de la différenciation, la survie et la résorption osseuse de l'ostéoclaste

Comme mentionné précédemment, RANKL et M-CSF, sont deux facteurs sécrétés par les cellules mésenchymateuses du micro-environnement qui sont essentiels à l'ostéoclastogénèse, à la survie ainsi qu'à l'activité de résorption osseuse de l'ostéoclaste. (Figure 6)

1.3.3.1 La signalisation engendrée par M-CSF

La signalisation du récepteur tyrosine kinase C-FMS, activée par M-CSF, est connue pour jouer un rôle crucial dans la prolifération, la survie et l'engagement des cellules myéloïdes dans la lignée monocyte-macrophage. Par conséquent, il n'est pas surprenant que cette voie de signalisation soit également impliquée dans la différenciation des ostéoclastes. Au niveau de la surface cellulaire, des regroupements de monomères inactifs de C-FMS sont activés par M-CSF, ce qui permet leur dimérisation rapide et l'autophosphorylation de résidus tyrosine du domaine intracellulaire du récepteur. (Stanley et Chitu, 2014) Cette activation du récepteur permet la formation de complexes protéiques grâce au recrutement de protéines adaptatrices et de kinases. Le premier événement de la signalisation implique la phosphorylation du résidu Tyr⁵⁵⁹, qui recrute le complexe formé par CBL et SRC. CBL régule l'activité du récepteur et, dans un premier temps, son recrutement favorise la phosphorylation de résidus supplémentaires du domaine intracellulaire. (Mun et al., 2020) La survie, la prolifération et la différenciation des précurseurs ostéoclastiques par M-CSF sont principalement médiées par l'activation des voies de signalisation de PI3K, de la sérine/thréonine kinase AKT1 (AKT1) et de la protéine kinase 1 et 3 activée par un mitogène (ERK1/2 (MAPK1 et MAPK3)). L'activation de PI3K/AKT1, via son recrutement par SRC ou son interaction directe avec la Tyr⁷²¹ du récepteur, favorise la prolifération et la survie des ostéoclastes et de leurs précurseurs. En revanche, l'activation de ERK1/2, médiée par le complexe protéique GRB2/SOS au niveau de Tyr⁶⁹⁷, favorise la prolifération, la survie et l'engagement des précurseurs ostéoclastiques vers la lignée ostéoclastique. (Figure 6) (Kim et Kim, 2016; Mun et al., 2020; Stanley et Chitu, 2014; Xu et Teitelbaum, 2013)

La signalisation de C-FMS participe également aux processus d'étalement, de migration et de polarisation cellulaire engendrés par le réarrangement du cytosquelette. Les voies de signalisation en aval du récepteur fournissent un signal de l'intérieur vers l'extérieur, induisant ainsi un changement de conformation des intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ et une augmentation de leur affinité pour leur substrat. De plus, la régulation des podosomes par M-CSF inclut l'activation des GTPases RHO impliquées dans le réarrangement du cytosquelette. (Faccio et al., 2007; Teitelbaum, 2011; Touaitahuata et al., 2014)

Finalement, la signalisation de C-FMS prend fin par l'action de CBL. La protéine possède aussi une activité d'ubiquitine ligase qui régule négativement l'activité du récepteur. La multiubiquitination du domaine intracellulaire provoque l'internalisation et la dégradation du récepteur par les lysosomes. (Mun et al., 2020)

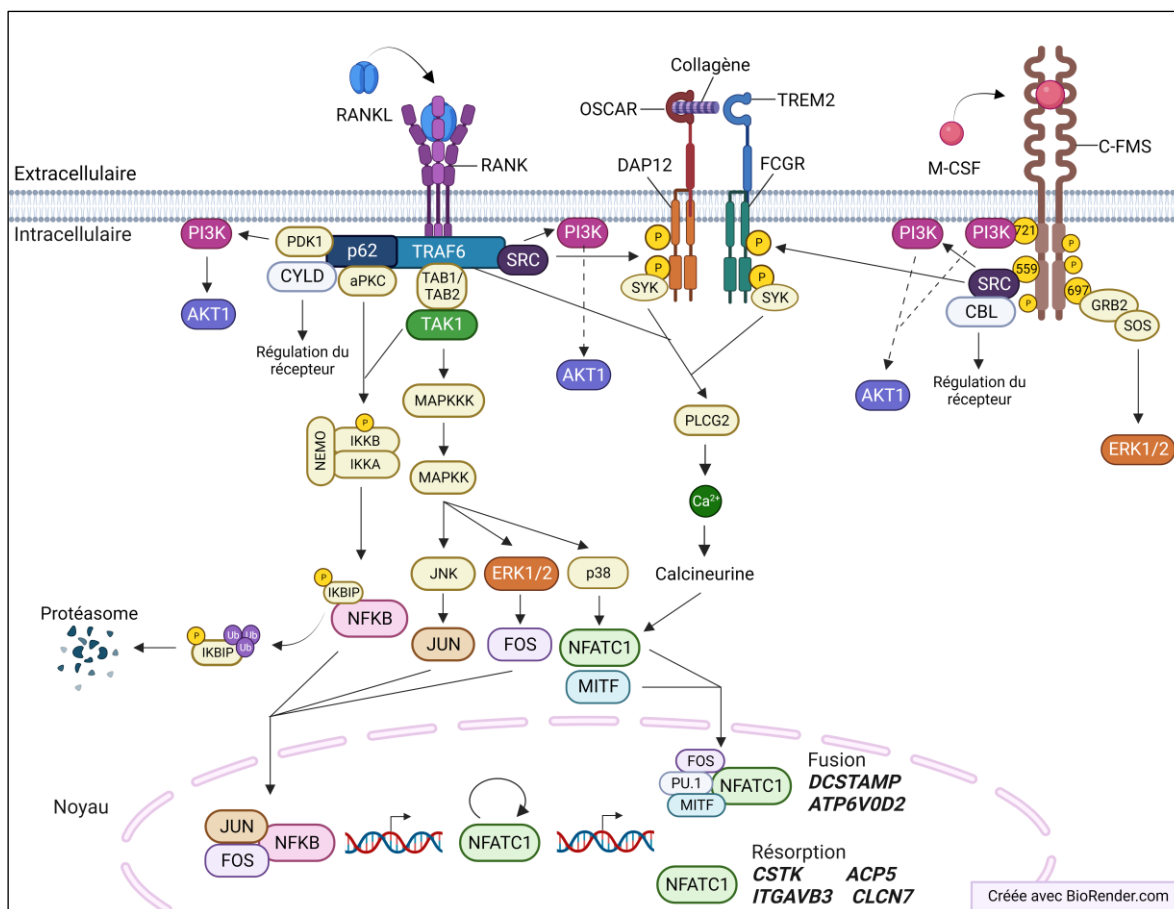


Figure 6: Voies de signalisation essentielles à l'ostéoclaste

Les voies de signalisation induites par RANKL et M-CSF sont essentielles à la différenciation, la survie et la fonction de résorption osseuse de l'ostéoclaste. Les voies de co-stimulation induites par les récepteurs d'adhésion OSCAR et TREM2 régulent l'oscillation du calcium intracellulaire nécessaire à l'autoamplification de NFATC1. Collectivement, ces voies de signalisation participent au réarrangement du cytosquelette nécessaire pour la polarisation et la migration de l'ostéoclaste.

1.3.3.2 RANK/RANKL/OPG

L'axe de signalisation impliquant RANKL, son récepteur RANK et le récepteur leurre OPG permet aux cellules de la lignée monocyte-macrophage de s'engager dans la lignée ostéoclastique grâce à l'expression du facteur de transcription NFATC1, un des principaux régulateurs de l'ostéoclaste. Les cellules mésenchymateuses sécrètent simultanément RANKL et OPG. OPG séquestre RANKL et empêche sa liaison au récepteur. Ainsi, pour activer la signalisation de RANK, la concentration de RANKL dans le micro-environnement osseux doit être plus élevée que celle de l'OPG. (Tanaka, 2007)

La liaison de RANKL à son récepteur induit la trimérisation de celui-ci et le recrutement de protéines adaptatrices pour la transduction du signal, car RANK lui-même ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. La famille de facteurs associés aux récepteurs TNF (TRAF) est la première

famille de protéines recrutée au domaine intracellulaire du récepteur, et plusieurs de ses membres sont impliqués dans la régulation positive et négative de la signalisation. Toutefois, TRAF6 est essentielle à l'activation des étapes subséquentes de la signalisation. (Lee et Kim, 2003) TRAF6 est une protéine adaptatrice et une ligase E3 qui permet le recrutement de deux complexes de signalisation qui activent les voies canoniques de NF κ B. L'activation de NF κ B dans l'ostéoclaste dépend de la phosphorylation de l'inhibiteur de la kinase du facteur nucléaire kappa B sous-unité bêta (IKKB) suivie par la dégradation de la protéine interagissant avec IKKB (IKBIP) par le protéasome, ce qui libère NF κ B et permet sa translocation au noyau. La phosphorylation de IKKB est médiée par les protéines kinases C atypiques recrutées par le séquestosome-1 (p62 (SQSTM1)), ainsi que la protéine kinase-kinase kinase 7 activée par un mitogène (TAK1 (MAP3K7)) incluse dans le complexe protéique TAB1/2 et TAK1. (McManus et Roux, 2012; Park et al., 2017) L'interaction entre TRAF6 et la protéine adaptatrice p62 stimule également l'autoubiquitination de TRAF6 et son activité E3 ligase régulant le transfert des chaînes polyubiquitinées sur les substrats cibles au sein du complexe impliqué dans la régulation de l'activation de NF κ B. (Moscat et al., 2007) La signalisation de RANK active également PI3K/AKT1 par l'activité de SRC via TRAF6 et l'activité de PDK1 via p62. (McManus et Roux, 2012; Wada et al., 2006) En plus de NF κ B, le complexe protéique incluant TAK1 régule l'activation d'autres facteurs de transcription en activant les cascades de signalisation impliquant la protéine kinase 14 activée par un mitogène (p38 (MAPK14)), la protéine kinase 8 activée par un mitogène (JNK (MAPK8)) et ERK1/2. Leurs actions sont diverses et incluent l'activation des facteurs de transcription nécessaires à l'engagement des précurseurs et leur différenciation en ostéoclaste. En collaboration avec NF κ B, l'activation de JUN par JNK et de FOS par ERK1/2 forme un complexe de transcription conduisant à l'expression de NFATC1, le principal régulateur de l'expression des gènes ostéoclastiques. Par ailleurs, p38 favorise l'activation de NFATC1 et de MITF. (Figure 6) (Lee et al., 2018)

L'autoamplification de l'expression de NFATC1 est essentielle à la transcription des gènes clés de l'ostéoclaste et est régulée par l'oscillation du calcium intracellulaire. Les récepteurs d'adhésion, TREM2 et OSCAR, associés aux protéines intracellulaires contenant des motifs ITAM, DAP12 et FCGR, permettent l'activation de voies de signalisation de costimulation à la signalisation de RANK. L'oscillation calcique favorise la translocation au noyau de NFATC1 par l'activation d'une phosphatase qui active NFATC1 en le déphosphorylant et favorise l'autoamplification de l'expression du facteur de transcription. (Park et al., 2017) Après l'association de TREM2/DAP12 ou OSCAR/FCGR induite par des ligands extracellulaires, SRC recrutée par TRAF6 au récepteur RANK,

phosphoryle les protéines ITAM et permet le recrutement de la protéine tyrosine kinase associée à la rate (SYK). Ensuite, SYK médie les événements qui conduisent à l'activation de la phospholipase C gamma 2, ce qui module le calcium intracellulaire et active la calcineurine. Cette signalisation est aussi régulée par SRC, recrutée aux tyrosines phosphorylées de C-FMS. (Long et Humphrey, 2012; Park et al., 2017) En collaboration avec les facteurs de transcription PU.1, MITF et FOS, NFATC1 induit la transcription de gènes nécessaires à la fusion des précurseurs tels que *DC-STAMP*, *OC-STAMP* et *ATP6V0D2*. De plus, NFATC1 régule l'expression de protéines impliquées dans la résorption osseuse tel que la CTSK, CLCN7 et les intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{3}$. (Figure 6) (Kodama et Kaito, 2020; Ono et Nakashima, 2018; Park et al., 2017) En plus de leur implication dans la régulation de l'expression de NFATC1, la signalisation de RANK et des récepteurs de costimulation est impliquée dans le réarrangement du cytosquelette, ce qui permet la motilité et la formation de la zone de scellement. L'activation de DAP12 par RANK et C-FMS favorise sa coopération avec les intégrines $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ ainsi que l'activation des GTPases RHO pour le réarrangement du cytosquelette. (Long et Humphrey, 2012; Teitelbaum, 2011) Outre OPG, l'internalisation du récepteur régule son activité et peut mettre fin à sa signalisation. L'internalisation de RANK favorise sa dégradation par les lysosomes. (Okusha et al., 2020; Tran et al., 2020a)

1.3.3.3 La signalisation de MTORC1

La signalisation de RANKL et M-CSF favorise la survie des ostéoclastes et de leurs précurseurs, notamment en régulant le complexe de signalisation comprenant la kinase cible mécanistique de la rapamycine (MTOR). Cette protéine est impliquée dans deux complexes de signalisation distincts, régulés par des signaux différents. La formation du complexe 2 de MTOR (MTORC2), composé de MTOR associé à RICTOR, rend ce complexe insensible à la rapamycine. (Laplante et Sabatini, 2009) Les fonctions spécifiques de ce complexe dans l'ostéoclaste sont peu connues, mais MTORC2 ne semble pas essentiel à la différenciation ou la fonction de l'ostéoclaste. (Hiraiwa et al., 2019) En revanche, les fonctions du complexe 1 de MTOR (MTORC1) sont inhibées par la rapamycine. En plus de MTOR, le complexe MTORC1 comprend RPTOR, qui est responsable de l'assemblage du complexe et du recrutement des substrats. De plus, la GTPase activée RHEB interagit avec MTORC1 pour stimuler son activité. L'activité du complexe de signalisation est entre autres régulée par l'activation du complexe TCS1/TCS2, protéines activant des GTPases (GAP), qui inactivent RHEB. (Figure 7) (Laplante et Sabatini, 2009)

Dans les ostéoclastes, MTORC1 est activé en aval des signalisations induites par RANKL et M-CSF, et il est nécessaire à la survie de la cellule. L'activation de la synthèse protéique est dépendante de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 kinase B2 (p70 S6K (RPS6)) par MTORC1 et l'inhibition de la protéine 1 de liaison au facteur 4E d'initiation de la traduction eucaryote (4EBP1 (EIF4EBP1)). L'activation du complexe de signalisation MTORC1 est pour sa part régulée par PI3K/AKT1, connue pour inhiber l'activité de TSC1/TSC2.

(Glantschnig et al., 2003a) L'activation de MTOR en aval de PI3K lors de la signalisation de M-CSF permet l'inhibition de l'expression du facteur pro-apoptotique BIM et donc la survie de l'ostéoclaste. (Sugatani et Hruska, 2005) En plus de la régulation de la synthèse protéique, la modulation de l'activité de MTORC1, dépendante de AKT1 et de ERK1/2, régule l'initiation de l'autophagie. (Laplante et Sabatini, 2009)

1.3.3.4 L'autophagie

L'autophagie correspond à la dégradation de composantes intracellulaires telles que les protéines et les organites par les lysosomes. Ce mécanisme participe à la survie et à l'homéostasie cellulaire en éliminant les organites endommagés et les protéines mal repliées, tout en fournissant des nutriments pour divers processus cellulaires grâce aux produits de la dégradation. Trois voies distinctes de l'autophagie ont été décrites : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des chaperones. Ces deux dernières ont été peu décrites dans l'ostéoclaste. En revanche, la macroautophagie a été impliquée dans la régulation de l'ostéoclastogénèse et de la résorption osseuse. La macroautophagie, référée seulement par autophagie par la suite, implique la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, séquestrant des protéines et

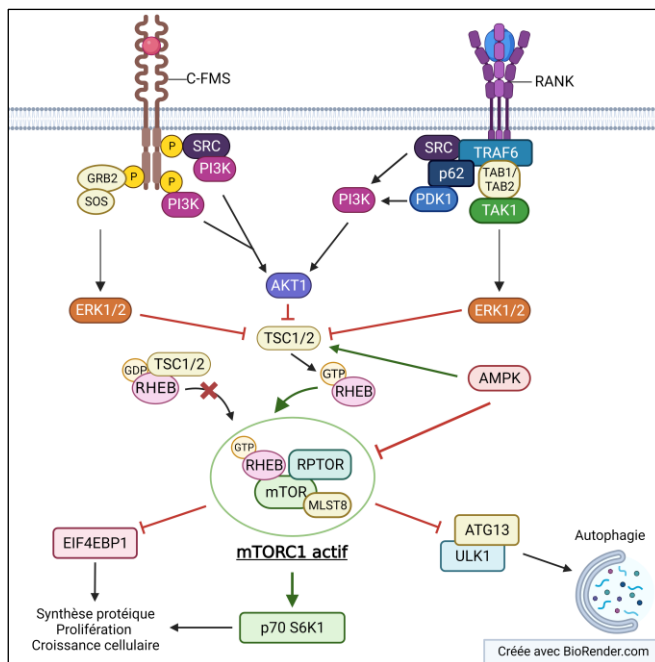


Figure 7: Signalisation de MTORC1

Le complexe de signalisation MTORC1 est en aval des voies de signalisation de RANKL et M-CSF et favorise la survie de l'ostéoclaste par la synthèse protéique. Son activation est favorisée par PI3K/AKT1 et ERK1/2, tandis que son inactivation est entre autres induite par l'activité de TSC1/TSC2 et d'AMPK, initiant l'autophagie.

des organites destinés à la dégradation par les lysosomes. Un niveau basal d'autophagie est maintenu par la cellule afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, mais ce processus peut aussi être induit en réponse à divers stress tels que la diminution de nutriments, l'hypoxie et le stress oxydatif. Ces stimuli inactivent le complexe MTORC1, ce qui déclenche l'initiation de l'autophagie.

L'initiation du processus est régulée par deux complexes protéiques. Le complexe ULK1 comprend les protéines ULK1, la protéine 13 liée à l'autophagie (ATG13), FIP200 et ATG101. Lors de niveaux suffisants en nutriments, MTORC1 interagit directement avec la protéine ULK1 incluse dans le complexe du même nom et phosphoryle la sérine 757 d'ULK1 ce qui régule négativement l'activité du complexe protéique. Lors d'une diminution en nutriments, MTORC1 est inactivée et quitte le complexe ce qui permet l'activation d'ULK1 et du complexe protéique associé, permettant son recrutement à la membrane d'isolation près du réticulum endoplasmique (RE). Le complexe médie plusieurs événements durant l'autophagie dont le recrutement d'ATG9, qui fournit des phospholipides permettant l'élongation de la membrane, et le recrutement du second complexe protéique impliqué dans l'initiation de l'autophagie. (Gallagher et Chan, 2013; Noda, 2021) Le complexe PI3K classe III, le second complexe impliqué dans l'initiation de l'autophagie, produit du phosphatidylinositol-3-phosphate qui donne un signal lipidique et permet le recrutement d'ATG16L1 pour l'étape subséquente de l'autophagie. (Almannai et al., 2022; Parzych et Klionsky, 2014)

L'étape d'élongation dépend principalement de deux systèmes de conjugaison similaire à l'ubiquitine. ATG12 est conjugué à ATG5 grâce à l'action d'ATG7 suivi de celle d'ATG10, des enzymes E1 et E2 respectivement. Ce complexe interagit par la suite avec ATG16L1 à la membrane d'isolation. (Tanida, 2011) Le second système de conjugaison implique les protéines de la famille d'ATG8, dont la protéine 1 chaîne légère 3 associée aux microtubules (LC3 (MAP1LC3)) est le membre le plus connu pour son rôle dans l'autophagie. LC3 est premièrement clivé par ATG4, exposant une glycine en C-terminal qui correspond à la forme LC3-I. LC3-I est ensuite activée par ATG7 et transférée à ATG3 qui permet de conjuguer LC3-I à une phosphatidyléthanolamine (PE), donnant LC3-II. Cette modification permet l'ancrage à la membrane d'isolation de sa forme lipidée LC3-II, qui est facilité par le complexe protéique ATG5-ATG12-ATG16L1. (Figure 8) (Tanida et al., 2004) Au cours de l'allongement de la membrane d'isolation pour y séquestrer des protéines, LC3-II s'accumule à l'extérieur et à l'intérieur de la membrane. Bien que l'autophagie soit considérée comme un processus non sélectif de dégradation de composants cytosoliques, certains cargos ubiquitinés sont dirigés de manière sélective à l'autophagosome grâce à des protéines possédant

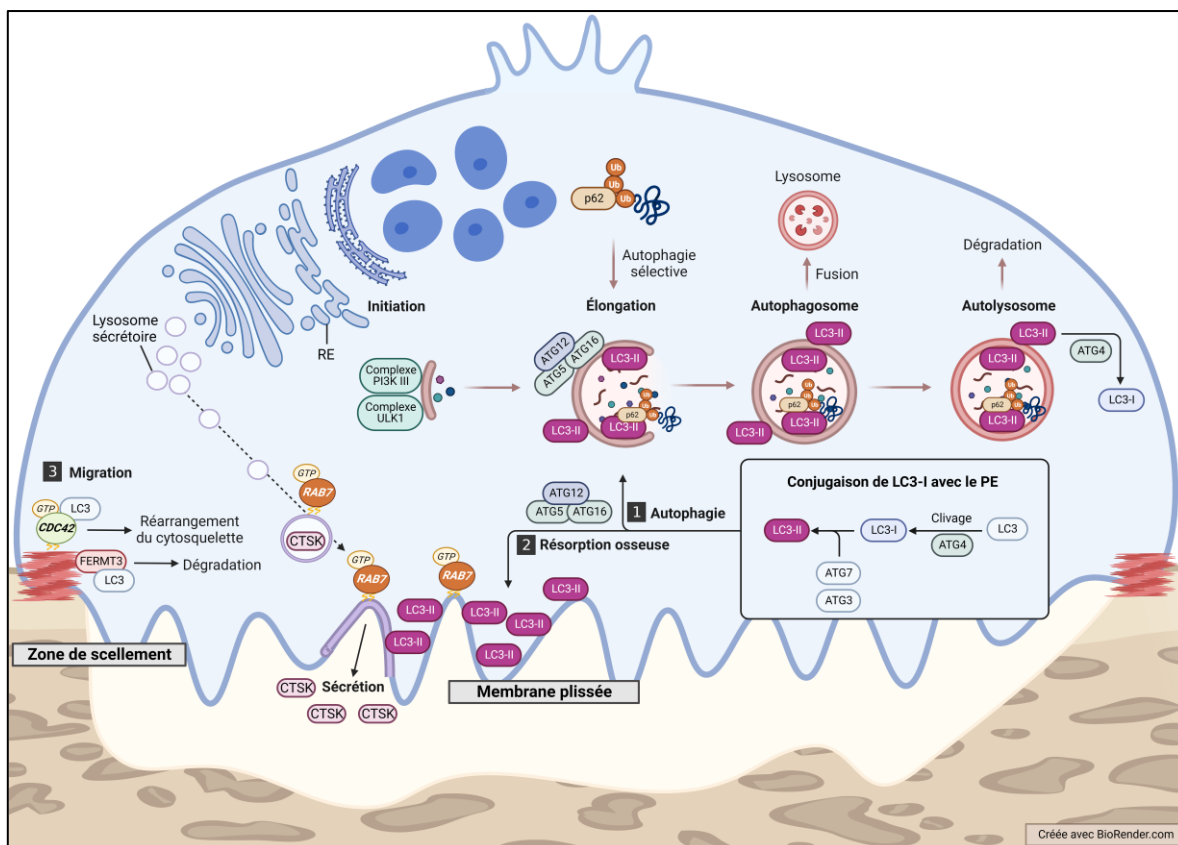


Figure 8: L'autophagie et les rôles supplémentaires de LC3

L'autophagie débute au RE par le recrutement des complexes ULK1 et PI3K classe III. La conjugaison de LC3 avec un PE, facilité par ATG5-ATG12-ATG16, ancre LC3-II à la membrane d'isolation et permet l'élongation de la membrane d'isolation. L'autophagosome mature, vésicule à double membrane, fusionne au lysosome pour former l'autophagolysosome et dégrader leur contenu (1). Faciliter par les mêmes protéines de l'autophagie, LC3-II peut aussi être ancrée à la membrane plissée où elle permet la localisation des vésicules sécrétrices à l'intérieur de la zone de scellement et ainsi la sécrétion de la CTSK dans la lacune de résorption (2). LC3 peut aussi être localisée à la zone de scellement pour réguler la migration de l'ostéoclaste (3).

un domaine associé à l'ubiquitine (UBA) et un domaine de liaison aux protéines de la famille d'ATG8 (LIR). Ce processus, appelé autophagie sélective, implique des protéines comme p62, NDP52 et optineurine, qui ciblent spécifiquement la dégradation d'agrégats de protéines, de lysosomes endommagés, de pathogènes, etc. Ces protéines interagissent avec LC3-II située à l'intérieur de la vésicule en formation et, comme les cargos, sont des substrats de l'autophagie. (Vargas et al., 2023) Après la phase d'élongation, la phase de maturation permet de fermer la vésicule à double membrane afin de former l'autophagosome qui renferme les éléments destinés à être dégradés. (Tanida, 2011) Par la suite, l'autophagosome se déplace le long des microtubules pour fusionner avec un lysosome, impliquant la GTPase RAB7 et ses protéines effectrices. (Parzych et Klionsky, 2014; Zhao et Zhang, 2019) Finalement, l'autophagolysosome procède à la dégradation de son

contenu. Les protéines LC3-II, par l'action d'ATG4, sont détachées de la surface extérieure de la vésicule et sont recyclées sous leur forme LC3-I. Étant donné la présence de LC3 dans les multiples étapes de l'autophagie, la protéine est utilisée comme marqueur des autophagosomes, et une augmentation de l'expression de sa forme LC3-II indique une augmentation de l'autophagie. (Klionsky et al., 2021; Tanida, 2011)

Ce processus est important dans la régulation de l'ostéoclaste, car l'inhibition de l'activité de MTORC1 par la rapamycine réduit le nombre d'ostéoclastes et la résorption osseuse *in vivo*. (Dai et al., 2017; Hussein et al., 2012) De manière similaire, l'OPG favorise l'inactivation du complexe de signalisation MTORC1 via l'activation d'AMPK. Cette inactivation de MTORC1 diminue l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse. Ces effets ont été attribués à l'augmentation de l'autophagie dans les ostéoclastes, alors que l'OPG augmente l'expression de gènes impliqués dans le processus, l'expression de LC3-II et la formation d'autophagosomes. (Tong et al., 2020, 2019)

Le rôle de LC3 dans l'ostéoclaste mature ne se limite pas à l'autophagie. En collaboration avec d'autres protéines impliquées dans le processus, LC3 joue un rôle dans la formation de la membrane plissée et la sécrétion du contenu des lysosomes sécrétoires dans la lacune de résorption. LC3-II est localisée à la membrane plissée et permet le positionnement adéquat des vésicules sécrétrices Rab7⁺ contenant la CTSK à l'intérieur de la zone de scellement. Cette fonction n'est pas liée à l'autophagie, puisque les autophagosomes ne sont pas localisés à la membrane plissée des ostéoclastes actifs. De plus, cette localisation de LC3-II ne résulte pas non plus de son ancrage à la membrane des vésicules sécrétrices avant la fusion, puisque la protéine ne colocalise pas avec les vésicules contenant la CTSK. Finalement, l'implication de LC3 dans le positionnement des vésicules sécrétrices dépend de l'activité des protéines impliquées dans la conjugaison de LC3 avec la PE telles que ATG5, ATG7 et ATG4B. (Figure 8) (DeSelm et al., 2011)

Outre son rôle dans la formation de la membrane plissée, LC3 est impliqué dans la régulation de la zone de scellement. Une diminution de l'expression de LC3 augmente le nombre de podosomes et altère la formation de la zone de scellement, comme l'ont observé deux études. LC3 est associée au réseau de microtubules à proximité de la GTPase CDC42 et favorise son activation, ce qui permet de réguler l'assemblage des podosomes de la zone de scellement. (Chung et al., 2012) Le rôle de LC3 dans l'autophagie est aussi nécessaire pour réguler le désassemblage des podosomes lors de la migration de l'ostéoclaste. L'interaction de FERMT3, une protéine présente dans les plaques d'adhésion focale, avec LC3, est nécessaire pour sa dégradation, favorisant la migration de l'ostéoclaste. (Zhang et al., 2020)

Malgré l'importance de LC3 dans la régulation des structures caractéristiques de l'ostéoclaste actif, les signaux qui régulent son recrutement spécifique à celles-ci ne sont pas connus. La balance entre ses fonctions dans l'autophagie et ses autres rôles est nécessaire pour la régulation de la résorption osseuse, mais aussi pour la différenciation et la survie de l'ostéoclaste. Tout comme les fonctions de LC3, l'activation de l'autophagie doit être finement régulée pour fournir les nutriments nécessaires à la cellule, dégrader les organites défectueux et mettre fin à la signalisation par la dégradation des récepteurs. Cependant, une activation prolongée de l'autophagie peut conduire à la mort cellulaire. (Glantschnig et al., 2003a; Mukhopadhyay et al., 2014)

1.3.3.5 L'apoptose

Le complexe de signalisation MTORC1, ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans l'autophagie telles que p62, ATG5 et ATG12 jouent aussi un rôle dans l'apoptose. Ils peuvent également favoriser ou inhiber ces processus selon le contexte cellulaire. (Mukhopadhyay et al., 2014) L'apoptose régule la durée de vie de l'ostéoclaste, qui est d'environ trois semaines, afin de limiter la résorption osseuse et le nombre d'ostéoclastes présents au site de remodelage osseux. (Soysa et Alles, 2019) L'apoptose est un processus de mort programmée qui est initié par les caspases initiatrices 8 et 9, et les caspases effectrices et mène à la fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques. L'apoptose extrinsèque est médiée par des récepteurs de mort cellulaire activés par des signaux du micro-environnement, impliquant la caspase 8. L'apoptose intrinsèque, quant à elle, est médiée par la caspase 9 qui est activée lors de la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale et du relâchement du cytochrome c. L'intégrité mitochondriale est maintenue grâce à la famille de protéines BCL2, qui comprend des protéines pro- et anti-apoptotiques dont le ratio est influencé par différents stimuli intracellulaires. (D'Arcy, 2019; Duprez et al., 2009) Ces deux voies distinctes de l'apoptose sont impliquées dans la mort cellulaire programmée des ostéoclastes.

Les ostéoclastes humains expriment de multiples récepteurs de la mort programmée tels que FAS, et les récepteurs du ligand induisant l'apoptose lié au facteur de nécrose tumorale (TRAIL)R1 et TRAILR2. D'un autre côté, leur survie est favorisée par l'expression de récepteurs leurres comme TRAILR3 et TRAILR4. Il a été montré que l'activation de ces récepteurs par leurs ligands respectifs, FASLG et TRAIL, induit l'apoptose chez l'ostéoclaste humain. L'expression des récepteurs de la famille TRAIL, régulant l'apoptose, est modulée par différents régulateurs positifs et négatifs de l'ostéoclaste qui influencent l'expression des récepteurs effecteurs et des récepteurs leurres.

(McManus et al., 2012; Roux et al., 2005) L'OPG favorise l'apoptose des ostéoclastes en augmentant l'expression de FAS et de son ligand. (Liu et al., 2015)

L'activation des voies de signalisation de PI3K/AKT1, de ERK1/2 et de NF κ B par RANKL et M-CSF favorise la survie de l'ostéoclaste en modulant l'expression des protéines de la famille de BCL2. (Gingery et al., 2003; Soysa et Alles, 2019) Par exemple, la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BAD et de la caspase 9, par AKT1 inhibe l'activation de l'apoptose intrinsèque. À l'inverse, l'activation de PI3K et de ERK1/2 par M-CSF favorise l'expression des protéines anti-apoptotique BCL2 et BCL2L1, qui inhibent la caspase 9. (Roux et Brown, 2009; Soysa et Alles, 2019) L'inhibition de la signalisation de M-CSF induit pour sa part l'augmentation de la protéine pro-apoptotique BIM. (Sugatani et Hruska, 2005) Parmi les stimuli extracellulaires impliqués dans le remodelage osseux, TGFB1 induit l'apoptose des ostéoclastes humains en augmentant l'expression de BIM. (Houde et al., 2009) De plus, TGFB1 favorise l'expression de l'OPG chez les ostéoblastes, qui en plus de son rôle dans l'apoptose extrinsèque, augmente le ratio BAX/BCL2 et mène à l'induction de l'apoptose. Cependant, TGFB1 a aussi des fonctions anti-apoptotiques et augmente le ratio BCL2L1/BID. (Lee et al., 2019; Ruan et al., 2010)

En plus de ces voies de signalisation, l'adhérence de l'ostéoclaste est nécessaire à sa survie. La perte d'interaction entre les intégrines et la matrice osseuse induit l'anoïkose, une voie de mort cellulaire programmée propre aux cellules adhérentes. Cela est en partie médié par la diminution du ratio BCL2/BAX, favorisant l'apoptose intrinsèque lors de la perte d'adhérence. En revanche, l'activation de la signalisation des intégrines favorise la survie par l'activation de PI3K/AKT1. (Sakai et al., 2000; Villanova et al., 1999; Xing et Boyce, 2005) La mort cellulaire induite par la perte d'adhérence implique plusieurs voies de signalisation, puisque l'activation de la caspase 8 a aussi été observée. (Zhao et al., 2005)

En résumé, l'ostéoclaste procède à la résorption osseuse, mais régule aussi la différenciation et la fonction des cellules mésenchymateuses lors du remodelage osseux. Ses fonctions sont finement régulées par la coopération de différentes voies de signalisation et de processus cellulaires, qui permettent la différenciation, la survie et l'activité de l'ostéoclaste. Un dysfonctionnement dans la régulation de l'ostéoclaste peut altérer non seulement sa capacité de résorption, mais aussi les fonctions des cellules adjacentes du micro-environnement osseux.

1.4 L'ostéoclaste pagétique

Comme mentionné précédemment, la phase initiale de la maladie de Paget est caractérisée par une résorption osseuse excessive, ce qui a permis d'identifier l'ostéoclaste comme le principal responsable de l'altération du remodelage osseux. Plusieurs caractéristiques de son phénotype sont anormales. En plus de leur hyperactivité, les ostéoclastes sont présents en plus grand nombre aux sites affectés, leur taille est significativement augmentée et les cellules multinucléées peuvent contenir jusqu'à 100 noyaux. Les ostéoclastes et leurs précurseurs sont aussi plus sensibles aux facteurs ostéoclastogéniques. (Kukita et al., 1990; Mena et al., 2000; Roodman and Windle, 2005) La résistance à l'apoptose des ostéoclastes pagétiques contribue à l'augmentation de la résorption osseuse. (Chamoux et al., 2009; Ralston et Layfield, 2012; Reddy, 2004) Cette dernière est favorisée par l'augmentation de l'activation de NF κ B (Chamoux et al., 2013, 2009), de MTORC1 via l'augmentation de l'activation de AKT1 et de ERK1/2 (McManus et al., 2016) ainsi que de l'altération de l'expression de BCL2 (Brandwood et al., 2003), de la caspase 3 et du récepteur TRAILR1 (Michou et al., 2010).

Une autre caractéristique des ostéoclastes pagétiques est la présence de corps d'inclusion dans les noyaux et le cytoplasme de certains d'entre eux aux sites affectés. (Roodman et Windle, 2005) Les corps d'inclusion sont composés de structures tubulaires hautement organisées, d'ubiquitines et de p62. Leur structure s'apparente aux agrégosomes retrouvés dans d'autres maladies où les inclusions ont été mieux caractérisées. Dans ces désordres, les agrégosomes sont dus à l'accumulation de protéines destinées à la dégradation en raison d'un défaut de l'autophagie. (Helfrich et Hocking, 2008; Usategui-Martín et al., 2020) Cette hypothèse a été corroborée par une étude du laboratoire, montrant une accumulation d'autophagosomes dans les ostéoclastes pagétiques due à un défaut dans les étapes terminales de l'autophagie. (McManus et al., 2016)

En plus du phénotype anormal de l'ostéoclaste, l'augmentation de M-CSF et de l'interleukine-6 (IL6) dans le micro-environnement osseux favorise à la fois la différenciation et l'activité de l'ostéoclaste. Ces facteurs agissent soit sur l'ostéoclaste, soit en favorisant la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes. (Neale et al., 2002; Roodman et al., 1992; Werner de Castro et al., 2014)

1.4.1 Étiologie multifactorielle de la maladie de Paget

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le phénotype de l'ostéoclaste pagétique, qui semble d'origine multifactorielle, avec une forte composante génétique et la contribution de facteurs environnementaux. Des loci de susceptibilité ont été identifiés dans des gènes connus de

la biologie de l'ostéoclaste (*CSF1*, *TM7SF4*, *TNFRSF11A*) et dans d'autres dont les fonctions sont moins connues (*PML*, *OPTN*, *RIN3*, *NUP205*). Ces loci de susceptibilité expliquent environ 13 % des cas familiaux de la maladie de Paget dont plusieurs variants génétiques dans ces différents gènes pourraient favoriser le développement de la maladie en collaboration avec d'autres facteurs. (Albagha et al., 2011; Banaganapalli et al., 2023; Vallet et al., 2015) De plus, des polymorphismes nucléotidiques dans deux gènes impliqués dans l'autophagie (*ATG5* et *ATG16L1*) sont également associés à la maladie de Paget, renforçant ainsi l'implication d'un désordre de l'autophagie dans le phénotype de l'ostéoclaste pagétique. (Usategui-Martín et al., 2015)

Malgré l'identification des nombreux loci de susceptibilité et de variants génétiques prédisposant au développement de la maladie, des mutations expliquant certaines caractéristiques du phénotype de l'ostéoclaste pagétique ainsi que de la présentation clinique classique de la maladie de Paget n'ont été identifiées que dans un seul gène, *SQSTM1* qui code pour la protéine p62. (Daroszewska et al., 2011; Gennari et al., 2022; Zach et al., 2018) À ce jour, 30 mutations sont connues, affectant pour la plupart le domaine UBA de la protéine. La mutation la plus fréquente chez les individus atteints de la maladie est la substitution P392L. Cette dernière est transmise de manière autosomale dominante dans les cas familiaux et à un niveau élevé de pénétrance, bien que celle-ci reste variable. Néanmoins, certains individus porteurs de la mutation ne développent pas la maladie. Les diverses mutations observées dans la protéine p62 expliquent seulement 20 % à 50 % des cas familiaux et 10 % des cas sporadiques. (Gennari et al., 2022; Laurin et al., 2002; Singer, 2015) De plus, une étude *in vitro* d'ostéoclastes pagétiques et sains, avec ou sans la mutation P392L, a montré que certaines caractéristiques des ostéoclastes pagétiques étaient identiques, que la mutation soit présente ou non. Les ostéoclastes d'individus sains porteurs de la mutation ont un phénotype intermédiaire. (Chamoux et al., 2009) Plusieurs études ont également montré que seulement certaines caractéristiques de l'ostéoclaste pagétique telles que l'augmentation du nombre d'ostéoclastes aux sites affectés, l'augmentation du nombre de noyaux par cellule multinucléée et leur sensibilité aux facteurs ostéoclastogéniques sont attribuables à la mutation p62^{P392L}. Cependant, d'autres caractéristiques comme l'augmentation de la capacité de résorption, la résistance à l'apoptose et le défaut de l'autophagie de l'ostéoclaste pagétique ne sont pas liées à la mutation. (Chamoux et al., 2009; Kurihara et al., 2007; McManus et al., 2016; Sundaram et al., 2011)

Bien qu'une composante génétique augmente le risque de développer la maladie, une composante environnementale semble aussi impliquée. Plusieurs hypothèses ont été émises

concernant les facteurs environnementaux potentiellement impliqués. L'hypothèse d'une infection lente au paramyxovirus a suscité beaucoup d'intérêt dû à la ressemblance entre les corps d'inclusion dans les ostéoclastes pagétiques et les nucléocapsides du virus. À ce jour, cette hypothèse reste controversée. Certaines équipes de recherche ont détecté la présence de séquences partielles du transcrit du virus et d'autres n'ont jamais été en mesure de détecter la présence du virus. (Friedrichs et al., 2002; Helfrich et al., 2000; Singer, 2015) Cependant, une étude, comparant l'effet *in vivo* et *in vitro* de la mutation p62^{P392L}, de l'infection au virus de la rougeole et de la combinaison des deux facteurs sur le phénotype de l'ostéoclaste, soutient l'hypothèse selon laquelle une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux serait nécessaire au développement de la maladie. (Kurihara et al., 2011) Néanmoins, comme l'hypothèse d'une infection virale, les différents facteurs environnementaux proposés, tels que le contact avec des animaux domestiques ou de la ferme, la consommation de tabac, l'exposition à des toxines, la déficience en vitamine D ou en calcium durant l'enfance, restent hypothétiques. (Gennari et al., 2022; Guay-Bélanger et al., 2015; Singer, 2015)

1.4.2 Contribution de l'épissage alternatif

Évidemment, la mutation d'un gène ou les variants génétiques ne sont pas les seules modifications qui peuvent contribuer à la modification de l'expression des gènes d'une cellule. Après la transcription, l'ARN subit de nombreuses modifications qui sont finement régulées par la cellule. Parmi ces modifications, il y a l'épissage alternatif. Cela consiste à inclure ou exclure certains exons ou introns d'un transcrit d'ARN primaire pour obtenir un transcrit d'ARN messager mature. Ce processus complexe inclut des centaines de protéines qui effectuent un changement post-transcriptionnel de 95 % des gènes possédant plus d'un exon. Alors que certains exons sont constitutifs et sont inclus dans chaque transcrit mature, le transcrit final peut varier lorsque la séquence primaire contient des exons mutuellement exclusifs, des sites d'épissage variant en 5' ou 3' d'un exon, ou lorsqu'il y a exclusion ou rétention d'un exon ou d'un intron. (Chen et Manley, 2009; Wright et al., 2022) Le transcrit mature peut donc générer différentes formes d'une protéine avec des fonctions distinctes appelées isoformes. Les isoformes augmentent la diversité du protéome. L'épissage alternatif peut aussi affecter la stabilité de l'ARN mature et moduler l'expression génique par exemple lors de l'épissage alternatif d'un gène qui introduit un codon d'arrêt prématuré dans le transcrit pouvant mener à la dégradation des ARNm non-sens (NMD). (Baralle and Giudice, 2017; Wright et al., 2022) La régulation de l'expression des isoformes d'un gène par l'épissage alternatif est primordiale au maintien de l'homéostasie et varie dans le temps et selon le type cellulaire pour

permettre à la cellule de s'adapter aux changements de son micro-environnement. Cependant, une dérégulation de ce processus, même minime, peut entraîner des conséquences importantes. (Latorre et Harries, 2017; Urbanski et al., 2018)

Tableau 1: L'épissage alternatif dans l'ostéoclaste pagétique

Gènes		LGALS8 ¹	USP4 ²	GOLM2 (CASC4) ³	RHOT1 ⁴	PIDD1 (PIDD) ⁵	TBC1D25 (OATL1) ⁶
Nom de la protéine		Galectin 8	Ubiquitin specific peptidase 4	Golgi membrane protein 2	Ras homolog family member T1	p53-induced death domain protein 1	TBC1 domain family member 25
PSI ^a	Paget (n=19)	0,08	0,20	0,21	0,16	0,63	0,63
	Sains (n=16)	0,14	0,27	0,29	0,23	0,58	0,68
	p-valeur ^b	0,00001	0,0002	0,001	0,001	0,01	0,03
Fonctions connues		Interaction avec les glycoprotéines et les glycolipides	Désubiquitination	Associée à la membrane du Golgi	Transport des mitochondries	Régulation de l'apoptose	Activation des GTPases rabs
Processus biologiques associées		Adhésion et migration cellulaire; Autophagie; Régulation de la signalisation	Régulation de la signalisation de TAK1 et TRAF6	Cancer	Mitophagie; Régulation de la fusion et fission des mitochondries	Activation de la caspase 2; Activation de NFκB	Autophagie; Trafic vésiculaire
Taille des isoformes (aa)	Courte	317*	916	380	659*	893	100
	Longue	359	963*	436*	691	910*	688*
Épissage de l'ARN		Rétention de l'exon VIIIb	Exclusion de l'exon VII	Exclusion de l'exon IX	Rétention de l'exon VXIIIb	Site d'épissage en 3' de l'exon XIII	Exclusion de l'exon III
Effet de l'épissage au niveau protéique		Ajout de 42 aa dans le peptide de liaison	Perte de 47 aa dans le domaine flexible; Perte de sites de phosphorylation	Perte de 56 aa dans le domaine intra Golgi	Ajout de 32 aa en C-terminale du domaine miro2	Perte de 17 aa à la fin du domaine UPA	Codon d'arrêt prématuré; Perte de 588 aa; Perte des domaines TBC et LIR

Adapté de (Klinck et al., 2014)

*Forme canonique de la protéine

a. Indice de l'épissage alternatif (PSI) : Ratio de l'expression en ARNm de l'isoforme longue sur la somme de l'expression en ARNm de l'isoforme longue et de l'isoforme courte

b. p-valeur selon un test T de Student de tous les patients Paget versus tous les donneurs sains

1. Identifiant du gène : 3964; (Johannes et al., 2018)
2. Identifiant du gène : 7375; (Shen et al., 2023; Wang et al., 2020)
3. Identifiant du gène : 113201; (Duval et al., 2020)
4. Identifiant du gène : 55288; (Fatiga et al., 2021; López-Doménech et al., 2021)
5. Identifiant du gène : 55367; (Janssens and Tinel, 2012)
6. Identifiant du gène : 4943; (Fukuda, 2011; Itoh et al., 2011)

Étant donné l'importance de l'épissage alternatif dans le phénotype d'une cellule, une étude antérieure du laboratoire a suggéré l'implication de l'épissage alternatif comme facteur contributif de la composante génétique du phénotype de l'ostéoclaste pagétique. Dans un premier temps, l'ARN des ostéoclastes d'individus sains et atteints de la maladie de Paget, avec et sans la mutation p62^{P392L}, a été analysé pour détecter les événements d'épissage alternatif actifs, c'est-à-dire où deux isoformes étaient exprimées à plus de 10 % de l'expression globale du gène. L'indice de l'épissage alternatif (PSI) a alors été évalué dans les événements d'épissage alternatif actifs. Le PSI est défini comme le ratio de l'expression en ARNm de l'isoforme longue sur la somme de l'expression en ARNm l'isoforme longue et de l'isoforme courte. L'étude a identifié des événements

d'épissage alternatif associés à l'ostéoclaste pagétique dans six gènes, sans association à la mutation p62^{P392L}. (Tableau 1) Ces gènes n'avaient jamais été associés aux ostéoclastes auparavant, mais possèdent des fonctions importantes à sa régulation telles que l'apoptose, l'autophagie, l'adhésion cellulaire et le transport vésiculaire. (Klinck et al., 2014) Parmi ces gènes, *TBC1D25* et *LGALS8* ont été sélectionnés pour la poursuite de l'étude.

1.5 Le gène *TBC1D25*

Le premier gène qui a retenu notre attention est *TBC1D25*. Une diminution du PSI de *TBC1D25* est observée dans les ostéoclastes pagétiques comparés aux ostéoclastes sains. Cela indique une diminution de l'expression de l'isoforme longue, tant au niveau de l'expression génique que protéique. Toutefois, l'isoforme courte n'est pas détectée par les anticorps commerciaux, donc le profil de l'épissage alternatif n'a pas pu être déterminé au niveau protéique. En revanche, l'expression relative du gène est constante entre les deux groupes d'individus. (Klinck et al., 2014) Malgré une faible altération du PSI, la diminution observée peut quand même affecter le phénotype de l'ostéoclaste. Une légère altération du ratio des isoformes exprimées par un gène peut augmenter la susceptibilité de développer une maladie telle que montré par la faible augmentation du ratio de l'expression du transcrit court sur le transcrit canonique de *UBQLN1* associée à la maladie d'Alzheimer. (Bertram et al., 2005) De plus, une diminution significative de l'expression protéique de l'isoforme longue a été montrée, ce qui pourrait avoir un effet important sur les fonctions de la cellule. D'ailleurs, les fonctions de ce gène font de lui un candidat intéressant pour poursuivre l'étude.

1.5.1 *TBC1D25* et ses protéines correspondantes

TBC1D25 (identifiant du gène : 4943), anciennement connu sous le nom d'*OATL1*, est localisé sur le chromosome X et a été initialement associé aux sarcomes et aux carcinomes. Toutefois, les fonctions de ses protéines correspondantes sont peu connues. (Shiple et al., 1995, 1994; Weterman et al., 1996) L'épissage alternatif de ce gène peut produire un transcrit mature composé de six exons constitutifs codant pour la forme canonique de la protéine de 688 aa. Cette forme canonique (identifiant UniProt : Q3MII6-1), aussi appelée isoforme longue, comprend un domaine fonctionnel Tre-2/Bub2/Cdc16 (TBC) et une séquence LIR. (Figure 9) Le domaine TBC comprend l'Arg²⁹⁴ et la Gln³³², qui sont caractéristiques de ce domaine fonctionnel se situant entre la Ser²²⁸ et la Pro⁴³⁴. (Frasa et al., 2012) La séquence LIR est pour sa part composée de six acides aminés (Glu¹³⁴, Asp¹³⁵, Trp¹³⁶, Asp¹³⁷, Ile¹³⁸, Ile¹³⁹). (Kalvari et al., 2014) Cette forme de la protéine est exprimée dans

la plupart des tissus chez l'humain. (*Tissue Expression of TBC1D25 - Summary - The Human Protein Atlas, n.d.*)

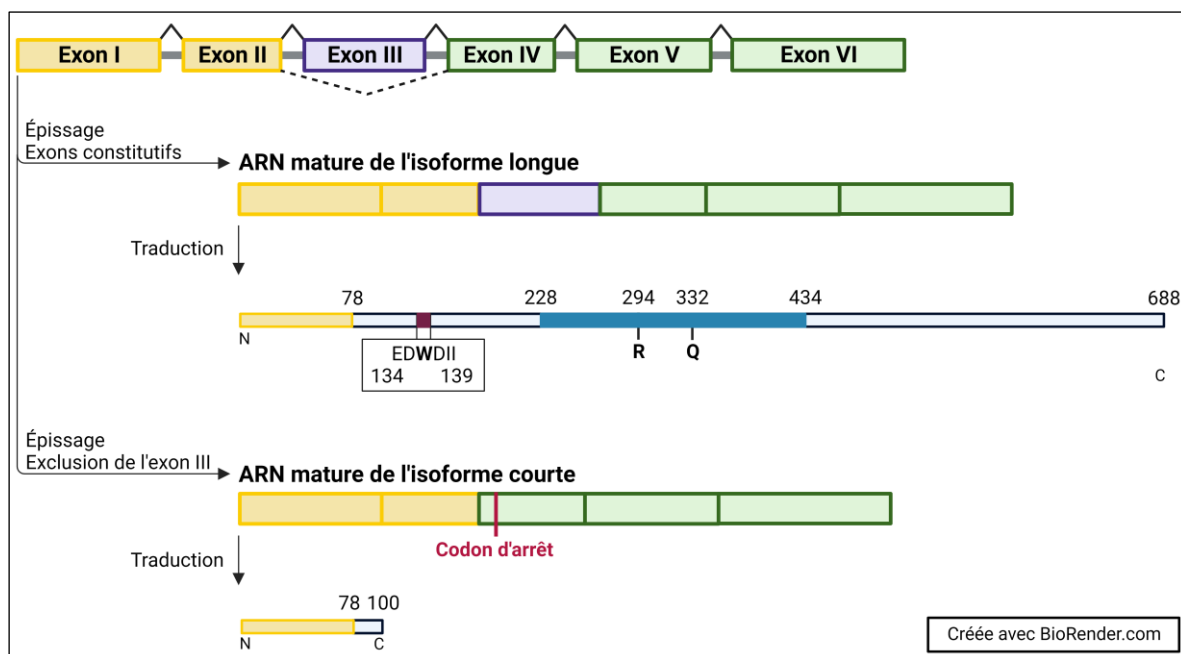


Figure 9: L'épissage alternatif de *TBC1D25*

Le transcrit de l'isoforme longue est composé de six exons constitutifs qui code pour la forme canonique de 688 aa. Le domaine fonctionnel TBC (228 aa à 332 aa) contient les acides aminés Arg²⁹⁴ et Gly³³², caractéristiques du domaine catalytique qui permet l'inactivation des GTPases Rabs. La protéine contient aussi une séquence LIR (134 aa à 139 aa), qui permet l'interaction avec les protéines de la famille d'ATG8. L'exclusion de l'exon III génère l'ARN mature de l'isoforme courte et introduit un codon stop au nucléotide 303. La protéine correspondante contient 100 aa, dont les 78 premiers aa sont identiques à ceux de l'isoforme longue. L'isoforme courte ne contient aucun domaine fonctionnel.

L'épissage alternatif peut également produire un transcrit de cinq exons en excluant l'exon III du transcrit mature, ce qui insert un codon d'arrêt prématuré et code pour une isoforme, dite courte, de seulement 100 aa (identifiant UniProt : Q3MII6-2). Les 78 premiers acides aminés des isoformes sont identiques tandis que les 21 acides aminés en C-terminale sont spécifiques à l'isoforme courte, mais ne possèdent aucun domaine fonctionnel connu. (Figure 9)

Avec son domaine TBC hautement conservé, l'isoforme longue fait partie de la famille des protéines activant les GTPases rabs (rabGAPs), composée de 44 membres. Bien que les rabs aient une activité d'hydrolyse intrinsèque, les rabGAPs accélèrent cette hydrolyse, ce qui est nécessaire pour la réponse rapide des rabs dans le transport vésiculaire. La majorité des membres de la famille des rabGAPs possède une arginine et une glutamine hautement conservées, catalysant l'hydrolyse du guanosine triphosphate (GTP) sur la rab active. (Frasa et al., 2012) Toutefois, le mécanisme des

rabGAPs diffère légèrement des autres membres de la famille élargie des GAPs. Comme tous les GAPs, l'arginine s'insère d'abord au site catalytique de la rab et stabilise la charge négative pendant la transition. Puis, la glutamine du domaine TBC de la GAP se positionne dans le site catalytique de la rab. Dans le cas des rabGAPs, cette glutamine remplace la glutamine catalytique de la rab substrat. Il y a alors formation d'un lien hydrogène avec le GTP, entraînant son hydrolyse et l'inactivation de la rab ciblée. Les changements conformationnels engendrés par cette interaction sont inversés lors du départ du phosphate inorganique, mettant fin à leur interaction. Bien que ce mécanisme n'ait pas été étudié pour tous les rabGAPs, il est probable qu'il s'applique à toutes celles possédant les deux acides aminés conservés, dont TBC1D25. Cependant, les caractéristiques qui dictent la spécificité des rabGAPs pour leur substrat n'ont pas encore été déterminées. (Gavriljuk et al., 2012; Pan et al., 2006)

1.5.2 La régulation du transport vésiculaire par les rabs

Les petites protéines GTPases rabs agissent comme substrats pour les rabGAPs. Ces GTPases rabs font partie de la grande famille des protéines RAS, elles sont monomériques et lient le GTP. Bien qu'elles partagent une structure similaire, les sous-familles de cette classe de protéines ont des fonctions distinctes dans diverses voies de signalisation et dans l'organisation cellulaire. Malgré leurs rôles spécifiques, les différentes sous-classes de petites GTPases collaborent pour maintenir l'intégrité des fonctions de la cellule. (Frasa et al., 2012) La sous-famille des GTPases rabs régule le transport vésiculaire et le trafic de protéines associées au système endomembranaire. Cela signifie que les rabs contrôlent la biogenèse de vésicules, leur transport, leur attachement aux membranes cibles ainsi que la fusion entre vésicules ou avec la membrane plasmique. (Schwartz et al., 2007)

Environ 70 rabs ont été identifiées chez l'humain et sont localisées dans des compartiments intracellulaires distincts en fonction de leur rôle. (Zhen et Stenmark, 2015) Elles fournissent une identité membranaire à ces compartiments, grâce à la formation de microdomaines à la surface des vésicules. (Pfeffer, 2013) Le transport des rabs vers leurs compartiments cibles est finement régulé dès leur synthèse. Après leur synthèse, les petites GTPases forment un complexe avec une protéine escorte des rabs (REP) qui interagit avec une géranylgeranyl transférase. Cela permet la prénylation des rabs, une modification post-traductionnelle qui ajoute un géranylgeranyl sur deux cystéines en C-terminale. Cet ajout est essentiel à l'attachement des rabs à la membrane. (Bhuin and Roy, 2014; Hutagalung and Novick, 2011) Une fois prénylée, la REP transporte la GTPase à une vésicule, où elle est activée grâce à un facteur d'échange de nucléotides guanines (GEF). Le GEF permet l'échange

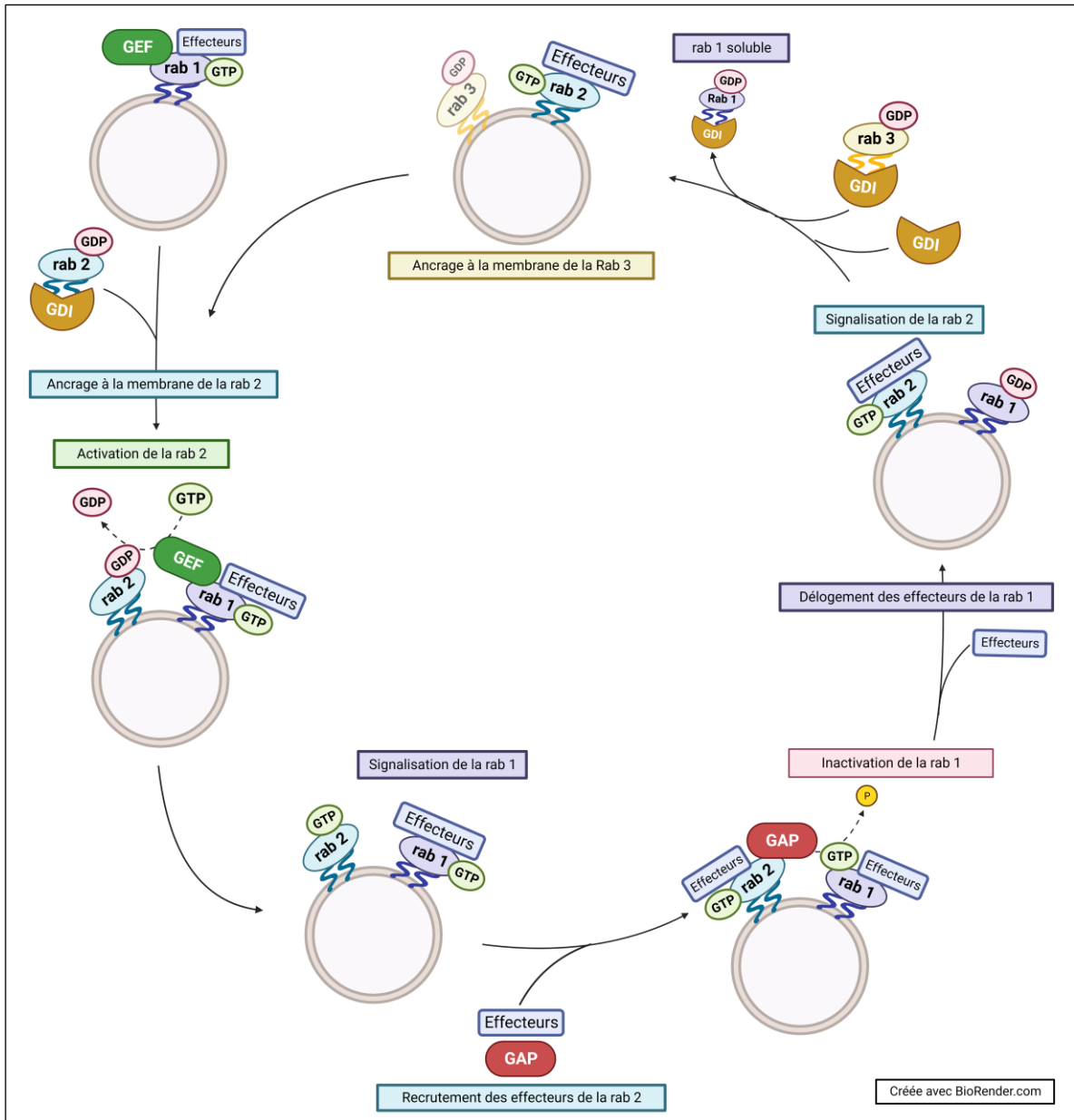


Figure 10: La cascade des rabs

Une rab prénylée s'ancre à une membrane où elle est activée par une GEF qui catalyse l'échange du GDP en GTP. Son activation permet de recruter divers effecteurs et de former des microdomaines de signalisation, afin de réguler le trafic vésiculaire. La signalisation prend fin lors de l'inactivation de la rab grâce à une GAP, qui catalyse l'hydrolyse du GTP. La rab inactive est ensuite délogée de la membrane par un GDI, qui la maintient soluble dans le cytosol. Le trafic vésiculaire est caractérisé par une cascade de rabs, ce qui signifie qu'une rab inactive sera remplacée par une nouvelle rab active à un autre domaine d'une vésicule.

du guanosine diphosphate (GDP) de la rab inactive contre un GTP, changeant ainsi la conformation de la protéine et la rendant active. Cela permet le recrutement de divers effecteurs, qui sont spécifiques à la rab active et stabilisent celle-ci à la membrane. Ces effecteurs sont variés : kinases,

phosphatases, protéines de transport interagissant avec les microtubules, protéines adaptatrices ou encore des protéines régulant l'attachement ou la fusion des vésicules. (Homma et al., 2021; Hutagalung and Novick, 2011; Zhen and Stenmark, 2015) L'activité des rabs termine lorsque le GTP est hydrolysé par sa rab, réaction qui est accélérée par l'activité catalytique d'une rabGAP. Le complexe d'effecteurs se dissocie, et la rab inactive est délogée de la membrane par l'inhibiteur de dissociation de la guanosine (GDI). (Barr et Lambright, 2010; Cherfils et Zeghouf, 2013; Schwartz et al., 2007) Cette rab, en complexe avec le GDI, est soluble dans le cytosol, jusqu'à ce que celle-ci soit livrée à une autre vésicule, où ses fonctions seront à nouveau régulées par ses protéines régulatrices: la GEF, la GAP et le GDI. (Figure 10)

La cascade de rabs régule le transport vésiculaire. Donc, la GEF, faisant partie du complexe d'effecteurs de la rab active sur la vésicule, permet l'activation de la rab nouvellement recrutée. Cette activation conduit au recrutement d'effecteurs par la rab nouvellement active, dont la GAP, qui inactive une rab présente à la membrane pour permettre une nouvelle étape du transport vésiculaire. (Pfeffer, 2017, 2013) Des perturbations de cette cascade de rabs, régulant le transport vésiculaire, sont associées à différentes maladies, dont des troubles neurologiques, des cancers et des désordres immuns. (Bhuin and Roy, 2014; Hutagalung and Novick, 2011; Zhen and Stenmark, 2015)

Les rabGAPs sont donc des acteurs essentiels pour la régulation du transport vésiculaire, et leur rôle dans l'homéostasie cellulaire dépend des rabs substrats qu'elles ciblent. Le rôle de plusieurs membres de cette famille reste toutefois peu connu. Étant donné qu'il y a plus de rabs que de rabGAPs, une rabGAP peut agir sur plusieurs membres de la famille de GTPases. De plus, il a été montré qu'une rab peut être le substrat de plusieurs rabGAPs, suggérant que certains membres de la famille des rabGAPs ont des rôles redondants. La régulation de leur localisation intracellulaire est également importante pour l'inactivation spécifique de leurs rabs substrats. Cependant, tout comme leur substrat, la régulation des rabGAPs est peu connue. L'interaction protéine-protéine avec des rabs, des effecteurs ou d'autres protéines permet le recrutement des rabGAPs à des compartiments intracellulaires spécifiques, où elles participent à des événements précis du transport vésiculaire. (Frasa et al., 2012) Par exemple, TBC1D25 peut être recruté à des compartiments intracellulaires spécifiques par des membres de la famille d'ATG8 via son domaine LIR. (Itoh et al., 2011; Kalvari et al., 2014) De plus, l'activité de certaines rabGAPs est régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. (Frasa et al., 2012) Bien que plusieurs sites de phosphorylation potentiels ont été identifiés dans TBC1D25, il n'existe pas encore

d'évidences expérimentales de ce type de modification sur cette protéine. ("TBC1D25 (human)," n.d.) En résumé, les fonctions des rabGAPs dans l'homéostasie cellulaire dépendent de leur recrutement au compartiment approprié pour inactiver leurs rabs substrats.

1.5.3 Le système endomembranaire de l'ostéoclaste

Les cellules eucaryotes sont composées de nombreux organites délimités par une membrane qui échangent constamment leur contenu via le transport et la fusion de ceux-ci. Ce système endomembranaire inclus le RE, le Golgi, les endosomes et les lysosomes qui permettent aux protéines de suivre différentes voies à travers les organites et les vésicules. Ce système endomembranaire est hautement conservé et comprend le système endocytaire, qui intègre les protéines plasmiques et extracellulaires, ainsi que le système exocytaire, qui exporte les protéines dans le milieu extracellulaire ou à la surface des compartiments. Ce transport de protéines vers le compartiment cible du système endomembranaire est régulé par les rabs, localisées à des compartiments spécifiques. (Borchers et al., 2021; Brighthouse et al., 2010) Dans ce système endomembranaire, plusieurs rabs sont impliquées, telles que la RAB7 localisée aux endosomes tardifs et aux lysosomes, la RAB5 aux endosomes précoces, la RAB6 au Golgi et les RAB1 et RAB2 impliquées dans le transport entre le RE et le Golgi. En plus de ce système endomembranaire, l'ostéoclaste possède deux autres systèmes endomembranaires spécifiques pour la résorption osseuse. Comme présenté précédemment, le transport directionnel des lysosomes sécrétoires vers la membrane plasmique adjacente à l'os permet leur fusion avec la membrane, formant la membrane plissée qui permet la sécrétion du contenu des vésicules pour la dégradation de la matrice. La membrane plissée possède donc les particularités des organelles liées aux lysosomes retrouvées chez les cellules sécrétrices. (Shimada-Sugawara et al., 2015) De plus, la transcytose, un transport vésiculaire du domaine apical vers le domaine fonctionnel sécrétoire permet l'évacuation des produits de dégradation de la lacune de résorption. (Salo et al., 1996)

Vu l'implication du système endomembranaire dans les fonctions spécifiques des ostéoclastes, il est attendu de trouver un grand nombre de rabs exprimé chez ces cellules. En tout, l'expression génique de 33 rabs a été détectée chez les ostéoclastes, dont l'expression de 26 d'entre elles a été confirmée chez l'ostéoclaste humain. (Charles et al., 2012a; Hirvonen et al., 2012; Zhao et al., 2002) 13 de ces 33 rabs ont été détectées au niveau protéique. (Hirvonen et al., 2012; Shimada-Sugawara et al., 2015; Yamaguchi et al., 2018; Zhao et al., 2002) Malgré la présence de nombreuses rabs dans les ostéoclastes, probablement importantes pour leurs fonctions, il existe peu d'informations sur

leur rôle, leurs effecteurs ainsi que leurs régulateurs. Certaines de ces rabs ont toutefois des régulateurs ou des effecteurs connus dans d'autres types cellulaires, mais ils ont été rarement étudiés chez les ostéoclastes. (Roy et Roux, 2018)

1.5.3.1 Les rabs impliquées dans la résorption osseuse

Il manque encore plusieurs informations à propos de la cascade de rabs impliquée dans la sécrétion d'enzymes lysosomales dans la lacune de résorption pour la dégradation de la matrice osseuse. L'identification des premières rabs chez les ostéoclastes remonte au début du siècle, lorsque l'expression protéique de RAB3B, RAB3C et dans une moindre mesure RAB3A a été détectée chez les ostéoclastes de souris. Leur expression est augmentée durant l'ostéoclastogénèse. De plus, RAB3B et RAB3C de même que V-ATPASE et SRC sont localisée aux vésicules acidifiées chez les ostéoclastes murins matures. (Abu-Amer et al., 1999) Des études ultérieures ont confirmé la faible expression de ces GTPases de la sous-famille RAB3 et montré que RAB3D est exprimée de manière prédominante chez les ostéoclastes murins. L'importance de cette GTPases dans l'ostéoclaste murin a été démontrée par le phénotype d'ostéopétrose observé chez la souris déficiente en RAB3D. *In vitro*, un défaut de formation de la membrane plissée a été observé chez les ostéoclastes provenant de cette souris transgénique. RAB3D participe à la biogenèse et à la maturation des vésicules sécrétrices au niveau du réseau *trans* Golgi et permet la connexion de ces vésicules aux microtubules via son effecteur DYNLT1. (Figure 11) (Pavlos et al., 2011, 2005) RAB3D facilite plusieurs étapes du transport des vésicules sécrétrices en interagissant notamment avec la calmoduline à la membrane plissée, où la GTPase régule la fusion de vésicules RAB3D⁺ dépendante de la concentration de calcium à l'intérieur de la lacune de résorption. (Zhu et al., 2016) Malgré ses rôles dans plusieurs étapes du transport vésiculaire lors de la résorption osseuse, aucun régulateur n'a encore été identifié pour RAB3D. (Frasa et al., 2012; Roy and Roux, 2018)

Bien que RAB5C, RAB6 et RAB9 ont été détectées au niveau protéique, leur rôle dans l'ostéoclaste semble être au niveau du système endomembranaire conservé, et aucun rôle ne leur a été associé dans le transport des vésicules sécrétrices de la résorption osseuse. (Coxon et al., 2001; Zhao et al., 2002) Cependant, RAB9 est localisée à la membrane plissée et présente un motif complémentaire à RAB7, qui suggère un rôle dans l'établissement de la membrane plissée qui n'a toutefois pas été défini. (Zhao et al., 2002)

RAB7, ancrée aux lysosomes sécrétoires, confère une identité spécifique à ces vésicules dans le système endomembranaire conservé. Étant donné l'implication des lysosomes sécrétoires dans la

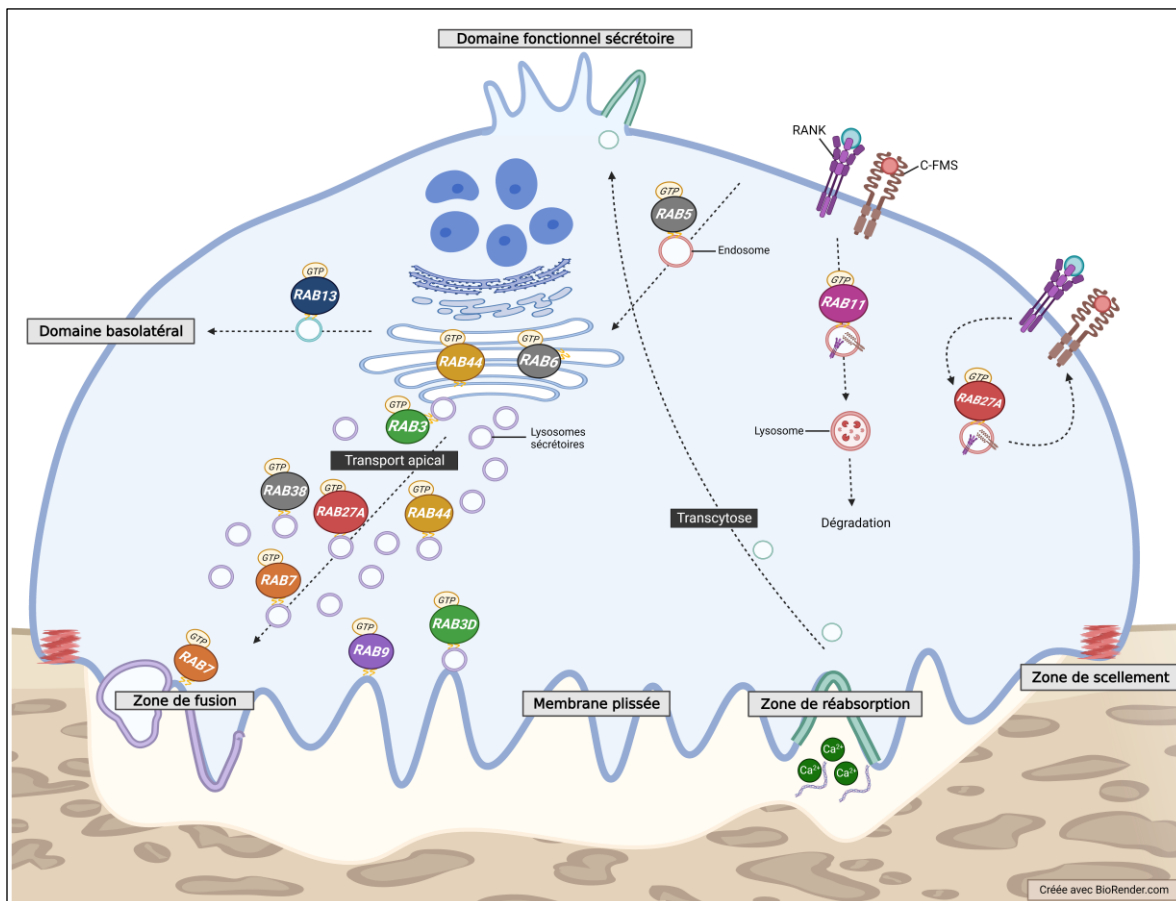


Figure 11: Les rabs dans l'ostéoclaste actif

Certaines rabs jouent un rôle dans la biogénèse (RAB3D) des vésicules sécrétrices, leur transport apical (RAB7, RAB27A et RAB44), et leur fusion avec la membrane plasmique adjacente à l'os (RAB7 et RAB3D). D'autres rabs sont impliquées dans l'ostéoclastogénèse en régulant la présence à la surface de C-FMS et RANK (RAB11A, RAB11B et RAB27A). Malgré leur détection au niveau protéique, certaines rabs n'ont pas de rôle connu dans la régulation de la différenciation et de l'activité de l'ostéoclaste (RAB5, RAB6, RAB9, RAB13 et RAB38).

résorption osseuse et leur similarité avec la membrane plissée, RAB7 a été largement étudiée chez les ostéoclastes. D'ailleurs, RAB7 est localisée à la membrane plissée. (Figure 11) (Palokangas et al., 1997; Zhao et al., 2002) L'inhibition de son expression altère la polarisation de l'ostéoclaste, et entraîne l'inhibition de la résorption osseuse. L'absence de RAB7 perturbe le transport des vésicules vers la membrane plasmique ainsi que la formation de la zone de scellement. (Zhao et al., 2001) Parmi ses effecteurs, RAB7 colocalise avec RAC1 en périphérie de la membrane plissée, près de la zone de scellement. Cette interaction de RAB7 et RAC1 permettrait le transfert des lysosomes sécrétrices des microtubules aux microfilaments, facilitant leur transport vers le domaine de fusion de la membrane plissée. (Sun et al., 2005; Touaitahuata et al., 2014) RAB7 interagit également avec

le membre 1 de la famille M contenant le domaine d'homologie de la pleckstrine (PLEKHM1) durant la résorption osseuse. L'altération de cette interaction est l'une des causes de l'ostéopétrose chez l'humain. Les ostéoclastes présentant ces mutations se différencient en ostéoclastes matures et sont en mesure de former la zone de scellement, mais la formation de leur membrane plissée est altérée. (Bo et al., 2016; Van Wesenbeeck et al., 2007) PLEKHM1 est une protéine adaptatrice pouvant recruter diverses protéines et permet entre autres la régulation du positionnement des vésicules sécrétrices par leur transport via les microtubules et l'acidification de la lacune de résorption lors de son interaction avec RAB7. Cette interaction pourrait aussi réguler la signalisation de TAK1 et des intégrines. (Fujiwara et al., 2016; Witwicka et al., 2015) Le positionnement des vésicules sécrétrices médié par RAB7 est entre autres possible grâce à son recrutement aux lysosomes par la V-ATPASE. (Matsumoto et al., 2018; Yang et al., 2012)

Malgré quelques régulateurs connus de RAB7, les GAPs régulant son activité dans les ostéoclastes sont inconnues. Il serait erroné d'extrapoler à partir d'autres modèles cellulaires, car le rôle de RAB7 dans l'ostéoclaste semble différer de ses fonctions connues dans d'autres types cellulaires. Dans les ostéoclastes, la GTPase ne colocalise pas avec la protéine lysosomale interagissant avec les rabs (RILP), l'un de ses effecteurs connus impliqués dans le positionnement des lysosomes. De plus, son interaction avec PLEKHM1 ne régule pas les étapes terminales de l'autophagie comme dans d'autres types cellulaires. (Bo et al., 2016; Sun et al., 2005)

Au niveau protéique, les ostéoclastes murins expriment RAB11A et RAB11B, alors que seule l'expression génique de *RAB11A* a été évaluée et détectée chez les ostéoclastes humains. Chez la souris, les deux GTPases sont localisées aux endosomes précoces et tardifs, sans être retrouvées aux lysosomes. (Okusha et al., 2020; Tran et al., 2020a; Zhao et al., 2002) Chez les ostéoclastes murins, RAB11A et RAB11B jouent des rôles redondants ou interconnectés dans la régulation négative de l'ostéoclaste en régulant l'expression de surface des récepteurs C-FMS et RANK. (Figure 11) Leur fonction favorise la dégradation des récepteurs plutôt que leur recyclage, en dirigeant les endosomes vers les lysosomes contenant la cathepsine B et D. (Okusha et al., 2020; Tran et al., 2020a)

Pour les ostéoclastes humains, seul le rôle de RAB13 a été étudié à ce jour, puisque son expression est augmentée durant l'ostéoclastogénèse. Au niveau intracellulaire, RAB13 est localisée aux vésicules périnucléaires et en périphérie de l'ostéoclaste actif, sans association avec la zone de scellement ou la membrane plissée. Sa colocalisation avec divers marqueurs a exclu son rôle dans le transport associé à la résorption osseuse, la transcytose, l'adhésion et le transport de glucose

dans les ostéoclastes, alors que ce sont des fonctions connues de RAB13 dans d'autres types cellulaires. (Hirvonen et al., 2012) Cependant, RAB13 est impliquée dans le transport de vésicules du réseau *trans* Golgi à la membrane basolatérale, bien que le rôle de ce trafic vésiculaire reste inconnu. (Figure 11) (Mirkka J. Hirvonen et al., 2013) Comme RAB13, l'expression de RAB38 augmente durant l'ostéoclastogénèse et est dépendante de l'activation de NFATC1. Malgré sa présence à la membrane des vésicules sécrétrices, son inactivation constitutive n'affecte ni le squelette des souris transgéniques, ni les ostéoclastes dérivés de ces souris transgéniques, puisqu'ils sont en mesure de se différencier en ostéoclaste mature et de résorber. (Charles et al., 2012b; Ng et al., 2023) Cela suggère que certaines rabs ont des rôles non essentiels ou redondants dans les ostéoclastes. L'ostéoclastogénèse entraîne une augmentation de l'expression de plusieurs rabs, dont RAB44. Cependant, RAB44 agit comme un régulateur négatif de l'ostéoclastogénèse en modulant l'influx calcique intracellulaire, ce qui limite l'activation et la translocation au noyau de NFATC1. (Yamaguchi et al., 2018) L'augmentation de l'expression d'une rab ne corrèle donc pas toujours avec la formation ou l'activité de l'ostéoclaste.

L'expression de RAB27A augmente également durant l'ostéoclastogénèse, et elle se localise aux lysosomes des ostéoclastes grâce à son interaction avec la V-ATPASE. (Matsumoto et al., 2018; Shimada-Sugawara et al., 2015) L'inhibition de l'expression de RAB27A induit la différenciation d'ostéoclastes avec un nombre plus élevé de noyaux, grâce à une augmentation de la signalisation induite par RANKL et M-CSF. Les ostéoclastes déficients en RAB27A montrent une augmentation de récepteurs C-FMS à la surface cellulaire et un transport altéré de RANK. (Shimada-Sugawara et al., 2015; Tang et al., 2017) RAB27A est aussi impliquée dans la résorption osseuse, et l'inhibition de son expression réduit la résorption, en altérant la localisation de LAMP2 et la CTSK à la membrane plissée et la formation de la zone de scellement. (Shimada-Sugawara et al., 2015) Les rôles des rabs peuvent donc varier en fonction de l'état de différenciation de l'ostéoclaste, et ainsi influencer positivement et négativement l'ostéoclaste selon le contexte.

Certaines rabs sont donc connues pour être impliquées dans le transport vésiculaire polarisé des vésicules sécrétrices nécessaire à la résorption osseuse, mais les régulateurs et la plupart de leurs effecteurs restent encore inconnus. À ce jour, seule l'expression de la rabGAP TBC1D25 et de la rabGEF RIN3 a été confirmée dans les ostéoclastes humains, mais leurs fonctions ne sont pas connues. (Klinck et al., 2014; Vallet et al., 2015)

De plus, aucune rab n'a encore été associée à la transcytose. RAB17 et RAB25 ont été impliquées dans ce transport vésiculaire dans d'autres cellules polarisées, mais leurs expressions n'ont pas été

détectées chez l'ostéoclaste humain. (Bhuin et Roy, 2014; Hirvonen et al., 2012; Itzstein et al., 2011) Étant donné les rôles divers des rabs dans différentes cellules sécrétrices, il n'est pas possible d'extrapoler leurs fonctions, leurs effecteurs et leurs régulateurs dans l'ostéoclaste basé sur d'autres types cellulaires avec des fonctions de sécrétion. (Fukuda, 2013; Millar et al., 2002)

1.5.4 Les fonctions connues de TBC1D25

Bien que les fonctions de TBC1D25 ne soient pas bien connues, quelques rabs ont été identifiées comme des substrats de TBC1D25 *in vitro*. Une interaction entre la rabGAP et RAB2A a été montrée par l'essai double hybride, puis confirmée par un essai GAP, montrant que la protéine accélère l'activité d'hydrolyse de la RAB2A et de quelques autres rabs. TBC1D25 démontre une activité catalytique plus prononcée pour RAB2A, mais possède aussi une activité catalytique pour RAB13 et RAB34. (Itoh et al., 2006) Une étude a identifié spécifiquement RAB33B comme un substrat de TBC1D25, mais aucune activité catalytique n'a été montrée pour neuf autres rabs étudiées (RAB1A, 3A, 4A, 5A, 7, 9A, 11A, 24 et 27A). (Itoh et al., 2011) Parmi ces rabs, l'expression de RAB13, de RAB33B et de RAB34 a été détectée chez les ostéoclastes humains, alors que la RAB2A n'a jamais fait l'objet d'analyses. (Hirvonen et al., 2012) De plus, l'activité catalytique de TBC1D25 pour de nombreuses rabs exprimées chez l'ostéoclaste reste inconnue.

1.5.4.1 Rôle de TBC1D25 dans l'autophagie

Pour l'instant, le seul rôle connu de TBC1D25 est sa participation dans la maturation des autophagosomes, avec RAB33B en tant que substrat. Une étude sur les rabGAPs impliquées dans l'autophagie a permis de localiser TBC1D25 à la membrane d'isolation et à l'autophagosome. Sa localisation cellulaire a été évaluée dans divers contextes, montrant une distribution diffuse dans le cytoplasme en condition standard de culture, mais un recrutement aux autophagosomes lors de l'initiation de l'autophagie. De plus, une autophagie altérée favorise la localisation partielle de TBC1D25 au Golgi. Le recrutement de TBC1D25 à l'autophagosome est possible grâce à son interaction directe avec LC3. (Itoh et al., 2011) Cependant, contrairement à d'autres partenaires d'interaction de LC3 durant l'autophagie, TBC1D25 est localisée seulement à la surface extérieure des autophagosomes et n'est donc pas dégradée durant le processus. (Hirano et al., 2016) En plus de son interaction avec LC3, TBC1D25 interagit également avec la GTPase RAB33B à la surface de l'autophagosome. Il a déjà été établi que RAB33B interagit avec ATG16L1 durant l'autophagie, favorisant le recrutement du complexe ATG12-ATG5 à la membrane d'isolation durant l'étape d'élongation. (Itoh et al., 2008) Comme mentionné précédemment, ce complexe protéique facilite

la lipidation et la localisation de LC3-II à la vésicule en formation. (Hanada et al., 2007) La surexpression de TBC1D25 augmente la lipidation de LC3, même en condition standard de culture. (Itoh et al., 2008) L'analyse en immunofluorescence a révélé un délai de la maturation des autophagosomes lors de la surexpression de la protéine. L'activation constitutive du substrat affecte aussi les étapes terminales de la maturation et provoque un délai de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Avec ces résultats, il a été suggéré que la forme active de RAB33B se localise à la membrane d'isolation et permet le recrutement du complexe ATG12-ATG5 via ATG16L1. Ceci permet la conjugaison de LC3 au PE et sa localisation à la membrane d'isolation durant l'élongation de la membrane. Dans un second temps, TBC1D25 est recrutée à l'autophagosome grâce à son interaction avec LC3, désactivant ainsi RAB33B. Cette inactivation permet la dissociation du complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 de la surface de la vésicule, conduisant à la maturation de l'autophagosome et à sa fusion avec le lysosome. (Itoh et al., 2011)

Comme indiqué précédemment, l'autophagie est cruciale pour la régulation de la biologie de l'ostéoclaste, impliquant la biogenèse de vésicules, leur transport et finalement leur fusion avec un lysosome pour en dégrader son contenu. Vu les nombreuses étapes de transport vésiculaire associées à l'autophagie, plusieurs rabs exprimées dans l'ostéoclaste ont des fonctions connues dans ce processus. Parmi les rabs exprimées dans l'ostéoclaste humain, 14 ont des rôles connus dans l'autophagie. Cependant, l'activité catalytique de TBC1D25 n'a jamais été évaluée sur quelques-unes d'entre elles, qui pourraient être des substrats potentiels. Deux de ces rabs, RAB18 et RAB32, sont impliquées dans l'initiation de l'autophagie. Le rôle de la RAB18 reste cependant peu défini. (Feldmann et al., 2017) En revanche, RAB32 est connue pour être nécessaire à la formation de l'autophagosome en contribuant à la formation de la membrane d'isolation à partir du RE. (Amaya et al., 2015; Szatmári et Sass, 2014) Certaines rabs jouent un rôle spécifique aux étapes terminales de l'autophagie. C'est le cas de la RAB21, qui est impliquée dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. (Jean et al., 2015) Les RAB8, 23 et 30 sont, elles, spécifiques à l'autophagie sélective lors de la défense contre des pathogènes. (Amaya et al., 2015; Oda et al., 2016; Roy et Roux, 2018; Szatmári et Sass, 2014) Vu la localisation de TBC1D25 à la membrane d'isolation et à l'autophagosome, la rabGAP pourrait inactiver plusieurs rabs durant l'autophagie.

1.5.4.2 Régulation de l'activation de TAK1 par TBC1D25

Bien qu'aucune rab n'ait été identifiée dans ce processus, TBC1D25 a récemment été impliquée dans la régulation négative de la signalisation de TAK1. Des études ont montré que la surexpression de TBC1D25 réduit l'activation de TAK1, ainsi que de p38 et JNK, sans affecter les niveaux de

phosphorylation de ERK1/2. (Guo et al., 2020; Zhang et al., 2022) Une interaction directe entre TBC1D25 et TAK1 via une séquence située entre la séquence LIR et le domaine TBC (138 à 226) permet à TBC1D25 de moduler l'activité de la kinase. (Guo et al., 2020) TAK1 est au centre de la signalisation induite par RANKL chez l'ostéoclaste, donc la modulation de cette voie de signalisation par l'altération de l'épissage alternatif de TBC1D25 pourrait influencer la différenciation et la fonction de la cellule.

1.5.4.3 Rôles potentiels de TBC1D25 en fonction de ses substrats

Outre son rôle dans l'autophagie, TBC1D25 et RAB33B ont également été associées au système endomembranaire conservé, qui permet le transport de nanoparticules des endosomes vers les lysosomes. Bien que leur interaction n'ait pas été évaluée dans ce contexte spécifique, une altération du transport des nanoparticules aux lysosomes a été observée lors de la modulation de l'expression de l'une ou l'autre des protéines. (Panarella et al., 2016) De plus, RAB33B a été associée à d'autres événements du trafic endomembranaire. Son interaction avec son effecteur ATG16L1 régule une étape du transport de vésicules lors de la sécrétion de protéines via l'exophagie. (Morgan et al., 2019) Dans l'étude ayant identifié le rôle de TBC1D25 dans l'autophagie, une localisation partielle de TBC1D25 au Golgi a été observée lors de l'inhibition de l'autophagie. Avant de connaître son rôle dans l'autophagie, RAB33B avait été localisée principalement dans la région médiane du Golgi, où elle participe au transport rétrograde du Golgi vers le RE. RAB33B et ses effecteurs maintiennent l'intégrité du Golgi et activent RAB6, impliquée dans les étapes ultérieures du transport rétrograde. (Pusapati et al., 2012; Starr et al., 2010; Valsdottir et al., 2001) Selon sa localisation intracellulaire, TBC1D25 pourrait réguler les activités de RAB33B dans différents événements du transport vésiculaire.

Quant à elle, RAB2A participe au transport endomembranaire entre le Golgi et le RE, à la fois dans le transport antérograde et rétrograde. (Dong et Wu, 2007; Galea et al., 2015) Étant donné sa localisation, RAB2 participe aussi à l'initiation de l'autophagie en recrutant ULK1 et ATG9 à la membrane d'isolation, ainsi qu'à la maturation de l'autophagosome par son interaction avec le complexe HOPS. (Ding et al., 2019; Lőrincz et al., 2017) De plus, RAB2A en partenariat avec RAB27A, régule la maturation des vésicules sécrétrices. (Matsunaga et al., 2017) Une coopération similaire pourrait permettre la formation de la membrane plissée, étant donné qu'il a été montré que RAB27A est nécessaire lors de la résorption osseuse. (Shimada-Sugawara et al., 2015) Finalement, une augmentation de l'expression de RAB2A a également été associée à l'activation de la voie de

signalisation de ERK1/2 dans certains cancers, voie de signalisation qui est importante pour la survie de l'ostéoclaste et la régulation de MTORC1. (Luo et al., 2015; Wang et al., 2021) En inactivant RAB2A, TBC1D25 pourrait jouer plusieurs rôles essentiels dans la régulation de l'ostéoclaste.

En plus de son rôle peu défini dans l'ostéoclaste, RAB13 a été impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que la plasticité neuronale, la macropinocytose, la signalisation de l'insuline et l'assemblage des jonctions serrées. (Condon et al., 2018; Giovanni et al., 2005; Marzesco et al., 2002; Sun et al., 2010) Son rôle dans la régulation de l'inactivation de MTORC1 via l'activation d'AMPK et sa localisation aux autophagosomes pourraient être d'autres aspects d'intérêt qui n'ont pas été explorés dans l'ostéoclaste. (Hirvonen et al., 2012; Zhang et al., 2017) Cependant, étant donné que la diminution de l'expression de RAB13 dans l'ostéoclaste a un impact minime, la modulation de l'expression de TBC1D25 aurait un effet négligeable, si RAB13 est le seul substrat de la rabGAP dans l'ostéoclaste.

Pour sa part, le principal rôle identifié pour RAB34 est son implication dans le positionnement des lysosomes grâce à son interaction avec son effecteur RILP. La localisation de RAB34 au Golgi lui permet de participer au transport intra-Golgi, ainsi qu'au positionnement des lysosomes via son effecteur qui interagit avec le réseau de microtubules. L'activation de RAB34 entraîne la redistribution périnucléaire des lysosomes, tandis que son inactivation les localise en périphérie de la cellule. La régulation de ses fonctions est essentielle pour la sécrétion de protéines à la membrane plasmique. (Goldenberg et al., 2007; Goldenberg et Silverman, 2009; Kasmapour et al., 2013; Wang et Hong, 2002) De plus, RAB34 a été impliquée dans l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses du sein, où son expression est augmentée. Son inhibition favorise la dégradation des intégrines, alors que sa phosphorylation par SRC permet son recrutement à l'intégrine $\beta 3$, favorisant l'internalisation et le recyclage de l'intégrine. Par ce mécanisme, RAB34 favorise la migration. (Sun et al., 2018) RAB34 pourrait être impliquée dans le recyclage de l'intégrine $\beta 3$ et dans le positionnement des lysosomes dans l'ostéoclaste et par l'entremise de cette rab, TBC1D25 participerait à la résorption osseuse et la migration de la cellule.

Étant donné les fonctions divergentes de certaines rabs dans divers types cellulaires, il est nécessaire d'étudier les fonctions de TBC1D25 dans l'ostéoclaste afin de définir son rôle dans le système endomembranaire de cette cellule. L'altération de l'épissage alternatif de TBC1D25 dans l'ostéoclaste pagétique pourrait affecter plusieurs aspects de l'ostéoclaste, en fonction des rabs qui sont ses substrats de TBC1D25 dans cette cellule.

1.6 Le gène *LGALS8*

Le second gène d'intérêt de cette étude est *LGALS8*, codant pour la galectine-8. Une diminution significative du PSI de *LGALS8* est observée dans les ostéoclastes pagétiques par rapport aux ostéoclastes sains. Parmi les six événements d'épissage alternatif identifiés, cette variation était la plus importante. Cette dernière indique une diminution de l'expression de l'isoforme longue dans les ostéoclastes pagétiques. En plus de cette altération, l'expression relative de *LGALS8* est augmentée dans les ostéoclastes pagétiques comparés aux ostéoclastes sains, sans association à la mutation p62^{P392L}. (Klinck et al., 2014) Comme *TBC1D25*, *LGALS8* et ses protéines correspondantes n'ont jamais été étudiés dans l'ostéoclaste. Cependant, ses fonctions sont plus connues, vu son implication dans divers processus cellulaires grâce à sa capacité à lier les carbohydrates.

1.6.1 Les galectines

Jusqu'à maintenant, plus de 100 lectines animales ont été identifiées, partageant toutes la capacité à lier les carbohydrates. Ces lectines sont classées en 13 sous-groupes en fonction de leur localisation cellulaire, de l'affinité de leur domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) et de la structure de ce domaine. (Radhakrishnan et al., 2022) Parmi cette grande classe de protéines se trouve les galectines, de petites protéines solubles qui se lient aux β -galactosides, des carbohydrates composés

d'au moins un galactose. (Gabijs et al., 2022) Cette famille de lectine comprend 16 gènes chez les vertébrés, dont 12 sont exprimés chez l'humain. Les protéines correspondantes possèdent toutes au moins un domaine CRD hautement conservé. Les galectines sont classées en trois sous-groupes : les galectines monovalentes qui ont un seul domaine CRD (galectine-1, -2, -7, -10, -13, -14, -16); la galectine-3 chimérique qui a un domaine CRD et une

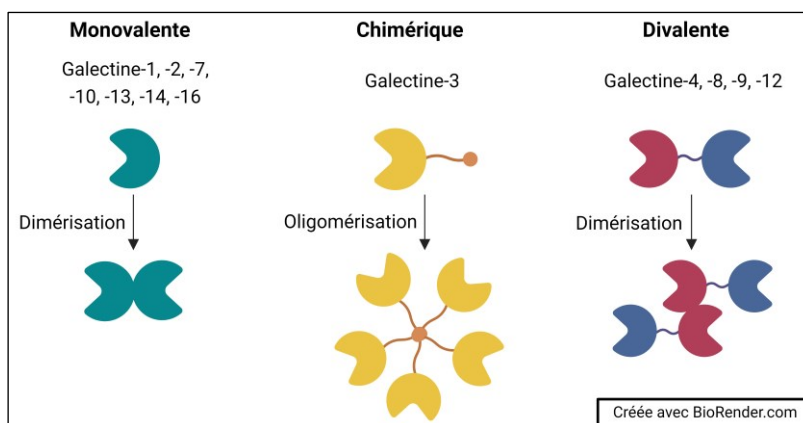


Figure 12: Les galectines

Chez l'humain, au total 12 galectines sont exprimées. Ces galectines sont divisées en trois sous-groupes selon leur structure. Les galectines monovalentes comptent sept membres et possèdent un seul CRD. La galectine-3 chimérique possède un CRD ainsi qu'une séquence peptidique en N-terminale. Les galectines divalentes comptent quatre membres et possèdent deux CRDs reliés entre eux par un peptide de liaison qui varie en taille. Les galectines ont la capacité d'oligomériser, ce qui augmente leur multivalence.

(galectine-1, -2, -7, -10, -13, -14, -16); la galectine-3 chimérique qui a un domaine CRD et une

séquence peptidique en N-terminale; et les galectines divalentes (galectine-4, -8, -9, -12) qui possèdent deux domaines CRDs reliés par une chaîne peptidique de taille variable. (Figure 12) (Cummings et al., 2022; Tazhitdinova et Timoshenko, 2020) Certaines galectines sont exprimées dans un large spectre de types cellulaires (galectine-1, -3, -8, -9) alors que d'autres sont retrouvées dans des types cellulaires (galectine-10) ou des systèmes (galectine-2, -4, -7, -12, -13, -14, -16) spécifiques. (Brinchmann et al., 2018; Cummings et al., 2022; Si et al., 2021)

Le domaine CRD hautement conservé des galectines est formé d'environ 130 aa, organisés en 11 feuillets β disposés de manière antiparallèle puis repliés pour former une structure compacte de sandwich β . La face S de la protéine, qui présente une surface concave, permet la liaison aux glycanes de la taille d'un tétrasaccharide. À l'opposé de la face S se trouve la face F, qui peut contenir des séquences de liaison aux peptides qui permet la liaison de protéines carbohydrate-indépendante, en plus de conférer la capacité de dimérisation aux galectines. Outre le CRD, les galectines ne possèdent aucun autre domaine fonctionnel. (Chan et al., 2018; Dings et al., 2018; Johannes et al., 2018; Thiemann et Baum, 2016)

Les galectines sont synthétisées dans le cytosol et, contrairement à plusieurs lectines, ne contiennent pas de séquence d'ancrage. Après leur synthèse, elles sont solubles dans le cytosol pour la majeure partie de leur vie. Elles sont aussi présentes dans divers compartiments intracellulaires tels que les mitochondries, les vésicules ou le noyau. (Johannes et al., 2018; Vladiou et al., 2014) De plus, elles peuvent être présentes dans le milieu extracellulaire. Bien qu'elles soient dans le milieu extracellulaire, les galectines ne possèdent pas de séquence signal permettant leur sécrétion par le système endomembranaire impliquant le RE et le Golgi. (Bänfer et Jacob, 2020; Cummings et al., 2022; Johannes et al., 2018)

1.6.1.1 LGALS8 et ses protéines correspondantes

La galectine-8 divalente présente les caractéristiques typiques des galectines. *LGALS8* (identifiant du gène : 3964) est situé sur le chromosome 1 chez l'humain et peut produire jusqu'à sept transcrits d'ARN messager matures issus de l'inclusion d'exons ou d'un intron entre les exons constitutifs VIII et IX. (Ahmed et al., 2007; Bidon et al., 2001b; Gopalkrishnan et al., 2000) Quatre de ces transcrits incorporent un codon d'arrêt prématuré, conduisant aux formes monovalentes de la galectine-8, mais l'expression protéique de ces isoformes n'a jamais été détectée. (Ahmed et al., 2007; Bidon-Wagner et Le Pennec, 2002) Les trois autres transcrits encodent des isoformes

divalentes de la protéine, dont l'expression de deux a été détectée chez l'humain, en ARN et en protéine. (Camby et al., 2011; Friedel et al., 2016; Nagy, 2002)

La forme canonique de la galectine-8 humaine, la galectine-8 courte (identifiant UniProt : O00214-1), est composée de 317 aa. Comme les autres galectines divalentes, elle comprend un domaine CRD en N-terminal (N-CRD) de 150 aa et un deuxième CRD en C-terminal (C-CRD) de 134 aa. Les CRDs sont reliés entre eux par une séquence peptidique de 33 aa. En revanche, l'isoforme résultant de la rétention de l'exon VIIIb, la galectine-8 longue, possède deux domaines CRDs identiques à la forme courte, mais diffère dans la longueur du peptide de liaison qui possède 42 aa supplémentaires. La forme longue est donc composée de 359 aa (identifiant Uniprot : O00214-2) avec un peptide de liaison de 75 aa, qui contient un site de clivage de la thrombine. (Figure 13) (Nishi et al., 2006; Weinmann et al., 2018; Zhang et al., 2015) L'épissage alternatif de *LGALS8* n'est pas conservé entre les espèces. Par exemple, chez la souris, la longueur du peptide de liaison des isoformes de la galectine-8 varie seulement de 9 aa (316 aa et 325 aa) (Tribulatti et al., 2007) et de 28 aa chez le poulet (296 aa et 317 aa) (Kaltner et al., 2009). Cependant, la séquence d'acides aminés des domaines CRDs est hautement conservée entre les espèces et parmi la famille des galectines. (Verkerke et al., 2022; Vokhmyanina et al., 2011)

La galectine-8 présente une affinité élevée pour les glycanes contenant un groupement terminal avec un acide sialique ou un sulfate, ainsi que plusieurs glycolipides avec ces mêmes groupements. Cependant, son affinité est moindre pour les glycanes avec plusieurs embranchements, mais forte pour les glycanes contenant des répétitions N-acétyl-D-lactosamine (LacNAc). (Hirabayashi et al., 2002; Ideo et al., 2003) L'affinité de la galectine-8 pour ces substrats est majoritairement attribuée à son N-CRD. Des acides aminés spécifiques tels que l'Arg⁴⁵, la Gln⁴⁷ et l'Arg⁵⁹ au site secondaire de liaison (B) sont essentiels pour la liaison des groupements d'acide sialique et de sulfates. Au contraire, le site secondaire de liaison éloignée (A) confère une affinité pour les répétitions LacNAc. (Bohari et al., 2016; Ideo et al., 2011) Le domaine N-CRD lui permet aussi de lier divers glycolipides. (Ideo et al., 2003; Lete et al., 2022) L'affinité de la galectine-8 pour les glycolipides et les groupements d'acide sialique pourrait jouer un rôle important dans la différenciation des ostéoclastes, car la présence de ces glycanes est essentielle à ce processus. (Ersek et al., 2015; Takahata et al., 2007) Pour sa part, le C-CRD a une préférence pour les répétitions LacNAc et les antigènes des groupes sanguins A et B qui comportent un groupement fucose en position terminale. Bien que l'affinité du C-CRD soit modérée pour certains glycanes par rapport au N-CRD, la face F de

ce domaine confère à la galectine-8 la capacité unique d'effectuer une interaction protéine-protéine avec NDP52. (Kim et al., 2013; Li et al., 2013)

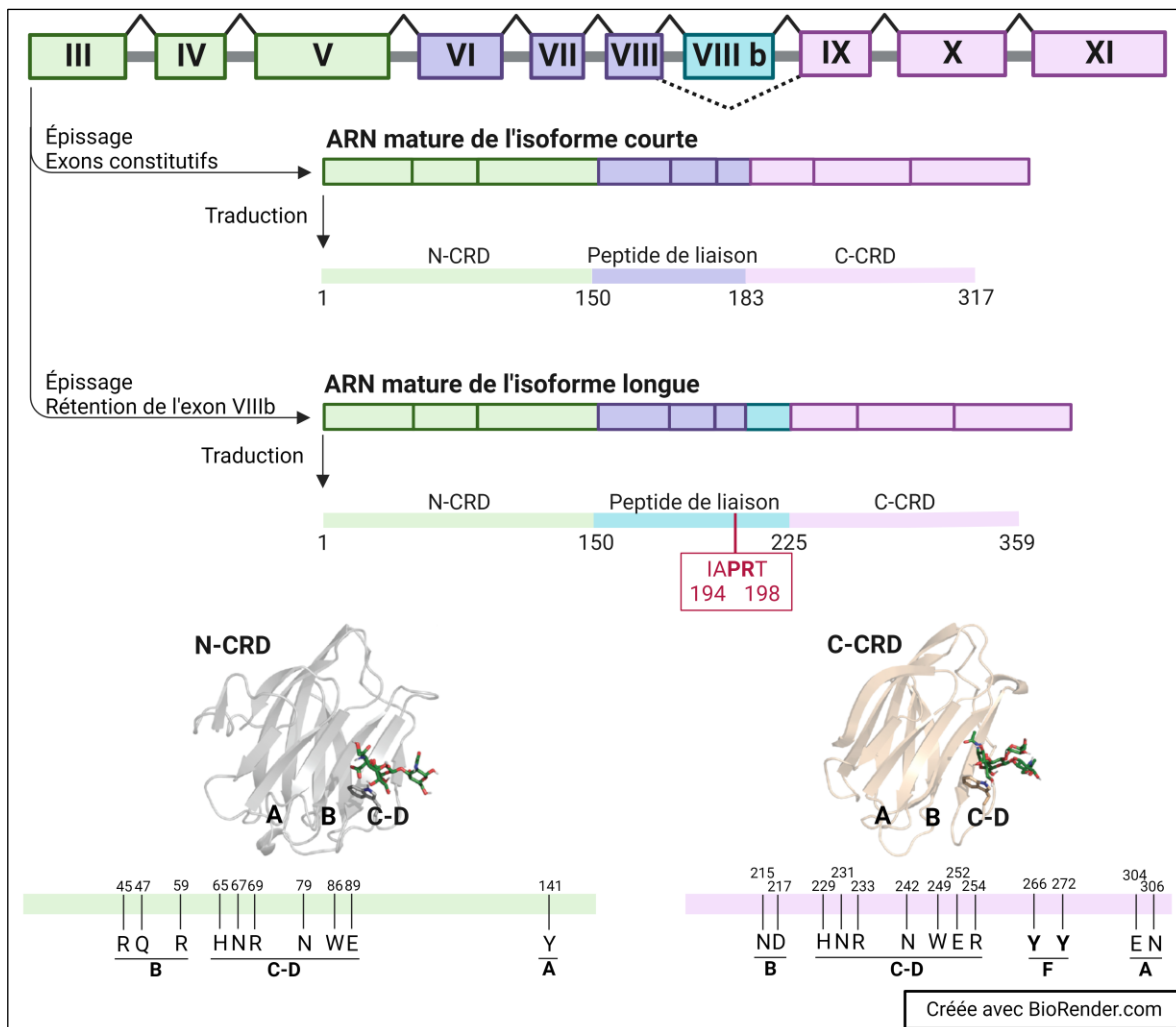


Figure 13: L'épissage alternatif de *LGALS8*

Le transcrite de l'isoforme courte comprend neuf exons constitutifs qui code pour la forme canonique de 317 aa. Pour sa part, le transcrite mature de l'isoforme longue est composé de 10 exons, grâce à la rétention de l'exon VIIIb, qui code pour la protéine de 359 aa. Les deux isoformes présentent le N- et le C-CRD. Chaque CRD contient les aa conservés permettant la liaison au β -galactoside (C-D) et des sites de liaisons secondaires dictant la spécificité de leurs interactions avec les glycanes (A-B). De plus, le C-CRD possède une séquence permettant l'interaction protéine-protéine entre la galectine-8 et NDP52 sur sa face F. La différence entre les deux isoformes se situe au niveau de la longueur de leur peptide de liaison. Le peptide de liaison de l'isoforme courte est composé de 33 aa alors que celui de l'isoforme longue est composé de 75 aa et d'une séquence de clivage à la thrombine (194-198).

Adaptée de Roy et al., 2023 (soumis) et Gómez-Redondo et al., 2021

La taille du peptide de liaison n'influence pas l'affinité des CRDs pour les différents glycanes présentés ci-haut. Cependant, il confère à la galectine-8 sa multivalence et sa flexibilité. La taille variable du peptide de liaison influence l'orientation spatiale des CRDs et module leur capacité à lier

certaines substrats. (Carlsson et al., 2007b; Kim et al., 2013; Patnaik et al., 2006) Les études menées jusqu'à présent sont contradictoires sur l'impact de l'augmentation de la taille du peptide de liaison. Certaines études *in vitro* n'ont observé aucune différence fonctionnelle entre les deux isoformes (Romaniuk et al., 2010), tandis qu'une autre étude a identifié des localisations distinctes pour chacune, avec une localisation strictement extracellulaire pour l'isoforme longue. (Cattaneo et al., 2014) Une autre étude a observé une augmentation de l'adhésion cellulaire en présence de la galectine-8 longue (Friedel et al., 2016), mais un autre groupe de recherche a observé une diminution de l'agglutination en présence de cette isoforme (Zhang et al., 2015). Des mutations générées au niveau du peptide de liaison ont aussi montré des effets contradictoires en fonction de sa taille. Les CRDs d'une galectine monovalente reliés par le peptide de liaison de la galectine-8 courte augmentait l'activité de la protéine (Vértesy et al., 2015), ce qui concorde avec une étude ayant remplacé le peptide de la galectine-8 par une séquence de six glycines provoquant la diminution des fonctions de la galectine-8 (Levy et al., 2006). En revanche, cela est contradictoire aux observations faites lors de la délétion du peptide de liaison, qui n'altère pas l'agglutination cellulaire, mais augmente l'adhésion cellulaire (Yoshida et al., 2012). Les effets de la taille du peptide de liaison pourraient être spécifiques à certaines fonctions de la galectine-8, à certains types cellulaires ou aux micro-environnements qui influencent la cellule, puisque des niveaux variables d'expression protéique des isoformes ont été observés selon le type cellulaire et le contexte physiologique. (Elola, 2014; Friedel et al., 2016; Lo et al., 2021)

La galectine-8 est exprimée abondamment dans diverses cellules présentes dans différents tissus, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques, ainsi que dans certains tissus embryonnaires. Sa présence est détectée dans de nombreux types de cancers, où son expression peut être augmentée ou diminuée, suggérant des fonctions distinctes selon le type cellulaire. (Ahmed et al., 2007; Bidon-Wagner et Le Pennec, 2002; Elola, 2014; Zick et al., 2004) En plus de son expression modulée en fonction du type cellulaire et de son environnement, la localisation de la galectine-8 est variable et est influencée par le micro-environnement de la cellule. La protéine peut être localisée au noyau, dans l'environnement périnucléaire, les mitochondries et le cytosol. (Fernández et al., 2016; Lo et al., 2021; Vladoiu et al., 2014) De plus, malgré l'absence d'un peptide signal pour sa sécrétion, la galectine-8 est présente dans le milieu extracellulaire. Sa localisation est dynamique: la protéine est synthétisée dans le cytoplasme et peut être sécrétée, puis endocytée de manière clathrine-indépendante, ce qui permet son retour dans le compartiment intracellulaire (Carlsson et al., 2007a). Certains stimuli, la composition en glycanes de ses partenaires d'interaction

et son niveau d'expression pourraient influencer sa localisation intra- ou extracellulaire. (Arbel-Goren et al., 2005; Cattaneo et al., 2014; Elola, 2014; Troncoso et al., 2014)

Les galectines, grâce à leur capacité à lier les glycanes et leur localisation variée, permettent de réguler plusieurs processus cellulaires essentiels au maintien de l'homéostasie. La galectine-8 ne fait pas exception : elle a été impliquée dans l'autophagie, l'adhésion cellulaire et l'immunité grâce à sa localisation intra- et extracellulaire.

1.6.2 Les fonctions extracellulaires

Malgré plusieurs hypothèses, les mécanismes de sécrétion des galectines restent inconnus et semblent varier pour les diverses galectines. La sécrétion semble être régulée par des stimuli intra- et extracellulaires. (Bänfer et Jacob, 2020; Popa et al., 2018) Néanmoins, les multiples rôles extracellulaires des galectines ont été extensivement étudiés. Leurs interactions avec les glycanes sont exclusivement nécessaires au niveau extracellulaire, où se trouvent ces substrats. Environ 30 % du transcriptome est sécrété et parmi ces protéines, 80 % subissent une glycosylation, une modification post-traductionnelle permettant l'ajout d'un carbohydrate à une protéine ou un lipide via la voie de sécrétion classique. (Kamili et al., 2016; Nabi et al., 2015) Ces glycoprotéines et glycolipides, nommés aglycones, composent la matrice extracellulaire, la surface extérieure de la membrane plasmique, la surface de pathogène et sont également solubles dans le milieu extracellulaire. Les galectines régulent donc plusieurs processus cellulaires en fonction de l'aglycone impliqué dans l'interaction entre une galectine et un glycane. (Gagneux et al., 2022; Taylor et al., 2022)

Les galectines peuvent être solubles dans le milieu extracellulaire et se retrouver dans le sérum en haute concentration. (Carlsson et al., 2012; "The human blood proteins - proteins detected in ms - The Human Protein Atlas," n.d.) Dans ce contexte, certaines galectines, dont la galectine-8, peuvent agir en tant que récepteurs reconnaissant des motifs de pathogènes et participer à l'immunité innée. (Stowell et al., 2010; Vasta, 2009) Les galectines peuvent aussi se lier à des protéines solubles dans le milieu extracellulaire. (Chou et al., 2018; von Hundelshausen et al., 2021) La liaison de la galectine-8 à différentes glycoprotéines en circulation varie, et pourrait servir de biomarqueur en combinaison avec l'aglycone avec lequel elle interagit dans certains cancers. (Carlsson et al., 2012) De plus, la liaison à des glycoprotéines solubles permet de moduler les effets de la galectine-8, en empêchant son interaction avec des protéines de surface. (Figure 14) (Eshkar Sebban et al., 2007)

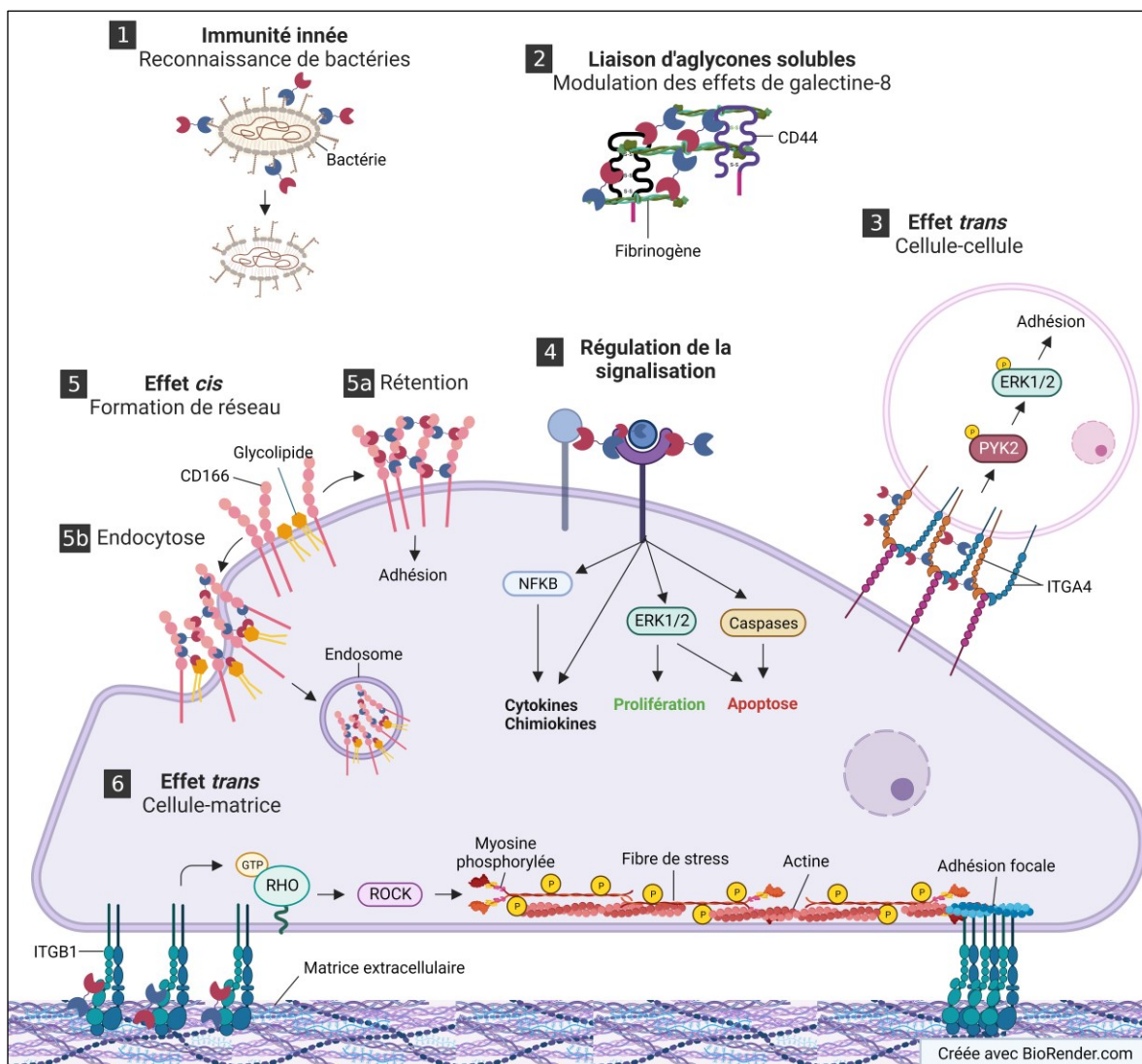


Figure 14: Les rôles extracellulaires de la galectine-8

La galectine-8 joue de nombreux rôles extracellulaires en liant des glycanes sur de nombreux partenaires d'interaction. La galectine-8 peut participer à l'immunité innée (1), lier des protéines solubles (2), permettre l'interaction cellule-cellule (3) ou cellule-matrice (4) et réguler de nombreuses voies de signalisation (4). La galectine-8 est aussi en mesure de former des réseaux reliant plusieurs partenaires d'interaction à la surface de la cellule (5), permettant la rétention de ceux-ci à la surface de la cellule (5a) ou leur endocytose (5b). L'ensemble de ces partenaires d'interaction extracellulaire permet son implication dans l'adhésion, la migration, la survie et la modulation de l'activité de plusieurs types cellulaires.

Les galectines peuvent aussi effectuer des liaisons *cis* et *trans* grâce à leur multivalence. (Elola et al., 2015) Dans le cas des liaisons *trans*, l'interaction entre deux cellules du micro-environnement permet des interactions cellulaires homo- ou hétérotypiques. (Figure13) (Elola et al., 2007; Rabinovich et Toscano, 2009) La galectine-8, en raison de sa bivalence, est impliquée dans plusieurs interactions cellule-cellule, permettant ainsi l'interaction des leucocytes, des plaquettes ou des

plasmocytes avec les cellules endothéliales. (Cattaneo et al., 2014; Friedel et al., 2016; Yamamoto et al., 2008) La galectine-8 est aussi impliquée dans la réponse inflammatoire en régulant l'interaction hétérotypique entre les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'antigènes lors de l'extraction d'antigènes. (Obino et al., 2018) Elle participe également aux interactions cellulaires homotypiques en régulant l'intégrité des jonctions adhérentes des cellules endothéliales. (Zamorano et al., 2019) Bien que les protéines impliquées dans ces interactions ne soient pas bien identifiées, ces exemples illustrent les effets *trans* variés de la galectine-8 lors de la communication cellule-cellule.

Les effets *trans* des galectines extracellulaires comprennent aussi l'interaction d'une cellule avec la matrice extracellulaire, régulant ainsi des événements liés à l'adhésion et la migration en interagissant avec les intégrines et différentes protéines matricielles. (Figure 14) (Dings et al., 2018; Elola et al., 2007) Lorsqu'elle est immobilisée, la galectine-8 induit l'adhésion cellulaire en interagissant entre autres avec des intégrines. (Cárcamo et al., 2006; Diskin et al., 2009; Hadari et al., 2000; Levy et al., 2001; Nishi et al., 2003) Cette interaction active des voies de signalisation de GTPases RHO et la phosphorylation de la kinase d'adhésion focale, qui activent à leur tour les voies de signalisation de AKT1 et de ERK1/2, permettant le réarrangement du cytosquelette. (Diskin et al., 2012; Levy et al., 2006, 2001) La galectine-8 en tant que protéine matricielle semble avoir des effets synergiques avec la fibronectine, ce qui pourrait être essentiel pour réguler les événements de l'adhésion et de la migration. (Diskin et al., 2012; Levy et al., 2001; Li et al., 2021)

Les liaisons *cis* effectuées par les galectines sont principalement observées lors de la formation d'un réseau interconnecté entre les galectines et les aglycones. Ces réseaux permettent la ségrégation de protéines de surface, créant des microdomaines de signalisation ou facilitant l'endocytose des aglycones interconnectés. (Figure 14) Selon les protéines impliquées et leur signalisation, les effets sont nombreux et régulent différentes voies de signalisation, soit par le maintien ou l'arrêt du signal. (Elola et al., 2015; Johannes et al., 2018) Un modèle d'endocytose clathrine-indépendante propre aux galectines a été proposé. Ce modèle consiste à réorganiser les glycolipides de surface par les galectines, induisant la courbure de la membrane plasmique et donc l'endocytose des protéines ciblées. (Shafaq-Zadah et al., 2020) Ce modèle d'endocytose s'applique à la galectine-8 présente à la surface des cellules présentatrices d'antigènes, ce qui favorise l'internalisation des antigènes. (Prato et al., 2020) De plus, vu l'importance des glycolipides lors de l'endocytose de CD166, la galectine-8 semble également impliquée dans ce modèle d'endocytose lors de l'internalisation de la protéine d'adhésion. (Renard et al., 2020) La liaison de haute affinité

du N-CRD de la galectine-8 avec certains glycolipides perturbe la membrane, donnant la capacité à la galectine-8 de participer à ce type d'endocytose. (Lete et al., 2022) L'interaction de la galectine-8 avec CD166 a des effets différents selon le type cellulaire et le contexte physiologique, puisqu'il a aussi été montré que la galectine-8 favorise la rétention de la protéine à la surface cellulaire. (Fernández et al., 2016) La galectine-8 crée aussi des réseaux qui favorisent la rétention de plusieurs protéines à la surface cellulaire et la création de complexes protéiques, comme en témoigne l'interaction entre la podoplanine, l'intégrine $\beta 1$ et la galectine-8. (W.-S. Chen et al., 2016; Cueni et Detmar, 2009)

Les galectines modulent aussi différentes voies de signalisation en se liant à des récepteurs de surface. (Figure 14) Elles peuvent induire un changement de conformation de la protéine cible, favoriser la dimérisation de récepteurs, faciliter l'interaction de co-récepteurs ou celle entre un ligand et son récepteur, comme dans le cas des récepteurs tyrosine kinase. (Nabi et al., 2015; Porębska et al., 2021) La fonction précise de la galectine-8 dans l'activation de plusieurs voies de signalisation n'a pas encore été déterminée, mais elle produit divers effets. Par exemple, la galectine-8 peut induire l'apoptose en activant les caspases 3, 8 et 9 dans les thymocytes $CD4^+CD8^+$. (Tribulatti et al., 2007) Elle induit aussi l'apoptose dans les lymphocytes T activés en augmentant l'expression de FASLG. (Norambuena et al., 2009) Toutefois, la galectine-8 peut favoriser la prolifération des lymphocytes T en se liant à PTPRC, ce qui active ERK1/2. (Tribulatti et al., 2009) Ainsi, une modulation de l'expression de la galectine-8 dans l'ostéoclaste pagétique pourrait altérer l'adhésion ou certaines voies de signalisation influençant sa survie en raison de sa présence dans le milieu extracellulaire.

1.6.2.1 La régulation des fonctions extracellulaires

Même si leurs fonctions semblent peu spécifiques, l'activité des galectines est régulée de plusieurs façons. Premièrement, il est nécessaire de maintenir l'intégrité de leur conformation pour leur fonction. Le clivage des galectines divalentes par différentes protéases affecte leur multivalence et leur capacité à effectuer certaines fonctions. (Arthur et al., 2015; Nishi et al., 2006, 2005) En revanche, certains rôles de la galectine-8 peuvent être maintenus malgré le clivage du peptide de liaison, tels que la co-stimulation des lymphocytes T lors de la réponse à l'antigène ou l'adhésion des neutrophiles. (Cagnoni et al., 2020; Cattaneo et al., 2011; Nishi et al., 2003) De plus, la flexibilité de rotation et l'espace entre les CRDs des galectines influencent leur liaison aux carbohydrates présentés sur un aglycone. (Elola et al., 2015) Le peptide de liaison confère plus de flexibilité à la

galectine-8, lui permettant de lier des substrats plus éloignés, mais il peut aussi encombrer un espace restreint de liaison. (Friedel et al., 2016; Zhang et al., 2015) De plus, la concentration des galectines dans le micro-environnement influence leurs fonctions. De faibles concentrations favorisent leur action individuelle et leur interaction spécifique avec leurs substrats de haute affinité. Des concentrations élevées, elles, favorisent leur dimérisation et leur interaction avec des substrats de moindre affinité. (Cummings et al., 2022; Toscano et al., 2018) Des rôles divergents ont été attribués à la galectine-8 en fonction de la concentration utilisée de la protéine recombinante. Par exemple, la galectine-8 en faible concentration favorise l'adhésion et la croissance cellulaire alors qu'en haute concentration, la galectine-8 a des effets cytostatiques pour certains types cellulaires. (Arbel-Goren et al., 2005) L'effet dose dépendante a aussi été observé pour les lymphocytes T, où une faible dose favorise la co-stimulation du récepteur des lymphocytes T en présence d'antigènes alors que des doses élevées favorisent leur prolifération. (Tribulatti et al., 2009)

Bien entendu, la structure du glycane ciblé lors de l'interaction entre l'aglycone et une galectine influence aussi leur capacité à lier leurs partenaires d'interaction. Les galectines peuvent lier des disaccharides composés d'un galactose, tels que le lactose, mais avec une faible affinité. Leur affinité est plus élevée pour la LacNac, et cette affinité augmente lorsque le saccharide est répété. Après l'ajout du glycane sur l'aglycone, le glycane subit plusieurs modifications impliquant de nombreux enzymes, ce qui augmente la diversité des produits finaux de la glycosylation. (Colley et al., 2022; Esmail & Manolson, 2021; Stanley, et al., 2022) Premièrement, les liaisons glycosidiques associées à ces modifications peuvent être en configuration α ou β . La position de cette liaison et l'ajout linéaire ou par branchement augmentent encore la diversité des glycanes finaux. Finalement, l'ajout de groupements à l'extrémité tels qu'un sulfate, un fucose ou un acide sialique, vient aussi changer l'affinité des galectines pour un glycane. (Elola et al., 2015; Esmail et Manolson, 2021; Li et al., 2022) La glycosylation peut produire deux répliques de la même protéine, décorées de glycanes différents. (Nio-Kobayashi, 2017) De plus, l'aglycone peut contenir plusieurs sites de glycosylation, ce qui permet la production de plusieurs glycoformes de la même protéine. (Stanley et al., 2022; Varki et Kornfeld, 2022) Ces événements de la glycosylation sont dynamiques et influencés par plusieurs facteurs tels que le niveau d'expression des enzymes qui varie selon l'espèce, le type cellulaire et le contexte physiologique. Les monocytes expriment plusieurs enzymes de glycosylation. L'expression de ces enzymes augmente dans les cellules différenciées de la lignée monocyte-macrophage, suggérant un rôle important de la glycosylation dans les cellules différenciées de cette lignée

cellulaire. (Trottein et al., 2009) De plus, les galectines influencent l'expression des glycanes. Par exemple, la galectine-8 favorise l'expression de glycanes spécifiques à la surface des monocytes qui favorise leur recrutement aux sites inflammatoires. De plus, les protéines sécrétées peuvent arborer des glycanes différents en fonction de la galectine qui a stimulé la cellule cible. Lors de la sécrétion de chimiokines par les fibroblastes, les chimiokines recrutent les monocytes lors de la stimulation par la galectine-8 et recrutent les lymphocytes T lors de leur stimulation par la galectine-1. (AbuSamra et al., 2022, 2021)

En résumé, les fonctions extracellulaires des galectines sont influencées par les glycanes exprimés par un type cellulaire. La liaison d'un glycanes par une galectine module l'activité de l'aglycone, ce qui a des effets variés sur la cellule ciblée. Ces différents paramètres ont un impact seulement sur le rôle extracellulaire des galectines.

1.6.3 Les fonctions intracellulaires

Les glycanes complexes, décrits ci-haut, sont généralement absents du cytosol. Par conséquent, les rôles intracellulaires des galectines reposent principalement sur des interactions protéine-protéine. Les fonctions intracellulaires des galectines sont moins bien connues que leurs rôles extracellulaires, mais tout autant diversifiées. Dans ce contexte-ci, la galectine-8 ne fait pas exception.

Plusieurs galectines sont localisées au noyau et forment des interactions glycanes-indépendantes impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif, en participant à l'assemblage du spliceosome par exemple. Bien que la galectine-8 ait été localisée au noyau (Delgado et al., 2011; Fernández et al., 2016), aucun rôle n'a été défini pour sa localisation à ce compartiment intracellulaire. (Liu et al., 2002; Vladoiu et al., 2014) Plusieurs évidences suggèrent aussi l'implication des galectines intracellulaires dans la prolifération et la régulation du cycle cellulaire par des mécanismes peu définis. La galectine-8 a été impliquée dans la régulation du cycle cellulaire des kératinocytes via son interaction avec α -tubuline, qui ne possède pas de motifs de glycosylation. (Figure 15) Cette interaction régule l'intégrité du centrosome pendant la mitose et favorise la prolifération. (Lo et al., 2021) La galectine-8 intracellulaire régule aussi la prolifération et la migration des cellules épithéliales grâce son interaction avec la chaîne farnésyl de la GTPase KRAS4B. La pochette hydrophobe du domaine N-CRD permet à la galectine-8 d'agir comme un GDI pour KRAS4B, et ainsi moduler l'activation de ERK1/2. (Figure 15) (Meinohl et al., 2019) La galectine-8 pourrait réguler les fonctions de protéines prénylées dans divers processus biologiques, car elle interagit avec de

nombreuses GTPases (RAC1, CDC42, RAB7 et RAB14). (Bell et al., 2021; Jia et al., 2018; Meinohl et al., 2019)

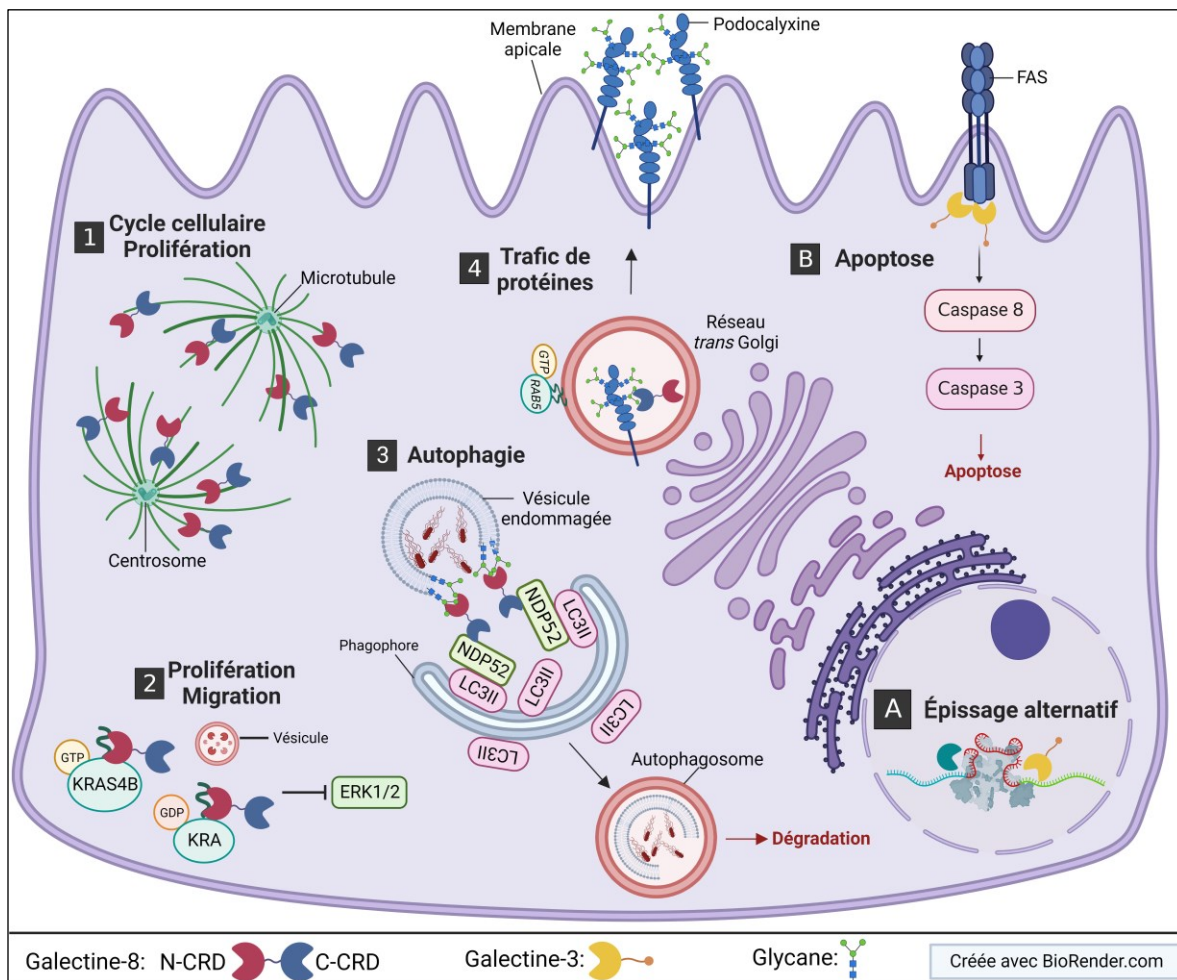


Figure 15: Les rôles intracellulaires des galectines

Les galectines ont aussi de nombreux rôles intracellulaires et peuvent réguler l'épissage alternatif (A) ou l'apoptose (B) par des interactions protéine-protéine. Spécifiquement, la galectine-8 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire grâce à la régulation des centrosomes (1), la prolifération en agissant comme GDI pour KRAS4B (2), dans la dégradation des lysosomes endommagés via l'autophagie (3) et le transport apical de protéines (4).

De plus, les galectines intracellulaires sont impliquées dans plusieurs étapes de l'autophagie, notamment la régulation de l'activité de MTOR, l'initiation de l'autophagie et le maintien de l'acidité des lysosomes. (Kumar Das et al., 2023; Zheng et al., 2023) Le rôle le mieux défini de la galectine-8 intracellulaire est son implication dans l'autophagie sélective, permettant la dégradation des vésicules endommagées. Comme d'autres galectines (-1, -3 et -9), la galectine-8 est recrutée aux vésicules endommagées qui exposent des glycanes complexes dans le cytosol. (Thurston et al., 2012) Malgré le recrutement de plusieurs galectines, chacune a un rôle spécifique menant à la

dégradation des vésicules endommagées. (Bell et al., 2021; Jia et al., 2018; Weng et al., 2018) La signalisation de MTORC1 est inactivée par la galectine-8 lors de dommages aux vésicules. La galectine-8, localisée à la surface des lysosomes intacts, interagit avec MTOR et RPTOR. Lors de la rupture de la membrane, la galectine-8 modifie ses partenaires d'interaction et forme un complexe protéique avec les GTPases RAGA/B et LAMTOR1, en plus de se lier aux glycanes exposés de la protéine membranaire lysosomale SLC38A9. L'interaction préférentielle de la galectine-8 pour ces protéines favorise le départ de MTOR de la surface du lysosome, désactive la voie de signalisation et initie l'autophagie. (Jia et al., 2018) Les rôles de la galectine-8 dans l'autophagie sélective sont multiples, puisqu'un deuxième mécanisme implique la galectine-8 dans la clairance des vésicules endommagées. Lorsque des vésicules sont endommagées par une bactérie, la galectine-8 est rapidement recrutée par une interaction entre le N-CRD et les glycanes exposés. Le C-CRD de la galectine-8 recrute ensuite NDP52, un récepteur de l'autophagie sélective. (Thurston et al., 2012) Le recrutement de NDP52 permet l'initiation de l'autophagie et la formation de la membrane d'isolation. (Boyle et al., 2019; Ravenhill et al., 2019) De plus, NDP52 interagit avec LC3-II afin de localiser les vésicules endommagées à l'intérieur de l'autophagosome. (Figure 15) (Boyle et Randow, 2013; Svenning et Johansen, 2013) Ainsi, la galectine-8 permet l'initiation d'événements de l'autophagie menant à la dégradation de vésicules endommagées. (Li et al., 2019; Weng et al., 2018)

Au niveau intracellulaire, les galectines interagissent avec plusieurs partenaires qui régulent l'apoptose en maintenant l'intégrité de la mitochondrie et en interagissant avec des protéines pro-ou anti-apoptotiques ou avec des domaines intracellulaires de récepteurs de mort cellulaire. (Kumar Das et al., 2023; Vladoiu et al., 2014) Un rôle de la galectine-8 intracellulaire n'a toutefois pas été identifié dans ce processus jusqu'à maintenant.

Finalement, les galectines se trouvent également à l'intérieur des vésicules intracellulaires, soit par endocytose ou possiblement par passage direct à travers la membrane des vésicules. (Bänfer and Jacob, 2020) L'endocytose de la galectine-8 lui permet de se localiser à l'intérieur des vésicules intracellulaires, et la localisation intracellulaire de ces vésicules varie en fonction des glycanes disponibles à la surface de la cellule lors de l'endocytose de la galectine-8. (Carlsson et al., 2012) Grâce à leur localisation intravésiculaire, certaines galectines régulent le transport de protéines vers le domaine apical de cellules polarisées en interagissant avec les aglycones à l'intérieur des vésicules. (Bänfer et Jacob, 2020; Delacour et al., 2009; Shafaq-Zadah et al., 2020) Dans le cas de la galectine-8, son interaction avec la podocalyxine permet de réguler les premiers événements du trafic de la protéine du réseau *trans* Golgi vers la membrane apicale, ainsi que la polarisation des

cellules épithéliales du rein. Cette fonction de la galectine-8 dépend de l'interaction glycane-dépendante du C-CRD possiblement avec les O-glycanes de la podocalyxine qui sont nécessaires à la régulation du trafic apical de la protéine. Les glycanes complexes se retrouvent dans le lumen des vésicules intacts dans le cytosol, les évidences suggèrent que la galectine-8 pourrait médier le transport apical de la podocalyxine de façon intravésiculaire comme d'autres galectines vu son interaction glycane-dépendante avec la podocalyxine qui est localisée aux vésicules RAB5⁺. (Figure 15) (Lim et al., 2017) Bien que dans ce contexte spécifique, le mécanisme par lequel la galectine-8 se retrouve à l'intérieur des vésicules n'a pas été étudié, quelques évidences suggèrent que les galectines sont incorporées au trafic vésiculaire grâce à leur endocytose. (Delacour et al., 2009; Shafaq-Zadah et al., 2020)

Ainsi, des altérations de l'expression des isoformes de la galectine-8 pourraient avoir de nombreux effets sur l'ostéoclaste en perturbant les processus régulés par cette galectine au niveau intracellulaire. De plus, la localisation intra- ou extracellulaire des galectines joue un rôle dans la régulation de leurs fonctions, qui sont étroitement liées à la régulation de l'homéostasie cellulaire. Par exemple, une galectine peut avoir un effet anti-apoptotique lorsqu'elle est localisée à l'intérieur de la cellule, mais pro-apoptotique lorsqu'elle est au niveau extracellulaire. (Johannes et al., 2018; Kumar Das et al., 2023)

1.6.4 Rôle des galectines dans la régulation de l'ostéoclaste

Les galectines ont principalement été étudiées dans la régulation de la réponse immunitaire et divers cancers, mais certaines ont des rôles connus dans la régulation de cellules impliquées dans le remodelage osseux. Les galectines sont sécrétées et présentes en concentrations importantes dans le milieu extracellulaire, ce qui suggère qu'elles pourraient être des facteurs de couplage dans la régulation du remodelage osseux. Les galectine-1, -3, -8 et -9 sont exprimées et sécrétées par les cellules mésenchymateuses, les ostéoclastes et leurs précurseurs, et peuvent donc influencer les ostéoclastes de manière autocrine ou paracrine. (Chen et al., 2022; Tazhitdinova et Timoshenko, 2020) Les différentes galectines présentes dans le micro-environnement osseux pourraient aussi avoir des rôles redondants vu leur affinité similaire pour certains types de glycanes. (Hirabayashi et al., 2002)

Le rôle de la galectine-1 a été peu étudié et ses fonctions dans l'ostéoclaste sont peu connues. Une analyse de l'expression génique ciblée sur les lectines a montré une diminution de l'expression de la galectine-1 durant l'ostéoclastogénèse. Malgré une expression moindre chez les ostéoclastes

matures, la galectine-1 est localisée à la zone de scellement dans les ostéoclastes actifs, suggérant un rôle dans la régulation de la résorption osseuse. Une étude *in vitro* sur la différenciation de cellules hématopoïétiques issues de souris déficientes en galectine-1 a montré que cette protéine n'est pas essentielle à la différenciation des ostéoclastes. Cependant, ces ostéoclastes déficients en galectine-1 ont une capacité de résorption osseuse accrue par rapport aux ostéoclastes provenant des souris de type sauvage. Donc, la diminution de la masse osseuse chez les souris déficientes en galectine-1 a été attribuée à l'hyperactivité des ostéoclastes. La galectine-1 semble être un régulateur négatif de la résorption osseuse dont le mécanisme reste encore inconnu. (Figure 16) (Muller et al., 2019)

La galectine-3 a été davantage étudiée pour déterminer son rôle dans le remodelage osseux. Elle influence les précurseurs ostéoclastiques via les cellules stromales. Les souris déficientes en galectine-3 présentent un nombre réduit de précurseurs ostéoclastiques dans la moelle osseuse dû à une diminution de la sécrétion du facteur de stimulation des colonies 2 (CSF2 (GM-CSF)) par les cellules stromales, suggérant que la galectine-3 est impliquée dans l'engagement des cellules souches hématopoïétiques vers la lignée myéloïde. (Brand et al., 2011) La galectine-3 peut aussi favoriser indirectement l'ostéoclastogénèse en augmentant l'expression de RANKL chez les ostéoblastes. Elle interagit avec le récepteur de la vitamine D (VDR) pour stimuler la sécrétion de la cytokine et réduire l'expression de l'OPG, ce qui augmente le ratio RANKL/OPG et favorise l'ostéoclastogénèse. (Figure 16) (Gu et al., 2021a)

En plus de son rôle indirect via l'ostéoblaste, la galectine-3 a un rôle direct sur l'ostéoclaste. Elle est exprimée chez les ostéoclastes et leurs précurseurs, tant dans le cytoplasme, à la membrane plasmique, aux noyaux que dans le milieu extracellulaire. (Nakajima et al., 2016; Niida et al., 1994) Le M-CSF induit l'expression de la galectine-3, abondamment exprimée chez les ostéoclastes. (Niida et al., 1994) Cependant, la protéine régule négativement leur différenciation et leur activité de résorption par différents mécanismes. La galectine-3 recombinante inhibe l'ostéoclastogénèse sans altérer la survie des précurseurs ostéoclastiques. Son action est carbohydrate-indépendante et réduit l'expression de NFATC1, sans affecter les voies de signalisation en amont du facteur de transcription suggérant un rôle intracellulaire. (Li et al., 2009) Au niveau extracellulaire, l'inactivation de la galectine-3 par les MMPs favorise l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse. (Pivetta et al., 2011; Zhu et al., 2023) Le clivage protéolytique de la galectine-3 inhibe la formation de réseaux à la surface cellulaire, ce qui active des GTPases régulant le réarrangement du cytosquelette et la formation de la zone de scellement. (Zhu et al., 2023) Les souris déficientes en

galectine-3 présentent une réduction de la masse osseuse. L'étude *in vitro* d'ostéoclastes provenant de ces souris transgéniques a observé une augmentation du nombre d'ostéoclastes, ainsi qu'une altération de leur taille et de leur capacité de résorption. (Iacobini et al., 2018; Simon et al., 2017) L'inhibition de la galectine-3 mène entre autres à l'augmentation de l'expression de TRAF6. (Simon et al., 2017) De plus, la galectine-3 interagit avec VDR et inhibe l'ostéoclastogénèse. (Gu et al., 2021b) Toutefois, la galectine-3 favorise la fusion des précurseurs ostéoclastiques par le biais de l'interaction glycanne-dépendante entre la galectine-3 et la myosine 2A. (Nakajima et al., 2016) Une galectine peut donc avoir de multiples fonctions dans la régulation de l'ostéoclaste. (Figure 16)

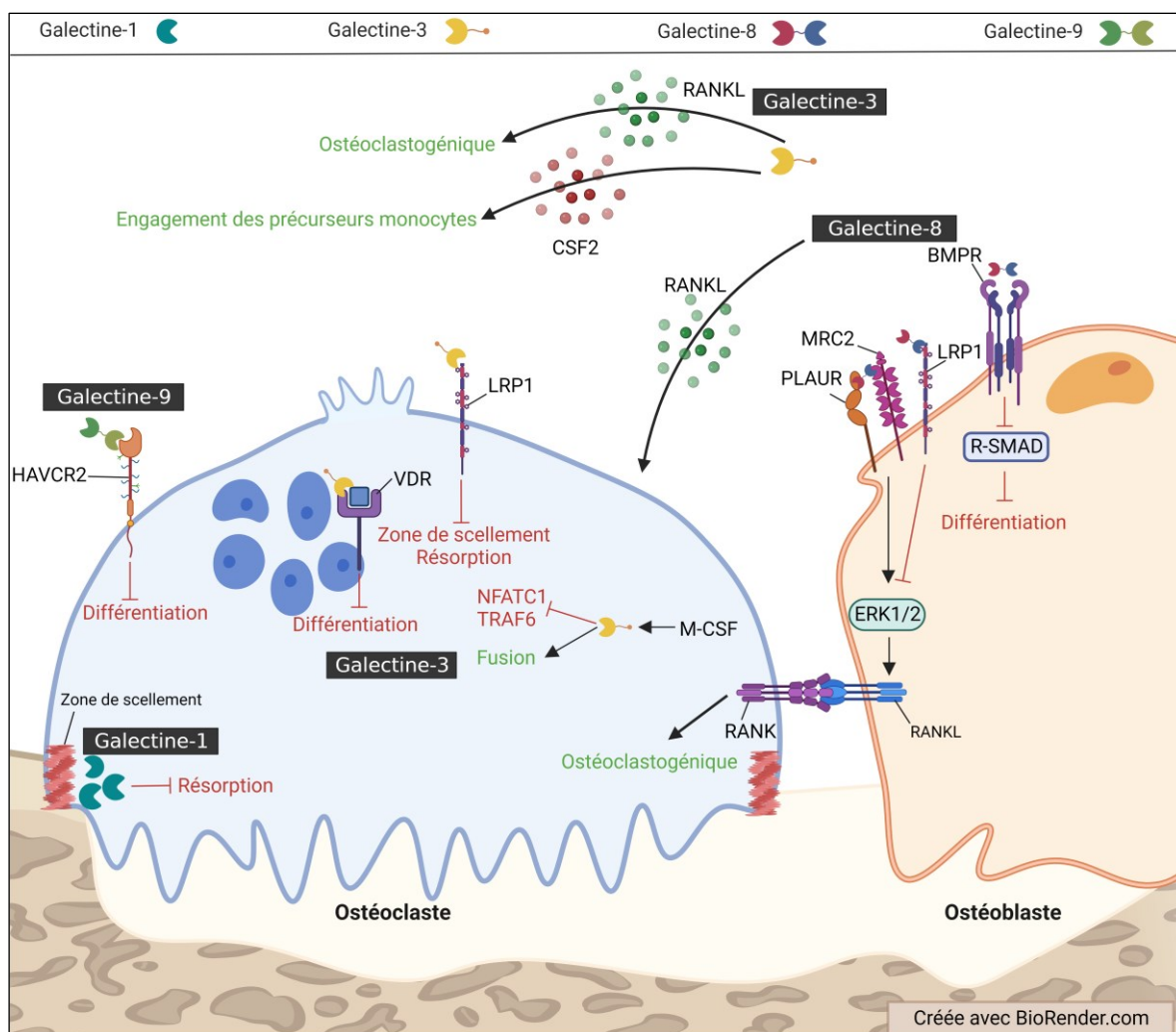


Figure 16: Fonctions des galectines dans la régulation de l'ostéoclaste

Jusqu'à maintenant, les galectines identifiées dans l'ostéoclaste régule négativement l'ostéoclastogénèse (galectine-3, -9) et la résorption osseuse (galectine-1, -3). Cependant, par son action sur l'ostéoblaste, la galectine-3 favorise la sécrétion de CSF2 et RANKL, ce qui favorise l'engagement des précurseurs vers la lignée monocyttaire et l'ostéoclastogénèse. La galectine-8 favorise aussi indirectement l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse en augmentant le ratio RANKL/OPG et en régulant négativement l'ostéoblaste.

Quelques études se sont aussi intéressées à la galectine-9 dans les cellules impliquées dans le remodelage osseux. La galectine-9 est exprimée dans les cellules de la moelle osseuse, les leucocytes circulants et les ostéoclastes. (Matsumoto et al., 1998) Une augmentation de son expression a été observée durant l'ostéoclastogénèse, ainsi qu'une expression élevée dans les ostéoclastes matures. (An et al., 2016; Muller et al., 2019) Cependant, la galectine-9 recombinante inhibe l'ostéoclastogénèse par une interaction glycane-dépendante. En effet, l'ostéoclaste exprime HAVCR2 aussi connu sous le symbole TIM-3, qui est un partenaire connu de la galectine-9. La galectine-9 pourrait donc inhiber la différenciation des ostéoclastes via HAVCR2, sans activer l'apoptose comme cela a été observé dans d'autres types cellulaires. (Figure 16) (Moriyama et al., 2014)

Bien qu'il y ait peu d'information, les galectines sont importantes pour la régulation de l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse. La galectine-8 pourrait donc aussi jouer un rôle sur la différenciation et la fonction de la cellule. Les galectines pourraient aussi agir comme facteurs de couplage additionnels, permettant la régulation des événements du remodelage osseux par des actions autocrines et paracrines sur les cellules du micro-environnement. Il est donc important de définir le rôle de chaque galectine dans la régulation des cellules de la BMU.

1.6.4.1 Régulation du remodelage osseux par la galectine-8

Bien que la galectine-8 n'ait jamais été étudiée chez les ostéoclastes, des études suggèrent un rôle indirect de la galectine-8 extracellulaire dans son effet stimulant l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse. En effet, *in vitro*, la galectine-8 recombinante stimule la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes tout en réduisant l'expression de l'OPG. Cet effet a été observé tant chez les ostéoblastes immatures que les matures et les ostéocytes. En présence de la galectine-8 recombinante, le ratio RANKL/OPG est dix fois plus élevé, favorisant ainsi l'ostéoclastogénèse lors de la co-culture d'ostéoblastes avec des cellules souches hématopoïétiques. Des études *in vivo* ont également observé une augmentation de la quantité de RANKL, de certains marqueurs ostéoclastiques et du nombre d'ostéoclastes chez des souris transgéniques dont les ostéoblastes surexpriment la galectine-8 par rapport aux souris de type sauvage. De plus, ces souris transgéniques présentaient une baisse de la densité osseuse, et ce malgré l'augmentation de la formation osseuse. Ainsi, les effets ostéogéniques du micro-environnement sont moins importants que l'effet ostéoclastogénique induit par la présence élevée de RANKL. La galectine-8 favorise donc indirectement l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse. (Figure 16) Toutefois, un éventuel rôle

direct de la galectine-8 n'a pas encore été examiné. (Vinik et al., 2015) Les travaux effectués chez la souris pourraient s'appliquer à l'humain, puisqu'une corrélation a été décelée entre les niveaux d'ARN de la galectine-8 et certains marqueurs ostéoclastiques (RANKL, CTSK et TRAP) dans les fémurs obtenus de patients ayant subi une chirurgie de remplacement de la hanche. (Vinik et al., 2018)

L'étude *in vivo* a également montré une augmentation de la formation osseuse chez la souris surexprimant la galectine-8, ce qui a conduit l'équipe de recherche à explorer l'effet de la galectine-8 sur la différenciation et l'activité des ostéoblastes. L'analyse de l'expression de gènes ostéogéniques a cependant montré une diminution de l'expression de gènes clefs dans la différenciation des ostéoblastes, dont *Runx2* ainsi que de plusieurs gènes de la voie de signalisation des BMPs chez les ostéoblastes provenant de souris surexprimant la galectine-8. La régulation négative de la voie des BMPs par la galectine-8, observée *in vitro*, est plus prononcée chez les ostéoblastes matures et les ostéocytes. Ainsi, l'augmentation de la formation osseuse observée *in vivo* chez les souris transgéniques surexprimant la galectine-8 était causée par l'augmentation de l'activité des ostéoclastes, qui eux-mêmes favorisent l'augmentation de facteurs de couplages ostéogéniques dans le micro-environnement, dont l'effet est plus important que le rôle inhibiteur de la galectine-8 sur l'ostéoblaste. (Figure 16) (Vinik et al., 2018)

Ces études soulignent donc l'importance d'identifier le rôle d'une galectine sur un type cellulaire isolé avant d'évaluer ses fonctions *in vivo*, car l'effet pléiotropique d'une galectine peut rendre difficile l'interprétation de ses fonctions lorsqu'il y a plusieurs types cellulaires impliqués. De plus, ces travaux montrent les multiples effets de la galectine-8 sur une même cellule ainsi que son rôle dans la régulation du remodelage osseux, avec un effet indirect favorisant l'ostéoclastogénèse. Cependant, certaines questions restent en suspens. Il est possible que les effets observés *in vivo* sur la différenciation et la fonction de l'ostéoclaste ne soient pas seulement dus à l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de RANKL par les ostéoblastes. L'étude de l'influence de la galectine-8 sur les ostéoclastes isolés est nécessaire pour comprendre l'ampleur de son rôle dans la régulation des cellules de la BMU. Enfin, il est possible que l'altération de l'expression de *LGLAS8* et de ses isoformes puisse affecter l'ostéoclaste de différentes manières, à la fois par un rôle au niveau intracellulaire et par des actions autocrines et/ou paracrines au niveau extracellulaire.

1.7 Hypothèses et objectifs

Vu les fonctions connues des deux protéines sélectionnées qui peuvent influencer la différenciation, la survie et l'activité de résorption de l'ostéoclaste humain, nous avons émis l'hypothèse que l'altération de leur épissage alternatif dans l'ostéoclaste pagétique pourrait expliquer certains aspects du phénotype de la cellule.

1.7.1 *TBC1D25*

Premièrement, comme *TBC1D25* participe à la régulation des rabs pouvant être impliquées dans différentes voies du trafic vésiculaire essentielles à la régulation de l'ostéoclaste, l'altération de l'expression de ses isoformes mènerait à un dérèglement du trafic vésiculaire. Cette altération affecterait particulièrement l'autophagie vu le rôle connu de *TBC1D25* dans la régulation des étapes terminales du processus et favoriserait l'accumulation d'autophagosomes dans l'ostéoclaste pagétique. De plus, l'altération de l'autophagie pourrait affecter la survie ainsi que la résorption osseuse. Nous avons fait l'hypothèse que l'altération de l'épissage alternatif de *TBC1D25* affecterait directement la formation de la membrane plissée et le transport des lysosomes sécrétoires y étant associé. Finalement, étant donné la structure des deux isoformes, il est possible que seul l'isoforme longue, possédant les domaines TBC et LIR, ait un impact fonctionnel sur la cellule. L'augmentation de l'expression de l'isoforme courte observée dans l'ostéoclaste pagétique permettrait la régulation négative de la forme active de la protéine et favoriserait le maintien des activités des rabs substrats de l'isoforme longue augmentant l'activité de résorption des ostéoclastes pagétiques. Nous avons donc posé les objectifs de recherche suivants :

- 1- Caractériser l'expression de *TBC1D25* dans l'ostéoclaste humain sain
- 2- Déterminer les fonctions de *TBC1D25* dans la survie et la résorption osseuse de l'ostéoclaste humain sain
- 3- Évaluer le rôle de *TBC1D25* dans l'autophagie dans l'ostéoclaste humain sain

1.7.2 *LGALS8*

Deuxièmement, nous avons émis l'hypothèse que la galectine-8 pourrait jouer un rôle clef dans la biologie de l'ostéoclaste autant par un rôle grâce à sa localisation intracellulaire qu'une fonction liée à sa localisation extracellulaire. Au niveau intracellulaire, notre hypothèse est que la galectine-8 module l'initiation de l'autophagie affectant la survie et la résorption osseuse de l'ostéoclaste humain. Nous avons aussi fait l'hypothèse que la galectine-8 affecterait directement le transport

vésiculaire apical des vésicules sécrétrices et la formation de la membrane plissée. Au niveau extracellulaire, notre hypothèse est que la galectine-8 pourrait jouer un rôle dans la différenciation et la survie de l'ostéoclaste par la régulation des activités de diverses protéines de surface qui affecterait l'adhésion, la migration et la survie de l'ostéoclaste. Par son implication dans la régulation de signalisation de protéines d'adhésion, nous émettons l'hypothèse que la galectine-8 serait impliquée dans l'alternance entre l'ostéoclaste actif et l'ostéoclaste motile. Finalement, l'isoforme longue étant plus susceptible à la protéolyse, notre hypothèse est que l'augmentation de l'expression de l'isoforme courte permet l'augmentation de l'activité de la galectine-8 dans l'ostéoclaste pagétique favorisant sa survie et l'augmentation de la résorption osseuse. Nous avons donc posé les objectifs de recherche suivants :

- 1- Caractériser l'expression de la galectine-8 et de ses isoformes dans l'ostéoclaste humain sain
- 2- Déterminer les fonctions de la galectine-8 et de ses isoformes dans la survie et la résorption osseuse de l'ostéoclaste humain sain
- 3- Définir les partenaires d'interaction communs et spécifiques des isoformes

CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

RabGAP TBC1D25 is involved in human osteoclast activity

Michèle Roy, Elizabeth Stephens, Sophie Bouhour, Sophie Roux

Division of Rheumatology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, PQ, Canada

Statut de l'article

Publié dans European Journal of Cell Biology. Volume 100, Issue 3, April 2021, 151145

Avant-propos

J'ai réalisé ces travaux de recherche sous la direction de Dre Sophie Roux. Dans le cadre de cette étude, j'ai participé à la réalisation de toutes les expériences présentées, en collaboration avec Elizabeth Stephens et Sophie Bouhour, qui étaient sous ma supervision immédiate lors de leur contribution à ce projet. En collaboration avec ma directrice de recherche, j'ai fait l'acquisition et l'interprétation des données ainsi que la création des figures, la rédaction et la révision du manuscrit. À noter qu'il y a eu des modifications au manuscrit qui n'engagent que l'auteure de la thèse.

Points saillants

- TBC1D25, une protéine activant les GTPases rabs, est exprimée dans l'ostéoclaste humain.
- La diminution de l'expression de TBC1D25 cause la diminution de la résorption osseuse et diminution de la multinucléation.
- TBC1D25 est localisée près de la zone de scellement et de la membrane plissée.
- TBC1D25 pourrait être impliquée dans la résorption osseuse via la régulation de la polarisation de l'ostéoclaste.

Highlights

- TBC1D25 is a GTPase-hydrolysis activating protein expressed in human osteoclasts.
- Suppressing TBC1D25 decreased osteoclast bone resorption and multinucleation.
- TBC1D25 was expressed close to the sealing zone and the ruffled membrane.
- TBC1D25 may have a role in bone resorption via the regulation of osteoclast polarization.

Résumé

La polarisation et la formation de la membrane plissée durant la résorption osseuse sont des événements majeurs du trafic vésiculaire dans l'ostéoclaste actif. Il a été montré que les GTPases rabs sont impliquées dans ces processus, mais très peu est connu sur leurs régulateurs, incluant les protéines activatrices des GTPases rabs (rabGAPs). Dans les ostéoclastes humains, nous avons précédemment identifié deux isoformes de *TBC1D25*, qui code une rabGAP n'ayant jamais été étudiée dans ces cellules auparavant. En utilisant des cultures *in vitro*, nous avons évalué l'expression de *TBC1D25* dans les ostéoclastes humains. *TBC1D25* est exprimée au niveau de la zone de scellement avec une distribution annulaire et colocalise avec F-actine. *TBC1D25* est aussi exprimée en moindre intensité au niveau de la membrane plissée et colocalise avec LAMP2 et la cathepsine K, mais ne colocalise pas avec RAB7 et V-ATPASE. La diminution de l'expression de *TBC1D25* diminue significativement la résorption osseuse, la formation de cellules multinucléées ainsi que le nombre de noyaux par cellules. Ces résultats suggèrent que *TBC1D25* est impliquée dans la résorption osseuse par la régulation de la polarisation des ostéoclastes et de la résorption ainsi que dans la formation de cellules multinucléées.

Mots clés: *TBC1D25*; RabGAP; Ostéoclastes humains; Résorption osseuse.

Abstract

The osteoclast cell polarization and the ruffled border formation during bone resorption are major vesicle trafficking events. Rab GTPases have been shown to be involved in these processes, however very little is known about their regulators, such as rab GTPase activating proteins (rabGAPs). In osteoclasts, we previously identified two spliced isoforms of *TBC1D25*, encoding a rabGAP which had never been studied in these cells. Using *in vitro* cultures, we evaluated the expression of TBC1D25 in human osteoclasts. TBC1D25 was expressed at the sealing zone co-localizing with F-actin, with an annular distribution, and also at the ruffled membrane with a less intense colocalization with LAMP2 and cathepsin K, but none with RAB7 or V-ATPASE. Inhibiting TBC1D25 expression significantly decreased bone resorption, as well as the formation of multinucleated cells and the number of nuclei per cell. These results suggest that TBC1D25 has a role in bone resorption via the regulation of osteoclast polarization and resorption, and multinucleation as well.

Keywords: TBC1D25; RabGAP; Human osteoclasts; Bone resorption.

1. Introduction

Bone remodeling is a physiological process that involves bone resorption followed by new bone formation. Bone-resorbing cells, called osteoclasts, are derived from the monocyte-macrophage lineage. Upon adhesion to the bone, the osteoclasts polarize forming the “resorption organelle” with an actin-rich sealing zone delimiting the ruffled border, itself resulting from a polarized traffic with extensive fusion of vesicles (Coxon and Taylor, 2008; Ory et al., 2008). Osteoclasts are highly motile and polarized cells which alternate between migratory and bone-resorbing stages, with intense membrane remodeling.

Overactive osteoclasts that display mis-regulated activities are present in Paget's disease of bone, a metabolic osteopathy characterized by excessive bone resorption that leads to focal and disorganized increases in bone turnover. Pagetic osteoclasts are increased in both number and size, contain larger number of nuclei compared to normal osteoclasts, and have an increased resorption capacity. Resistance to apoptosis, and defects in autophagy also contribute to their peculiar phenotype (Chamoux et al., 2009; McManus et al., 2016). Mutations in the *SQSTM1* gene are an important cause of Paget's disease of bone, with the p62^{P392L} mutation contributing to the overactive state of osteoclasts (Chamoux et al., 2009; Galson and Roodman, 2014). Besides gene expression modulation or mutations (Albagha et al., 2013; Chung and Van Hul, 2012), other genetic factors or predisposing factors likely account for the vast majority of cases not caused by *SQSTM1* mutations. Alternative splicing (AS), a tissue-specific process involving regulated insertion or omission of exonic regions during mRNA maturation, plays a central role in protein diversity and post-transcriptional gene regulation (Kelemen et al., 2013). Searching for AS events in overactive osteoclasts from Paget's disease of bone, we previously identified differential AS in pagetic osteoclasts compared to healthy controls, in genes yet unknown to be involved in osteoclast biology, including *TBC1D25* (TBC1 domain family member 25) a rab GTPase-hydrolysis activating protein (rab GAP) (Klinck et al., 2014). As the alternative splicing event observed in pagetic osteoclasts results in the appearance of a stop codon, leading to a truncated form, the two spliced isoforms of *TBC1D25* differ markedly in size (688 vs. 100 amino acids) and only share the first 78 residues in the N-terminal region.

The structural changes ensuring the functional integrity and mobility of osteoclasts require substantial membrane supplies. Rab proteins are small GTPases that control many aspects of intracellular membrane trafficking between organelles (Herve and Bourmeyster, 2018), and have been implicated in vesicle trafficking in osteoclasts, which involves osteoclast polarization and the

formation of the ruffled border when entering the bone resorption state (Roy and Roux, 2018). In human osteoclasts however, very little is known about the expression of Rab regulators such as GAPs, that switch off rabs by hydrolyzing their GTP into GDP. TBC1D25 has been shown to be involved in vesicular trafficking and autophagy in other systems (Itoh et al., 2011). We characterized here the expression of TBC1D25 in bone-resorbing human osteoclasts, particularly in relation to the bone resorption apparatus, as well as its functional impact.

2. Materials and methods

2.1. Materials. Opti Eagle's minimum essential media (Opti-MEM Gibco™) was purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA). Penicillin, streptomycin, fungizone, glutamine, and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Wisent (Montreal, QC). Ficoll-Paque was purchased from GE HealthCare (Little Chalfont, UK). Human recombinant (hr) M-CSF was purchased from R&D (R&D Systems, Minneapolis, MN); soluble hrRANKL was produced in our laboratory. Rabbit polyclonal antibodies to detect TBC1D25 (HPA029197) and β -actin (A5441) were purchased from MiliporeSigma (Burlington, MA), and to detect LC3B (2275) from Cell Signaling Technology, Inc (Danvers, MA); mouse monoclonal antibody against α 2 β 1 (MAB1998) from MiliporeSigma; mouse monoclonal antibodies targeting cathepsin K (sc-48353), vacuolar H⁺-ATPase subunit α 1 (V-ATPASE α 1) (sc-293336), Lysosomal Associated Membrane Protein 2 (LAMP2) (sc-18822) and Rab7 (sc-271608) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Alexa Fluor secondary antibodies, Alexa-633 phalloidin (A22284), and Di Aminido Phenyl Indol (DAPI) were purchased from Invitrogen (ThermoFisher Scientific). *TBC1D25* Dicer-substrate small interfering RNAs (DsiRNAs) and primers were purchased from IDT (Coralville, IA).

2.2. Osteoclast cultures. Blood was harvested from human umbilical cords at delivery after obtaining informed consent from parturient women, as approved by our institution's review board. Cord blood monocytes (CBMs) were isolated from heparinized blood by density-gradient centrifugation and seeded in methylcellulose-based medium for 10 days (MethoCult, StemCell Technologies, Vancouver, BC), then collected and plated at a concentration of 6×10^5 cells/ml in either 8-well chamber/slides Lab-Tek or 12-well plates (Falcon: A Corning Brand, Corning, NY) for a further 2 weeks in Opti-MEM supplemented with 2% FBS, M-CSF (25 ng/ml), RANKL (100 ng/ml), and antibiotics (penicillin 1 IU/ml, streptomycin 100 mg/ml, amphotericin B 0.5 mg/ml). The medium was changed every 2 to 3 days. We had previously showed that these culture conditions

generated multinucleated cells that expressed osteoclast markers and had the ability to resorb bone (Fong et al., 2013).

2.3. Immunofluorescence and confocal microscopy. At the end of the cultures, cells were washed quickly with cold PBS, and then fixed with 100% methanol for 15 min at -20°C . Primary antibodies directed against integrin $\alpha 2\beta 1$, cathepsin K, V-ATPASE $\alpha 1$, RAB7, LAMP2, and TBC1D25 were incubated in antibody diluent with background-reducing components (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) overnight at 4°C . Long wavelength emitting fluorophores (ie red-emitting components) were used to avoid bone matrix autofluorescence artifacts (Coxon, 2012). Alexa-647 anti-rabbit and Texas Red-X anti-mouse antibodies were therefore used as secondary antibodies, and incubated for 1 h at room temperature. DAPI counterstaining was performed so that osteoclasts containing more than 3 nuclei could be visualized. When Alexa-633 Phalloidin was used, cells were fixed with 4% PFA for 10 min then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 minutes and Alexa-546 anti-rabbit was used.

Cells were examined with a scanning confocal microscope (Leica TCS SP8, Leica microsystems, Wetzlar, Germany) that was coupled to an inverted microscope with a HC PL APO x63 oil immersion objective (Leica microsystems) (Photonic microscopy platform, University of Sherbrooke). To eliminate bleed-through or crossover of fluorescence emission since fluorescence spectra of the fluorophores used overlap, sequential scanning between lines was used to collect optical Z sections of whole multinucleated cells at $0.3\ \mu\text{m}$ intervals. Digitized images were computed and processed with Leica LASX software. In immunofluorescence double-labeling, an intermediate color, indicating colocalization, is obtained only if the fluorescence emission intensity of the two probes is similar, which was not the case for our antibodies. We therefore used the white color in the overlay picture for pixels with positive signals for both probes. Colocalization was quantified using the Mander's overlap coefficient (range 0-1) (Bolte and Cordelieres, 2006) computed from fluorescence-imaging determining the proportion of overlapping pixels between two channels (Leica LASX software).

2.4. RNA inactivation. On day 17 of osteoclast cultures, cells were either non-transfected, or transfected with a DsiRNA (Dicer-substrate Short Interfering RNA) negative control or with DsiRNA sequences that inhibited human *TBC1D25* gene expression (*TBC1D25* DsiRNA), and cells were maintained in for another week in culture. Compared to traditional 21-mer siRNA which are designed to mimic DICER1 product, 27-mer DsiRNA are designed to mimic DICER1 substrate. DICER1 was shown to be part of the RNA-silencing complex (RISC) and integrate double-stranded RNA to

the RISC. Increased target silencing was shown using the 27-mer DsiRNA. (Kim et al., 2005; Rose et al., 2005)

To knockdown *TBC1D25*, a set of two different DsiRNAs was used in order to optimize this inhibition, which were common to both isoforms, situated at nucleotides 892–916 (DsiRNA1) and 2036–2059 (DsiRNA2) (**Table 1**). The transfection procedure followed the manufacturer's instructions using 0.4 μ M of DsiRNA. Briefly, the culture medium was removed and replaced with a mixture containing Lipofectamine LTX (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) and the DsiRNAs diluted in serum and antibiotic-free Opti-MEM. Cells were maintained at 37°C for 4 h, and fresh culture medium was added again to the dishes. The downregulation of *TBC1D25* expression was assessed by quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) and immunoblot.

Table 1: Primer and DsiRNA sequences

Gene	Primers for qPCR	Product length	Nucleotides
<i>TBC1D25</i> * (qPCR)	Forward 5'-CCAGCTCTCCCGACCCGA-3' Reverse 5'-ATGTAGTCCATCCGCTCTCGGC-3'	138	768-884
<i>TBC1D25</i> (ASPCR)	Forward 5'-AATGTGAGAGCTTCTTGCCG-3' Reverse 5'-AGGATGGACTGTGTAAAGGGC-3'	285 230	257-641 (flanking AS event)
DsiRNA	Sequences		
TBC1D25 DsiRNA #1	5'- CGG AUG GAC UAC AUG AAA CGC AAG A -3' 3'- UC GCC UAC CUG AUG UAC UUU GCG UUC U -5'	---	892-916
TBC1D25 DsiRNA #2	5'- GCA AUG GGC UGG AUU AUA AUG AGC T -3' 3'- CG CGU UAC CCG ACC UAA UAU UAC UCG A -5'	---	2036-2059
Negative control DsiRNA	5'- CGU UAA UCG CGU AUA CGC GUA T -3' 3'- CAG CAA UUA GCG CAU AUU AUG CGC AUA -5'	---	---

*NM_001348262.2

2.5. Gene expression study. For the quantitative real-time RT-PCR analysis, total RNA was extracted from fully matured OCs using the RNeasy plus kit (Qiagen, Hilden, Germany), including a DNase digestion step. At least 50 μ g of RNA was harvested from each cell sample. RNA samples were sent for qPCR and alternative splicing analysis by end-point RT-PCR (ASPCR) (RNomics Platform, University of Sherbrooke). After the initial reverse transcription step, the resulting cDNAs were used to perform qPCR using both reverse and forward specific primers for *TBC1D25* and actin. The primers used in qPCR were designed to amplify a sequence common to both isoforms, with the amplification of a product of 138 nucleotides (768–884) (**Table 1**).

In order to assess the isoform ratio, we performed ASPCR which involves the relative quantification of isoforms from a single RT-PCR reaction. This was performed using primers flanking the AS events, such that following amplification and analysis by microcapillary electrophoresis on

Caliper LC-90 instruments (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) would allow us to deduce the relative ratio of the isoforms (product lengths 385 and 230 nucleotides) (**Table 1**). The ratio of the longest isoform to the sum of the long and short isoforms is called the “percent splicing index” or PSI (Klinck et al., 2014).

2.6. Immunoblotting. Protein lysates from whole osteoclast cultures were quantified with a modified Bradford assay (Bio Rad, Hercules, CA) and run through SDS-PAGE gels. Immunoblots were performed by incubating overnight at 4°C with primary antibodies where appropriate. HRP-conjugated secondary antibodies were used to achieve detection with a chemiluminescent system. Actin expression was assessed as loading control. The anti-TBC1D25 antibodies used are directed against peptide amino acids 55–170. The low number of amino acids recognized as common to both forms may explain why the short isoform is not recognized by this antibody, which only detects the long isoform (Klinck et al., 2014).

2.7. Bone resorption. CBMs were allowed to settle on 0.3 cm² x 0.15 mm bovine devitalized bone slices, and then cultured for a total of 3 weeks, as described above. The bone slices then were removed, washed with sodium hydroxide and distilled water, sonicated to remove cell debris, and stained with 1% toluidine blue containing 1% sodium borate. Bone slices were then observed under light microscopy with an epi-illumination (Zeiss Stemi 2000-c stereomicroscope, magnification 45x). Resorption pits appear as darker areas of blue/purple color with a sparkling appearance. Pictures were taken, and resorbed areas were outlined manually using NIH ImageJ software to calculate the percentage of the resorbed area on each slice.

2.8. Formation of multinucleated cells. Osteoclasts were generated from CBM cultures as described above in 8-well chamber/slides Lab-Tek. At the end of culturing, the cells were fixed using 3% PFA, permeabilized using 0.1% triton, stained using hematoxylin (Abcam, Cambridge, UK) and 0.25% eosin and preserved using 50% PBS and 50% glycine as mounting medium. The slides were visualized using a Zeiss ApoTome 2 microscope (Photonic microscopy platform, University of Sherbrooke) and cells containing 3 or more nuclei were counted as multinucleated cells (MNCs) (area analyzed per well: 0.4 cm²). Nuclei per cells were also counted in 100 multinucleated cells per well.

2.9. Autophagy study by immunoblot and immunofluorescence. Autophagosome formation requires the activation of LC3-I conjugated to phosphatidyl-ethanolamine (PE) to generate LC3-II.

LC3B-II production is correlated with increased levels of autophagic vesicles, and thus, it is a reliable marker associated with the development of autophagic structures, from phagophore assembly to lysosomal degradation (Barth et al., 2010). To study autophagy, we evaluated the expression of LC3B using both immunoblotting and immunofluorescence. Osteoclast cultures either were treated with EMEM without serum to induce autophagy, or were left in standard medium (Opti-MEM 2% FBS) to establish basal levels of autophagy. The autophagic flux was evaluated in conditions that promoted autophagy (EMEM without serum) in the presence or absence of chloroquine (40 μ M) a lysosomotropic agent that inhibits lysosome-mediated proteolysis (Klionsky and al., 2016).

We also determined the number of LC3B puncta per osteoclast area by immunofluorescence. The average number of LC3B puncta per cell area was used to quantify autophagy from high-resolution, high-quality (low autofluorescence) TIFF images captured at 63X magnification using Leica TCS SP8 confocal microscope at a resolution of 150–200 nm. The number of puncta number was quantified using NIH Image J software (McManus et al., 2016).

2.10. Statistical analysis. Results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD), and the significance was determined using paired ANOVA, followed by Tukey's test using PRISM software (8.0). Chi-squared test with Bonferroni correction was used to compare categorical variables (Proportions of MNCs with low, medium or high numbers of nuclei). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Expression of TBC1D25 in bone-resorbing osteoclasts

Osteoclasts only develop a sealing zone and a closely vesicle-trafficking related ruffled membrane when they resorb the bone matrix (Mulari et al., 2003). Therefore, to study the relationships of TBC1D25 with the resorptive organelle, we studied its expression in mature osteoclasts developed on bone. For confocal analyzes, we considered sections close to the bone matrix, and some sections have also been performed a little at a distance, at the level of the nuclei. TBC1D25 expression in bone-resorbing osteoclasts was observed more abundantly at the membrane adjacent to the bone surface (**Figure 1-A, 1-B**). We used double-labeling to assess the

cellular localization of TBC1D25, particularly relative to the ruffled membrane, which is considered as a lysosome-related organelle (Luzio et al., 2014; Shimada-Sugawara et al., 2015).

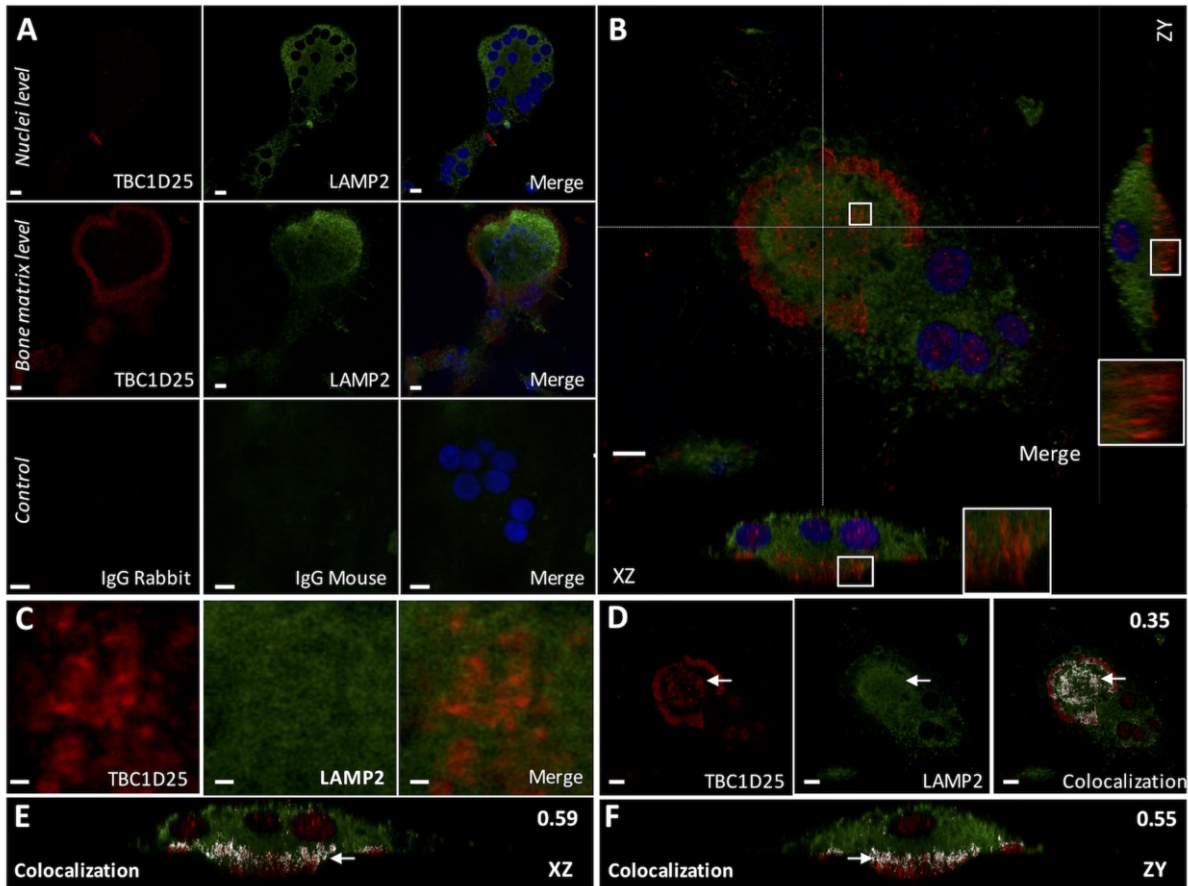


Figure 1: TBC1D25 and LAMP2 expression using confocal microscopy.

Human osteoclasts cultured on bone slices were double-stained using antibodies directed against TBC1D25 (red) and antibodies against LAMP2 (shown in green for clear comparison), and counterstained with DAPI (blue). Optical Z sections of whole multinucleated cells were collected. Images are representative of 3 independent experiments. **1-A:** Optical sections at nuclear level and bone matrix level are shown. Negative controls (mouse and rabbit Ig) are represented (scale bar 10 μ m). **1-B:** Orthogonal views are shown (xz and zy sections). **1-C: Magnification** of a TBC1D25 and LAMP2 colocalization zone (scale bar 1 μ m). **1-D, -E, -F: Quantification of colocalization:** The colocalization of TBC1D25 and LAMP2 near the plasma membrane adjacent to bone is illustrated using white for pixels with positive signals for both probes in optical section (1-D) and in orthogonal views, xz (1-E) and zy (1-F). The signals were quantified at the ruffled membrane (arrows), and the overlap coefficient is indicated (upper-right corner) (scale bar 10 μ m).

We evaluated the double labeling of TBC1D25 and lysosomal membrane protein LAMP2. Both proteins were found to be expressed near the bone matrix with a more annular and peripheral expression of TBC1D25 compared to that of LAMP2. While a colocalization was demonstrated at the ruffled membrane, there was no colocalization of the two proteins at the ring-shaped motif formed by TBC1D25 (**Figure 1-A, 1-B**). Using 3D reconstruction software, orthogonal views

confirmed TBC1D25 expression at the membrane surface facing bone, with magnification of a TBC1D25 and LAMP2 colocalization zone (**Figure 1-B, 1-C**). The colocalization observed between TBC1D25 and LAMP2 was quantified with a mean coefficient of overlap of 0.50 ± 0.1 at the ruffled membrane (**Figure 1-D, 1-E, 1-F, and Suppl Fig. S1**).

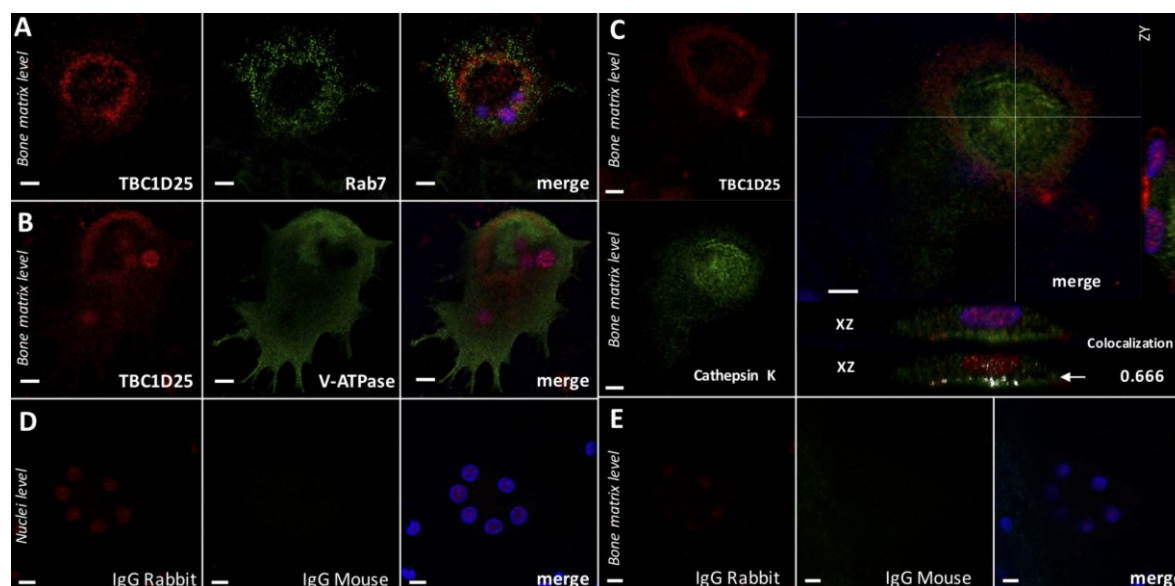


Figure 2: Co-labeling of TBC1D25 and proteins expressed at the ruffled membrane.

Human osteoclasts cultured on bone slices were double-stained using antibodies directed against TBC1D25 (red) and antibodies against RAB7 (**2-A**), V-ATPASE $\alpha 1$ (**2-B**), and cathepsin K (**2-C**) (shown in green for clear comparison), and counterstaining was performed with DAPI (blue). Images are representative of 3 independent experiments. Optical sections at bone matrix level are shown (scale bar 10 μm). **2-C: Co-labelling of TBC1D25 and cathepsin K:** Optical sections at bone matrix level are shown. Colocalization is represented using white for overlapped pixels. The signals were quantified and the results are expressed using the overlap coefficient at the ruffled membrane. **2-D, 2E:** Negative controls (mouse and rabbit Ig) are represented. Optical sections at nuclear level and bone matrix level are shown (scale bar 10 μm).

We next studied other proteins typically expressed at the ruffled membrane during bone resorption such as RAB7, a rab GTPase known to regulate the fusion of acidic vesicles to the ruffled membrane, and the vacuolar proton pump V-ATPASE, involved in the acidification of the resorption compartment (Sun et al., 2005; Zhao et al., 2002). In double-labeling experiments, the expression of TBC1D25 appeared, as described above, mainly expressed at the periphery of the ruffled membrane, with a ring-shaped pattern, and a weaker central expression (**Figure 2-A, 2-B, 2-C**). In sections close to the bone matrix, the expression of RAB7 was essentially peripheral to that of TBC1D25, without colocalization with TBC1D25 (**Figure 2-A**). A more diffuse expression of the $\alpha 1$ subunit of V-ATPASE observed at the membrane facing bone, without major colocalization with TBC1D25 (**Figure 2-B**). Finally, cathepsin K, the major bone-degrading enzyme contained in the secretory vesicles (Mulari et al., 2003), was strongly expressed in bone-resorbing osteoclasts,

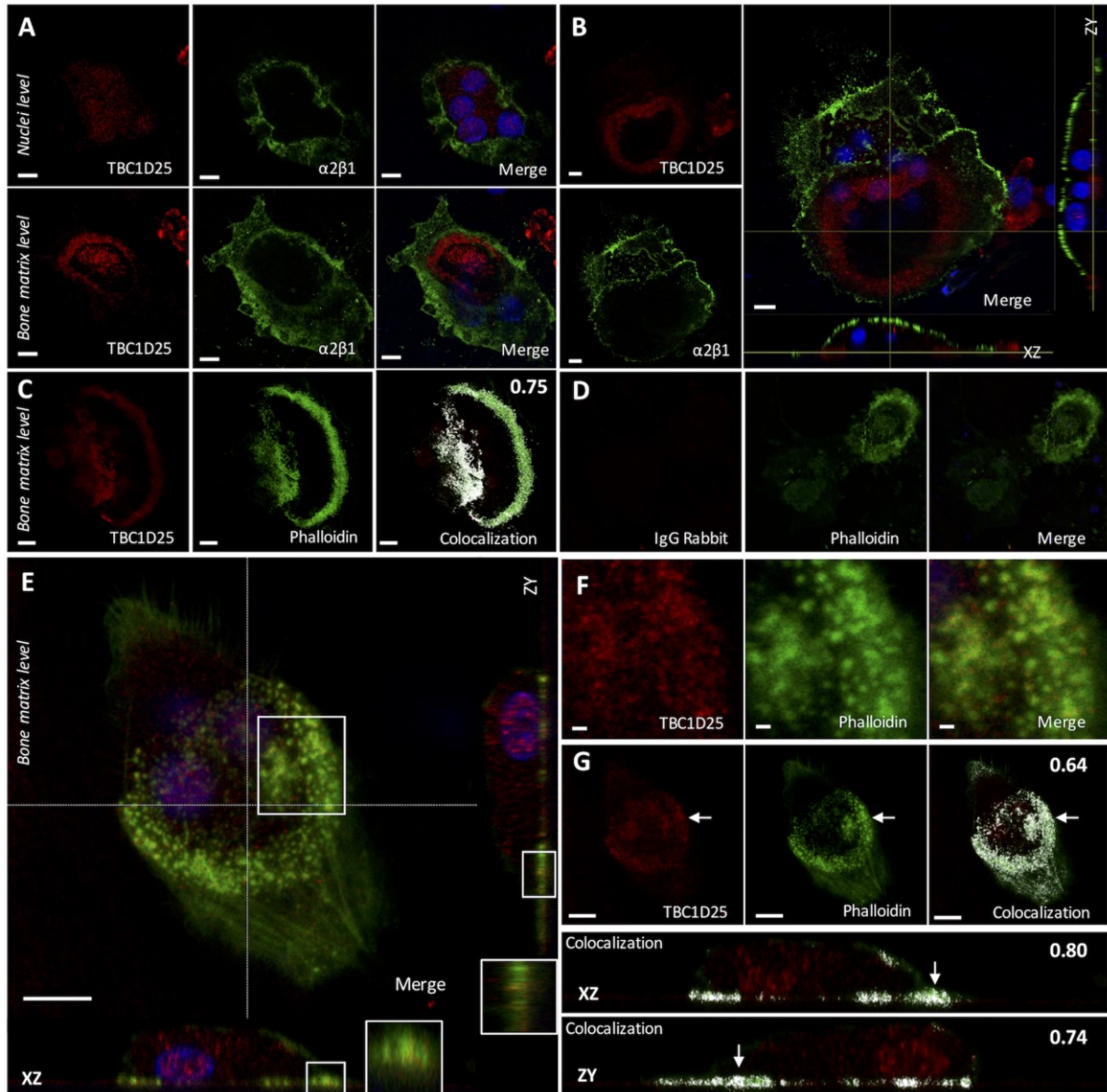


Figure 3: Co-labeling of TBC1D25 and integrin ($\alpha 2\beta 1$) and F-actin.

Human osteoclasts cultured on bone slices were double-stained using antibodies directed against TBC1D25 (red), and antibodies against integrin $\alpha 2\beta 1$ or phalloidin Alexa-633 (shown in green for clear comparison), and counterstaining was performed with DAPI (blue). Images are representative of 3 independent experiments. **3-A: Co-labelling of TBC1D25 and integrin $\alpha 2\beta 1$.** Optical sections at nuclear level and bone matrix level are shown. **3-B:** Optical Z sections of whole multinucleated cells were collected. **3-C:** Co-labelling of TBC1D25 and actin. Optical sections at bone matrix level are shown. Colocalization is represented using white for overlapped pixels (scale bar 10 μm). **3-D:** Photographs of negative controls (Phalloidin and rabbit Ig) are represented. **3-E: Actin and TBC1D25 co-labelling:** Orthogonal views are shown (xz and zy sections). **3-F: Magnification** of a TBC1D25 and Actin colocalization zone (scale bar 1 μm). **3-G: Quantification of colocalization:** The colocalization of TBC1D25 and Actin near the plasma membrane adjacent to bone is illustrated in optical section and in orthogonal views, xz and zy. The signals were quantified and the results are expressed using the overlap coefficient at the sealing zone (upper-right corner) (scale bar 10 μm).

localized at the ruffled membrane, without peripheral reinforcement and with a colocalization with TBC1D25 (**Figure 2-C**). The mean overlap coefficient was 0.35 or less for RAB7 and V-ATPASE, and 0.54 ± 0.1 for cathepsin K at the ruffled membrane with TBC1D25 (**Suppl Fig. S1**).

Adhesion proteins (integrins) and cytoskeletal components (actin) play an important role in the phenotype changes of osteoclasts. In co-labeling experiments of TBC1D25 and the integrin $\alpha 2\beta 1$, a peripheral expression of $\alpha 2\beta 1$ was observed at the basolateral membrane, without colocalization with TBC1D25 (**Figure 3-A, 3-B**). On the other hand, TBC1D25 co-localized with the actin ring in bone-resorbing osteoclasts (**Figure 3-C**). A strong colocalization with a mean overlap coefficient of 0.74 ± 0.05 was observed between TBC1D25 and actin at the sealing zone (**Figures 3-E, 3-F, 3-G, Suppl S1**).

In order to better describe TBC1D25 expression in osteoclasts, and due to its expression at the actin-rich sealing zone, we also evaluated TBC1D25 expression in osteoclasts grown on glass, cell adhesion relying on a looser podosome belt (Ory et al., 2008). As we had already observed (Klinck et al., 2014), in osteoclasts cultured on glass, without sealing zone, the expression of TBC1D25 was more diffuse in the cytoplasm, without annular formation (**Suppl Fig. S2-A**).

3.2. Expression of TBC1D25 in human osteoclasts: sequential analysis in non-resorbing osteoclasts.

As the expression of TBC1D25 is still largely unknown in osteoclasts, we first assessed the protein expression of TBC1D25 during osteoclast formation at various times (from the start of culture through to mature osteoclasts) at four different times (D0, D7, D14, and at the end of culture D21). Expression of the active form (the only one detected by immunoblot (Klinck et al., 2014)) increased during culture, with the maximum seen after one week. Then expression persisted, although it was significantly decreased over the last two weeks of culture (**Figure 4-A, 4-B**).

3.3. Impact of TBC1D25 on osteoclast formation and their capacity to resorb bone

The finding of TBC1D25 expression at the sealing zone and the ruffled membrane, two components of the organ of bone resorption, highlighted its possible implication in the process of bone resorption. Furthermore, a cell-cell fusion process is also involved in the formation of osteoclasts, and could be dependent on small GTPases (Shimada-Sugawara et al., 2015). On the other hand, cell fission has been described in mature osteoclasts as a process of regulating the activity of these cells (Jansen et al., 2012). We therefore wondered the impact of downregulating

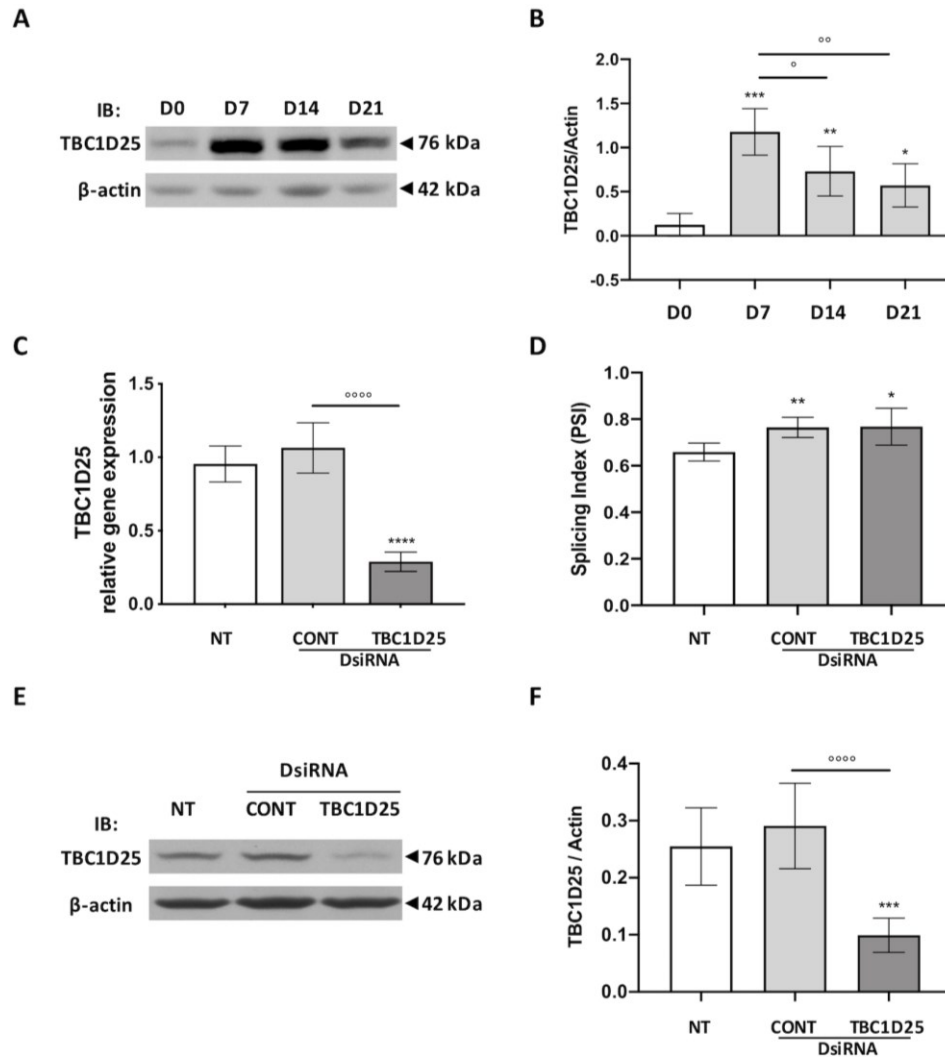


Figure 4: TBC1D25 expression during osteoclast formation, and its modulation by DsiRNA.

4-A: Sequential expression of TBC1D25. TBC1D25 protein expression was assessed at four different times during osteoclast cultures (D0, D7, D14, and at the end of culture D21). Whole cell lysates were subjected to immunoblotting (IB) using antibodies for TBC1D25 and β -actin. **4-B: IB quantification:** optical densities were measured with ImageJ software. The graph shows the ratio of TBC1D25 to actin, mean \pm SD (n = 8 independent experiments); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. D0; °p<0.05, °°p<0.01 vs. D7. **4-C: TBC1D25 knock-down (qPCR):** After 17 days, cells were transfected with a control DsiRNA (CONT), with TBC1D25 DsiRNA or left untransfected (NT). Quantitative PCR analysis and immunoblot analysis of TBC1D25 expression were performed at day 21 of culture, on mature osteoclasts. Total RNA extraction was performed on osteoclast cultures, followed by real-time PCR. Relative expression of TBC1D25 is expressed as mean \pm SD (n = 10 independent experiments). **4-D: ASPCR:** The splicing index (PSI) of the TBC1D25 isoforms was determined in knockdown experiments. PSI is expressed as mean \pm SD (n = 10 independent experiments). **4-E: Immunoblots (IB):** Protein extracts were analyzed using antibodies directed against TBC1D25 (76 kDa) or β -actin. **4-F: IB quantification:** optical densities were measured with ImageJ software. The graph shows the ratio of TBC1D25 over actin, mean \pm SD, (n = 10 independent experiments); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. NT; °°°°p<0.0001 Dsi CONT vs. TBC1D25.

TBC1D25 on both the formation of multinucleated cells and on the bone resorption in a human model of osteoclastic differentiation *in vitro*.

To that end, we used RNA interference to reduce *TBC1D25* gene expression. The transfection of DsiRNAs generated against human *TBC1D25* in osteoclasts resulted in a 70% reduction in the expression of *TBC1D25* mRNA compared to the transfection of a control DsiRNA (**Figure 4-C**). The two DsiRNAs were not isoform-specific and did not modify the splicing events and the ratio between the long/short isoforms, as demonstrated by ASPCR with a similar PSI (splicing index) in the presence of DsiRNA *TBC1D25* (0.77 ± 0.08) compared to the DsiRNA control (0.76 ± 0.04), although both were significantly higher than that of nontransfected cells (0.66 ± 0.03) (**Figure 4-D**). The *TBC1D25* downregulation was associated with lower protein levels, with a 65% decrease in the expression ratio of *TBC1D25* protein over actin in cells transfected with specific DsiRNAs compared to the control (**Figure 4-E, 4-F**).

To evaluate the impact of *TBC1D25* on bone resorption, osteoclast cultures were performed on bone slices. Bone resorption decreased in cultures transfected with a control DsiRNA compared to non-transfected cells, but not significantly. A significant decrease in bone resorption was observed following *TBC1D25* downregulation ($5.2\% \pm 3.6\%$) compared to osteoclasts transfected with a negative control DsiRNA ($13.1\% \pm 5.8\%$) (-60%, $p < 0.001$). By normalizing the resorption over the number of osteoclasts, the bone resorption area per multinucleated cell was also significantly reduced following *TBC1D25* downregulation ($0.019\% \pm 0.011\%$) compared to osteoclasts transfected with negative control DsiRNA ($0.029\% \pm 0.013\%$) (-34%, $p < 0.05$) (**Figure 5-A, 5-B**). Furthermore, decreasing *TBC1D25* expression by DsiRNA did not affect the formation of the actin-rich sealing zone (**Suppl Fig. S2-B**).

The number of MNCs per surface unit was evaluated at the end of culturing (**Figure 6-A**), with significant decrease (-31%) when downregulating *TBC1D25* (113.3 ± 68.6 MNCs/mm²) when compared to cultures transfected with a negative control (164.3 ± 61.9 MNCs/mm²) (**Figure 6-B**). The number of nuclei per MNC was also significantly decreased when suppressing *TBC1D25* expression (5.2 ± 1.4 nuclei/MNC) compared with the negative control (8.0 ± 1.9 nuclei/MNC) (**Figure 6-C**). When MNCs were separated according to their nuclei number into 3 categories: low (3 to 5), medium (6 to 10) or high (more than 11) nuclei number, a significant increase in the proportion of MNCs with low nuclei number and a significant decrease in the proportion of MNCs with high nuclei number were observed in cultures transfected with *TBC1D25* DsiRNAs (low number: $76 \pm 15\%$; high number: $5 \pm 4\%$) when compared to cultures transfected with a negative control (low

number: 46 ± 14 %; high number: 19 ± 6 %) (Contingency table, Chi-square test $p < 0.001$ DsiRNA control vs. TBC1D25) (Figure 6-D).

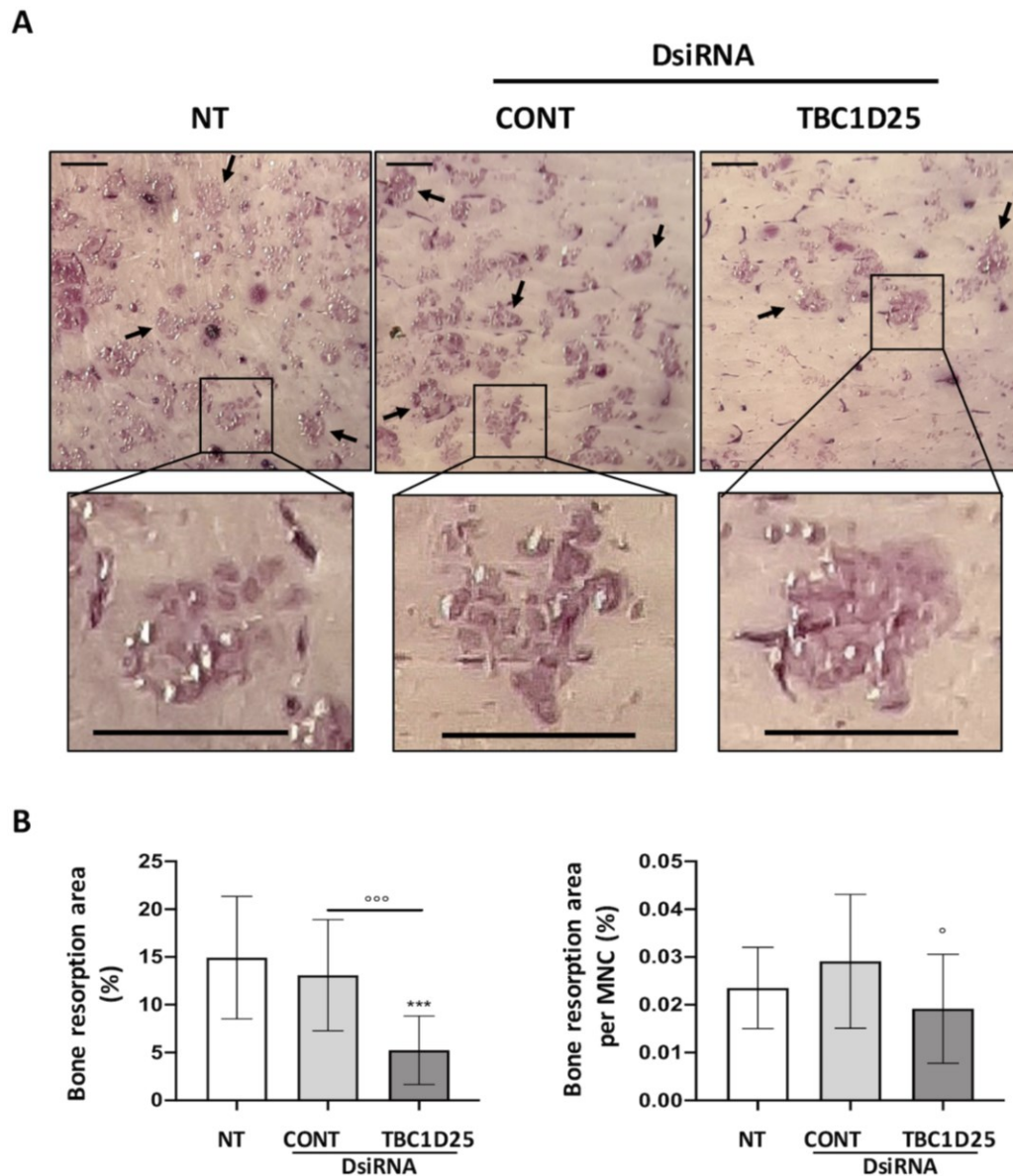


Figure 5: Bone resorption.

CBM were settled and cultured on bovine bone slices, and were transfected after 17 days with a control DsiRNA (CONT), with TBC1D25 DsiRNA or left untransfected (NT). **5-A:** At the end of culturing, bone resorption was assessed by toluidine blue staining and evaluated by optical light microscopy. Resorption areas appear blue/purple in color with a sparkling appearance, and some areas have been indicated with arrows. Representative images illustrating bone resorption are shown (scale bar = 0.5 mm) **5-B:** The resorbed surface area was measured using ImageJ software, to calculate the percentage of the resorbed area on each slice. Results are expressed as bone resorption area per slice (%) and as bone resorption area per multinucleated cell (mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments); *** $p < 0.001$ vs. NT, ° $p < 0.05$, °° $p < 0.001$ Dsi CONT vs. TBC1D25.

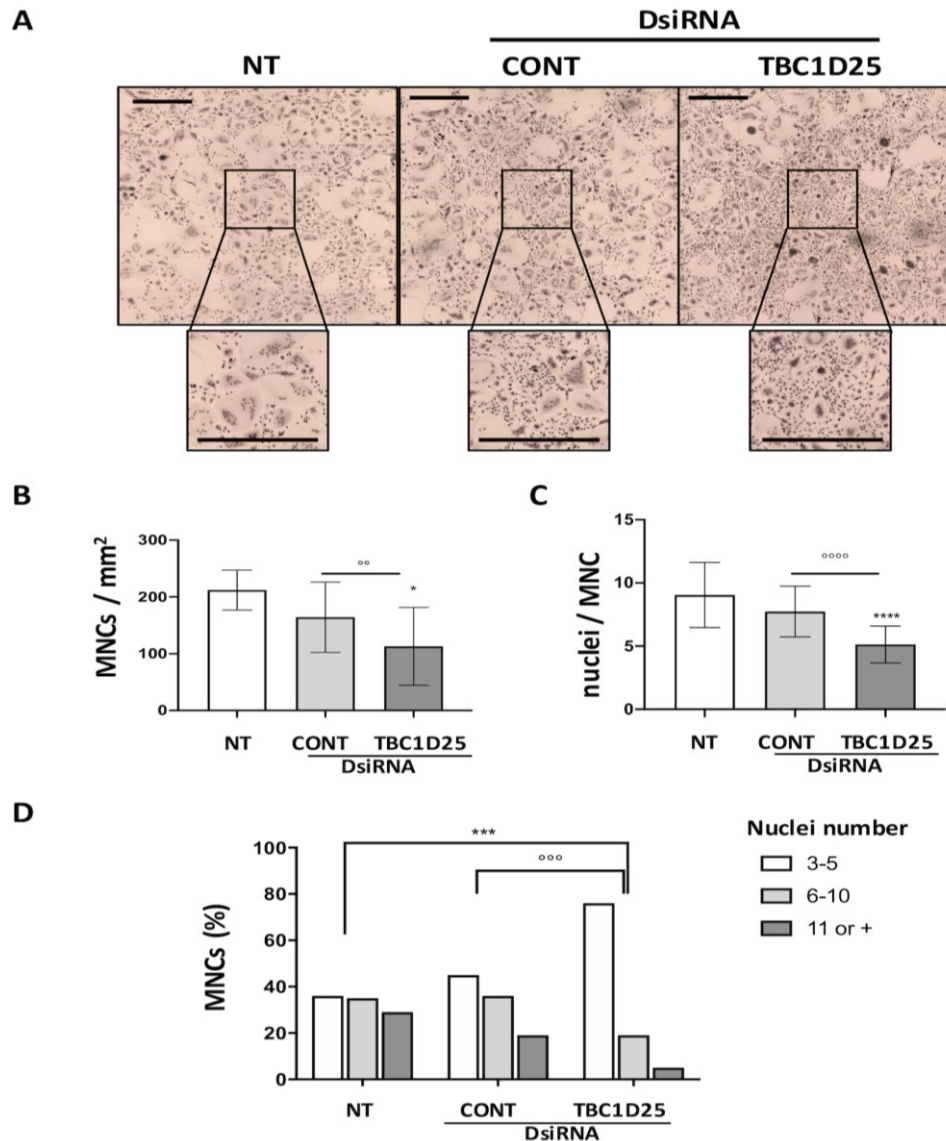


Figure 6: Formation of multinucleated cells.

Cord blood monocytes were cultured in 8-well chamber slides, and were transfected after 17 days with a control or TBC1D25 DsiRNAs or left untransfected. At the end of the cultures, cells were stained using hematoxylin and 0.1% eosin. **6-A:** Multinucleated cells (MNCs): At the end of the culture period, cells were stained with hematoxylin and eosin, and the total number of MNCs per well (surface area: 4 mm²) was evaluated. **6-B:** Cells containing three or more nuclei were scored as MNCs. Photos were taken using a Zeiss ApoTome 2 microscope (scale bar = 0.5 mm). Results are expressed graphically as number of MNCs/mm² (mean ± SD, n = 10 independent experiments). **6-C:** Nuclei were counted in cells containing 3 or more nuclei in 100 multinucleated cells per well. Results are expressed graphically as nuclei/MNCs (mean ± SD, n = 10 independent experiments). *p<0.05, ****p<0.0001 vs. NT; **p<0.01, ****p<0.0001 Dsi CONT vs. TBC1D25. **6-D:** The percentages of MNCs with 3 to 5, 6 to 10 and more than 11 nuclei are shown on a graph representing the contingency table; Chi-square test was used to evaluate differences; ***p<0.001 NT vs. DsiRNA TBC1D25; ***p<0.001 DsiRNA control vs. TBC1D25 (n = 10 independent experiments).

3.4. Impact of TBC1D25 on basal autophagy: immunoblot analysis and IF study of LC3B

To investigate autophagy in osteoclast cultures, we first determined by immunoblot analysis the levels of LC3B-II over LC3B-I in basal and autophagy-induced conditions in presence of chloroquine or not to measure the autophagy flux (**Suppl Fig. S3-A**). We compared LC3B-II/LC3B-I ratios in either non-transfected cultures or in cells transfected either with a specific or a negative control DsiRNA.

In non-transfected cells (NT), an increase in the LC3B-II/LC3B-I ratio was observed in the presence of a low stimulation of autophagy by EMEM without serum, and an additional increase in the presence of chloroquine, which was expected considering that this agent blocks lysosome-mediated proteolysis. In transfected cells (control or TBC1D25 DsiRNA), the basal levels of the LC3B-II/LC3B-I ratios were higher but did not differ between both groups, and chloroquine significantly increased this ratio (**Suppl Fig. S3-B**). Thus, the decreased expression of TBC1D25 had no effect in basal autophagy in these cells, nor on the autophagy flux. Similar results were also found using single-cell based immunofluorescence by calculating the number of LC3B puncta per osteoclast area in the same conditions as mentioned above (**Suppl Fig. S3-C, S3-D**).

4. Discussion

Like other small GTPases, rab proteins circulate between cytosol and membranes in cycles that include their activation by GDP-GTP exchange factors (GEFs) until GTP-hydrolysis activating proteins (GAPs) discontinue their activity (Muller and Goody, 2018). They are key components in membrane trafficking, interacting with effectors as various as sorting adaptors, tethering factors, kinases and phosphatases, to regulate vesicular dynamic pathways (Stenmark, 2009). Because bone-resorbing osteoclasts are highly polarized with intense membrane remodeling activity, rabs are crucial in their functioning. While at least 26 of the 70 small GTPases of the rab family that have been identified in humans, have been detected in osteoclasts (Hirvonen et al., 2012), only two regulators, rab GEF RIN3 and rab GAP TBC1D25 have been shown to be expressed in human osteoclasts (Klinck et al., 2014; Vallet et al., 2015), and their functions and partners are still unknown in these cells. In the present work, we confirmed the expression of TBC1D25 and its functional impact in human osteoclasts, which represent an ideal model to study the rab network and their regulators due to the intense traffic of vesicles which governs their activity.

On adhesion to the bone, osteoclasts become polarized and reorganize their cytoskeleton. A sealing zone is formed by densely packed actin-rich podosomes that delimit the ruffled border. The $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins which co-localize with actin in resting osteoclasts, modify their interactions and

are expressed on the basolateral membrane and the ruffled membrane in osteoclasts which resorb bone, no longer co-localizing with actin (Helfrich et al., 1996). During bone resorption, osteoclasts set in motion a polarized trafficking and fusion of secretory vesicles forming the ruffled border facing bone (Coxon and Taylor, 2008; Mulari et al., 2003). Proteins are inserted at the ruffled membrane during its constitution, such as the vacuolar proton pump V-ATPASE, involved in the acidification of the resorption compartment (Sun et al., 2005; Zhao et al., 2002). The late endosomal RAB7, which is involved in vesicular traffic and the formation of the ruffled membrane, has been localized at the latter, interacting specifically with its effector RAC1 at the sealing zone of resorbing osteoclasts (Sun et al., 2005). Enzymes like cathepsin K, involved in bone degradation, are contained in the secretory vesicles to be released into the resorption compartment during the vesicle fusion, and are therefore found expressed close to the ruffled membrane (Mulari et al., 2003).

We have shown here that rab GAP TBC1D25 was indeed expressed in osteoclasts, with a peculiar annular reinforcement at the bone-facing membrane of resorbing osteoclasts, strongly co-localizing with the actin-rich sealing zone that defines the resorption area beneath the osteoclast, but not with $\alpha 2\beta 1$ whose expression predominated at the basolateral membrane, and co-localizing as well with LAMP2 and cathepsin K, both crucial components of the ruffled membrane. Although we found here a RAB7 expression at the ruffled membrane, its expression profile differed from that of TBC1D25, it is therefore unlikely to be the target of TBC1D25. Interestingly, TBC1D25 annular expression at the sealing area was not noted in glass-grown, non-resorbing osteoclasts that exhibited diffuse cytoplasmic expression of TBC1D25 (Klinck et al., 2014). In contrast to the sealing zone formed by densely packed actin-rich podosomes that delimit the ruffled border, in non-resorbing osteoclasts, the sealing zone switches to a podosome belt, and relaxed osteoclasts are depolarized (Ory et al., 2008). The findings of TBC1D25 colocalization with the actin ring reinforce the potential role of TBC1D25 in bone resorption, and could identify TBC1D25 as a hallmark of the sealing area.

Although it is difficult to make conclusions about the precise function of TBC1D25 based on its localization, our results suggest that TBC1D25 is involved in the remodeling of the bone-facing plasma membrane, being expressed at the sealing zone and more discreetly at the ruffled membrane, and thus consequently in the bone resorption. Therefore, in functional studies knocking down TBC1D25, we expected a positive impact on the bone resorption machinery by releasing a target rab from the inhibitory influence of its GAP.

Surprisingly, we found that inhibiting TBC1D25 expression resulted in a decrease in bone resorption. One contributing factor is a direct impact on the bone resorption process, with bone resorption per osteoclast being affected. The results suggest a promoting effect of TBC1D25 on the resorption process that interacts with a currently unknown rab, which should therefore negatively regulate the process, unlike the rabs involved until now, such as RAB7. The identification of the rab governed by TBC1D25 would be an important step in understanding the regulation of the resorption process. Another contributing factor relies on the concomitant decrease in the number of MNCs, the number of nuclei per MNC, and the number of highly nucleated cells, decreasing the production of effective osteoclasts in those cultures. A positive correlation has actually been demonstrated between the number of nuclei per osteoclast and the resorbed area (Piper et al., 1992). Since the transfections were late in the differentiation process, the first stages of osteoclastic differentiation (including fusion) could not have been modified. On the other hand, TBC1D25 could well alter the fission process by inhibiting rabs. In fact, some rab proteins were involved in membrane trafficking during cytokinesis or fission (Finger and White, 2002), and a defect in these pathways may lead to excessive multinucleation (Smurova and Podbilewicz, 2016). Some rabs have also been implicated in regulating the multinucleation process of osteoclasts, such RAB27A which inhibited osteoclast multinucleation (Shimada-Sugawara et al., 2015). Cytokinesis or cell fission has been described in mature osteoclasts as a process of regulating the activity of these cells (Jansen et al., 2012), or as regulating the size of osteoclasts, which would become less effective if they reached too large a size (Pavlos and Ng, 2012). The molecular mechanisms and the regulation of the fission process remain unknown in these cells. Another possibility to explain the decrease in cells with higher numbers of nuclei is that the most multinucleated osteoclasts under the impact of TBC1D25 DsiRNA transfection could be more fragile or would enter apoptosis earlier, which would explain their lower presence at the end of culture.

TBC1D25 location at the sealing zone might also suggest an involvement in the regulation of the osteoclast motility, as osteoclasts alternate between adhesion and motility, and even during bone resorption, displacement of osteoclasts is important to widen the absorbed area (Soe and Delaisse, 2017). Due to the alternation between osteoclast resorption and displacement, on/off regulation mechanisms are in place, and prolonged inhibition of one of the players could have disrupted the whole process.

In addition, rab GAP TBC1D25 is a binding partner of LC3 involved in the fusion between autophagosomes and lysosomes, as shown in murine fibroblasts (Itoh et al., 2011). TBC1D25 has

been shown to interact directly with LC3 on the autophagosome membrane and to inactivate RAB33B through its GAP activity, resulting in delayed autophagosomal maturation when TBC1D25 is overexpressed (Itoh et al., 2011). Inhibiting TBC1D25 could have favored autophagy, and this could have, at least in part, impact the bone resorption results in our model. Indeed, inhibition of autophagy has been shown to promote osteoclast formation and activation, at least through MTOR activation (Glantschnig et al., 2003; Sugatani and Hruska, 2005). Furthermore, stimulation of autophagy by rapamycin strongly inhibited osteolysis in a murine model of bone metastases (Hussein et al., 2012). However, although from TBC1D25 downregulation experiments, our results indicate that TBC1D25 modulates bone resorption with no obvious effect in basal autophagy, and the degradation step did not appear to be affected, as shown by the integrity of the autophagic flow evaluated by the LC3B-II/LC3B-I ratios or the puncta LC3B analysis in osteoclast cultures treated by chloroquine. It is possible that the impact of TBC1D25 on autophagy is not major in human osteoclasts and that its contribution is redundant in this process.

We previously identified in human osteoclasts two spliced isoforms of *TBC1D25* which differ markedly in size, two important domains for its biological activity being missing in the short isoform, the LC3 interacting region and the TBC domain, which suggests that AS could modulate the proportion of active TBC1D25. Interestingly, the differential AS in pagetic osteoclasts resulted in a decrease in the long isoform (Klinck et al., 2014). Our results are in contrast to those observed in PDB, in which a relative decrease in mRNA and protein expression of the long isoform was observed in pagetic osteoclasts vs. healthy osteoclasts (Klinck et al., 2014). An important aspect to consider is the multifactorial origin of PDB. With the role of p62 mutations, genetic variants, and the role of the environment and viruses, a large number of dysfunctions have been described in osteoclasts, which affect various processes, such as formation and fusion, apoptosis and autophagy, or bone resorption (Chamoux et al., 2009 14; Galson and Roodman, 2014 572; McManus et al., 2016 274). Therefore, one plausible explanation is that the impact of TBC1D25 splicing in pagetic osteoclasts is exceeded by the impact of other contributors to PDB, and TBC1D25 knockdown itself cannot reflect the decrease in the long/active form observed in pagetic osteoclasts and restore the phenotype. Another possibility would be a dominant negative effect of the short isoform. DsiRNAs are not specific for the long isoform, and the overall knockdown of the different isoforms of TBC1D25 could be accompanied by a TBC1D25-like effect with decreased multinucleation/resorption and would agree with the effects observed in pagetic osteoclasts. Further studies will be needed to clarify the mechanisms of action of the two TBC1D25 isoforms at the molecular level.

Finally, TBC1D25 has been implicated in cell signaling, having direct interactions with kinase 1 activated by transforming growth factor β (TAK1) and inhibiting phosphorylation of TAK1 and downstream JNK and p38 (Guo et al., 2020). In addition, TAK1 is a major enzyme in osteoclast signaling (Swarnkar et al., 2017). The activation sequence induced by RANKL requires the recruitment of TRAF6, which is responsible for most of the downstream events that lead to osteoclast differentiation and activation (Wada et al., 2006). TRAF6 is essential for the propagation of the RANK signal, forming protein complexes with TAK1 and the adapter proteins TAB1 and TAB2 (Mizukami et al., 2002). While these signaling pathways will be important to assess in human osteoclasts, opening up new perspectives on the mechanisms of action of TBC1D25 in osteoclasts, this area was outside the scope of our present work and remains to be clarified.

A limitation of our study is the incomplete knockdown of TBC1D25 to accurately assess its impact. Osteoclasts are indeed considered to be difficult to transfect using standard approaches (Laitala-Leinonen, 2005). However, a decrease of 60 to 70% was still obtained and was sufficient to induce significant functional changes.

5. Conclusion

Our results provide one of the first studies that use a human model to study the rab GTPase network in osteoclasts (Hirvonen et al., 2012; Van Wesenbeeck et al., 2007). We provide evidence that rab GAP TBC1D25 is expressed at the sealing zone and the ruffled membrane, and therefore may be involved in regulating the formation of these characteristic structures of the resorbing osteoclast. Inhibiting TBC1D25 decreased bone resorption, at least through osteoclast multinucleation. TBC1D25 could act via the inactivation of certain rabs that remain to be defined. A mechanistic study to define the stage at which TBC1D25 intervenes, the molecular mechanisms and TBC1D25 targets and partners, would be required to appreciate the relative importance of this molecule in osteoclast biology and bone resorption, particularly as TBC1D25 might be involved in other major pathways in osteoclasts such as autophagy and RANKL signal transduction.

Funding statement

S.R. was supported by the Clinician Scientist Fellowship Program of the Department of Medicine, Faculty of Medicine, Sherbrooke University, and the study was granted by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (#RGPIN-2016-03900).

Author contributions

SR devised the study; MR, ES and SB conducted the experiments; SR and MR acquired and analyzed the data, and drafted the paper. All authors reviewed critically the data and revised the manuscript. All authors read and approved the final version.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Supplementary data

This section contains three additional figures. Supplemental material related to this article can be found, in the online version, at doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151145>.

6. References

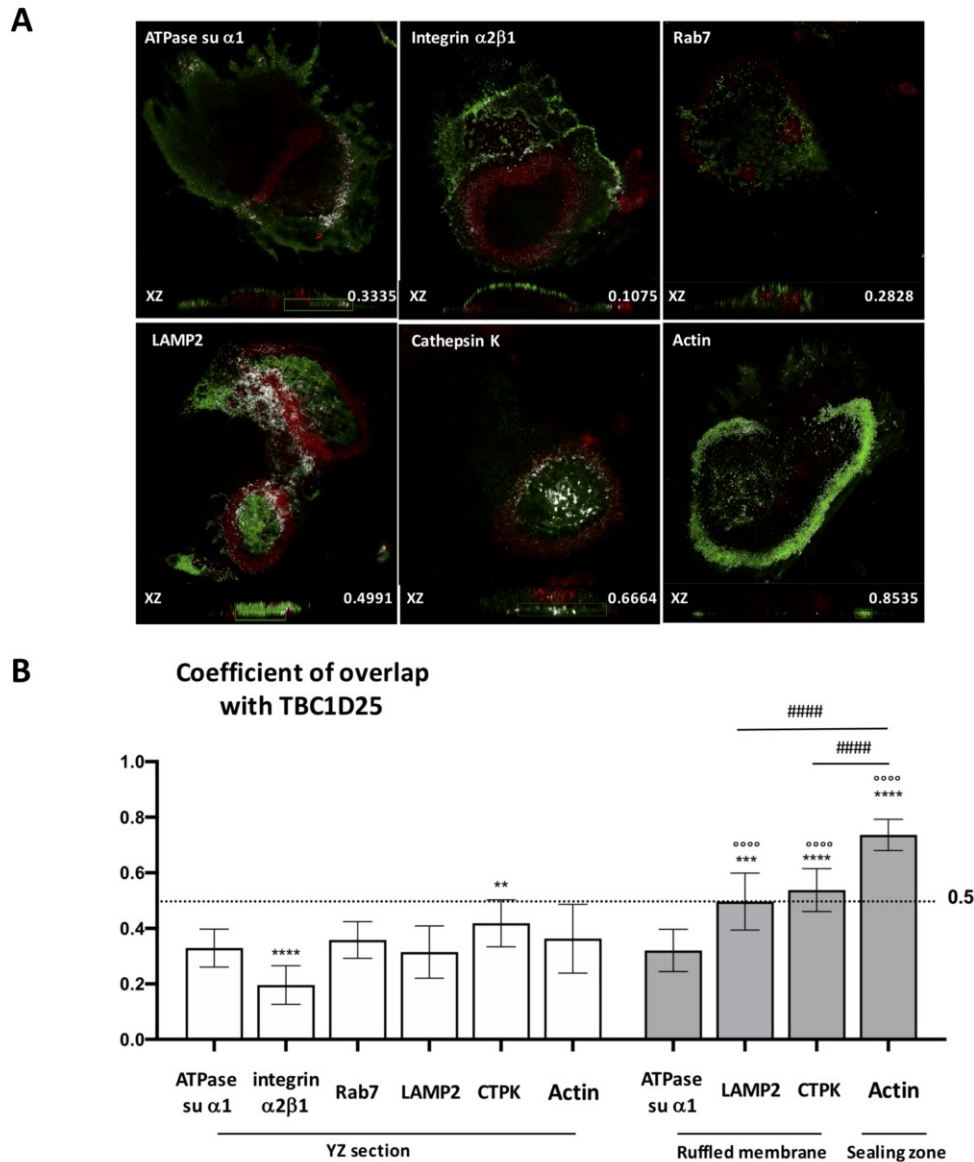
- Albagha, O.M., Visconti, M.R., Alonso, N., Wani, S., Goodman, K., Fraser, W.D., Gennari, L., Merlotti, D., Gianfrancesco, F., Esposito, T., Rendina, D., di Stefano, M., Isaia, G., Brandi, M.L., Giusti, F., Del Pino-Montes, J., Corral-Gudino, L., Gonzalez-Sarmiento, R., Ward, L., Rea, S.L., Ratajczak, T., Walsh, J.P., Ralston, S.H., 2013. Common susceptibility alleles and SQSTM1 mutations predict disease extent and severity in a multinational study of patients with Paget's disease. *J Bone Miner Res* 28, 2338-2346.
- Barth, S., Glick, D., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 221, 117-124.
- Bolte, S., Cordelieres, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224, 213-232.
- Chamoux, E., Couture, J., Bisson, M., Morissette, J., Brown, J.P., Roux, S., 2009. The p62 P392L mutation linked to Paget's disease induces activation of human osteoclasts. *Mol Endocrinol* 23, 1668-1680.
- Chung, P.Y., Van Hul, W., 2012. Paget's Disease of Bone: Evidence for Complex Pathogenetic Interactions. *Semin Arthritis Rheum* 41, 616-641.
- Coxon, F.P., 2012. Fluorescence imaging of osteoclasts using confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 816, 401-424.
- Coxon, F.P., Taylor, A., 2008. Vesicular trafficking in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 19, 424-433.
- Finger, F.P., White, J.G., 2002. Fusion and fission: membrane trafficking in animal cytokinesis. *Cell* 108, 727-730.
- Fong, D., Bisson, M., Laberge, G., McManus, S., Grenier, G., Faucheux, N., Roux, S., 2013. Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro. *Cell Signal* 25, 717-728.
- Galson, D.L., Roodman, G.D., 2014. Pathobiology of Paget's Disease of Bone. *J Bone Metab* 21, 85-98.
- Glantschnig, H., Fisher, J.E., Wesolowski, G., Rodan, G.A., Reszka, A.A., 2003. M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through MTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ* 10, 1165-1177.
- Guo, S., Liu, Y., Gao, L., Xiao, F., Shen, J., Xing, S., Yang, F., Zhang, W., Shi, Q., Li, Y., Zhao, L., 2020. TBC1D25 Regulates Cardiac Remodeling Through TAK1 Signaling Pathway. *Int J Biol Sci* 16, 1335-1348.
- Helfrich, M.H., Nesbitt, S.A., Lakkakorpi, P.T., Barnes, M.J., Bodary, S.C., Shankar, G., Mason, W.T., Mendrick, D.L., Vaananen, H.K., Horton, M.A., 1996. Beta 1 integrins and osteoclast function: involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone* 19, 317-328.
- Herve, J.C., Bourmeyster, N., 2018. Rab GTPases, master controllers of eukaryotic trafficking. *Small GTPases* 9, 1-4.

- Hirvonen, M.J., Mulari, M.T., Buki, K.G., Vihko, P., Harkonen, P.L., Vaananen, H.K., 2012. Rab13 is upregulated during osteoclast differentiation and associates with small vesicles revealing polarized distribution in resorbing cells. *J Histochem Cytochem* 60, 537-549.
- Hussein, O., Tiedemann, K., Murshed, M., Komarova, S.V., 2012. Rapamycin inhibits osteolysis and improves survival in a model of experimental bone metastases. *Cancer Lett* 314, 176-184.
- Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., Fukuda, M., 2011. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J Cell Biol* 192, 839-853.
- Jansen, I.D., Vermeer, J.A., Bloemen, V., Stap, J., Everts, V., 2012. Osteoclast fusion and fission. *Calcif Tissue Int* 90, 515-522.
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., Stamm, S., 2013. Function of alternative splicing. *Gene* 514, 1-30.
- Kim, D.-H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.-S., Choi, S., Rossi, J.J., 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotech* 23, 222-226.
- Klinck, R., Laberge, G., Bisson, M., McManus, S., Michou, L., Brown, J.P., Roux, S., 2014. Alternative splicing in osteoclasts and Paget's disease of bone. *BMC Med Genet* 15, 98.
- Klionsky, D.J., al., e., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1-222.
- Luzio, J.P., Hackmann, Y., Dieckmann, N.M., Griffiths, G.M., 2014. The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016840.
- McManus, S., Bisson, M., Chamberland, R., Roy, M., Nazari, S., Roux, S., 2016. Autophagy and 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 (PDK1)-Related Kinome in Pagetic Osteoclasts. *J Bone Miner Res* 31, 1334-1343.
- Mizukami, J., Takaesu, G., Akatsuka, H., Sakurai, H., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., Sakurai, N., 2002. Receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) activates TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase through a signaling complex containing RANK, TAB2, and TRAF6. *Mol Cell Biol* 22, 992-1000.
- Mulari, M.T., Zhao, H., Lakkakorpi, P.T., Vaananen, H.K., 2003. Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic* 4, 113-125.
- Muller, M.P., Goody, R.S., 2018. Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI. *Small GTPases* 9, 5-21.
- Ory, S., Brazier, H., Pawlak, G., Blangy, A., 2008. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol* 87, 469-477.
- Pavlos, N.J., Ng, P.Y., 2012. "Fusion and fission" unveils remarkable insights into osteoclast plasticity. *Calcif Tissue Int* 91, 157-158; author reply 159.

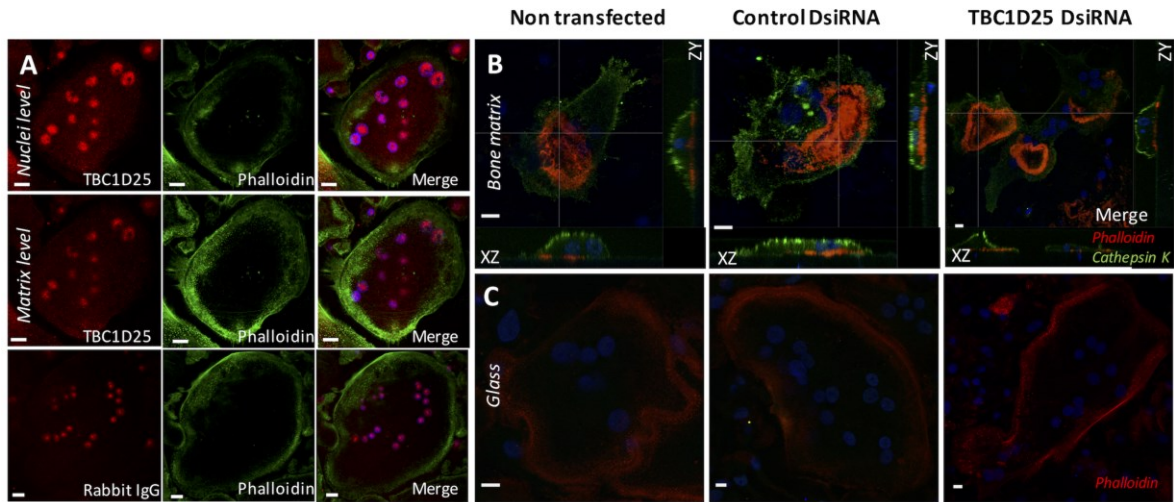
- Piper, K., Boyde, A., Jones, S.J., 1992. The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. *Anat Embryol (Berl)* 186, 291-299.
- Rose, S.D., Kim, D.-H., Amarzguioui, M., Heidel, J.D., Collingwood, M.A., Davis, M.E., Rossi, J.J., Behlke, M.A., 2005. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucl Acids Res* 33, 4140–4156.
- Roy, M., Roux, S., 2018. Rab GTPases in osteoclastic endomembrane systems. *BioMed Research International*, Article ID 4541538.
- Shimada-Sugawara, M., Sakai, E., Okamoto, K., Fukuda, M., Izumi, T., Yoshida, N., Tsukuba, T., 2015. Rab27A regulates transport of cell surface receptors modulating multinucleation and lysosome-related organelles in osteoclasts. *Sci Rep* 5, 9620.
- Smurova, K., Podbilewicz, B., 2016. RAB-5- and DYNAMIN-1-Mediated Endocytosis of EFF-1 Fusogen Controls Cell-Cell Fusion. *Cell Rep* 14, 1517-1527.
- Soe, K., Delaisse, J.M., 2017. Time-lapse reveals that osteoclasts can move across the bone surface while resorbing. *J Cell Sci* 130, 2026-2035.
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-525.
- Sugatani, T., Hruska, K.A., 2005. Akt1/Akt2 and mammalian target of rapamycin/Bim play critical roles in osteoclast differentiation and survival, respectively, whereas Akt is dispensable for cell survival in isolated osteoclast precursors. *J Biol Chem* 280, 3583-3589.
- Sun, Y., Buki, K.G., Ettala, O., Vaaraniemi, J.P., Vaananen, H.K., 2005. Possible role of direct Rac1-Rab7 interaction in ruffled border formation of osteoclasts. *J Biol Chem* 280, 32356-32361.
- Swarnkar, G., Chen, T.H., Arra, M., Nasir, A.M., Mbalaviele, G., Abu-Amer, Y., 2017. NUMBL Interacts with TAK1, TRAF6 and NEMO to Negatively Regulate NF-kappaB Signaling During Osteoclastogenesis. *Sci Rep* 7, 12600.
- Vallet, M., Soares, D.C., Wani, S., Sophocleous, A., Warner, J., Salter, D.M., Ralston, S.H., Albagha, O.M., 2015. Targeted sequencing of the Paget's disease associated 14q32 locus identifies several missense coding variants in RIN3 that predispose to Paget's disease of bone. *Hum Mol Genet* 24, 3286-3295.
- Van Wesenbeeck, L., Odgren, P.R., Coxon, F.P., Frattini, A., Moens, P., Perdu, B., MacKay, C.A., Van Hul, E., Timmermans, J.P., Vanhoenacker, F., Jacobs, R., Peruzzi, B., Teti, A., Helfrich, M.H., Rogers, M.J., Villa, A., Van Hul, W., 2007. Involvement of PLEKHM1 in osteoclastic vesicular transport and osteopetrosis in incisors absent rats and humans. *J Clin Invest* 117, 919-930.
- Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., Penninger, J.M., 2006. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12, 17-25.

Zhao, H., Ettala, O., Vaananen, H.K., 2002. Intracellular membrane trafficking pathways in bone-resorbing osteoclasts revealed by cloning and subcellular localization studies of small GTP-binding rab proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1060-1065.

7. Supplementary data

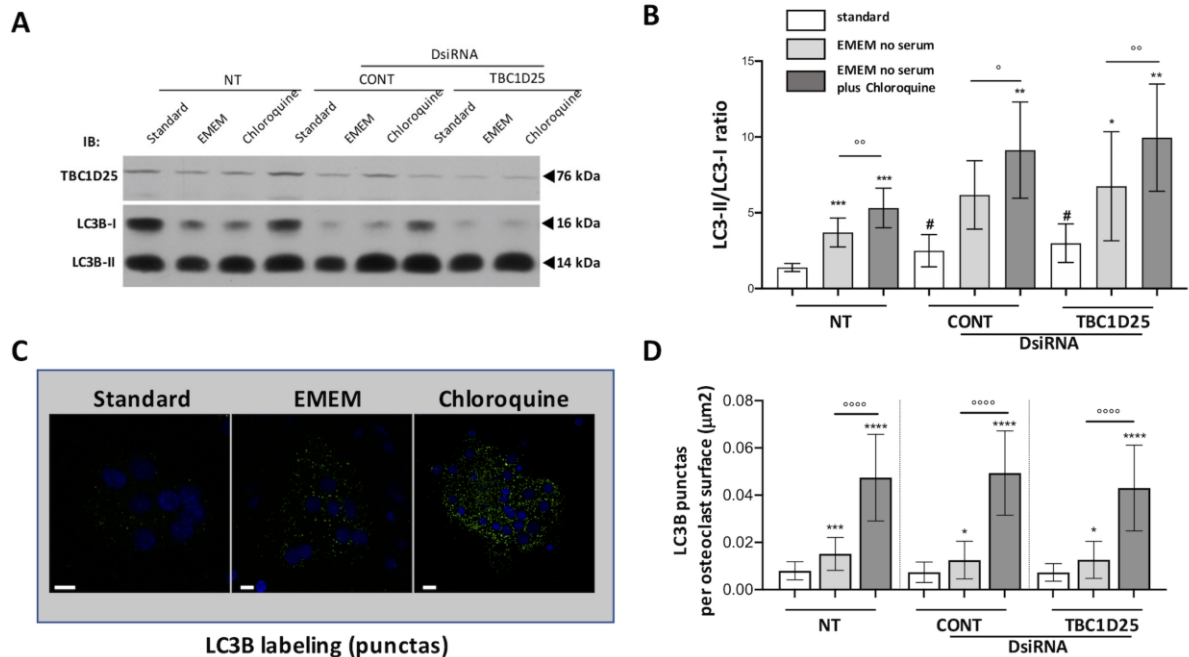
**Supplemental Figure 1: Immunofluorescence staining and colocalization.**

Human osteoclasts cultured on bone slices were double-stained using antibodies directed against TBC1D25 (red) and antibodies against integrin $\alpha 2\beta 1$, V-ATPASE subunit $\alpha 1$, RAB7, LAMP2, and cathepsin K, as well as a fluorescent phalloidin conjugate to detect actin (green). **S1-A: Representative images** of optical Z section and orthogonal XZ are shown. The overlap coefficient (Leica LASX software) is indicated in XZ section or in the region of interest (ROI) (boxed area). **S1-B: The extent of colocalization of TBC1D25** with each protein was computed. Results are expressed as the overlap coefficient in the XZ section overall or within ROI (if reinforcement detected), computed from 15-20 multinucleated cells per condition from 3 independent experiments. Values are given as mean \pm SD; significant differences of colocalization between groups were analyzed by one-way ANOVA; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (vs. ATPASE $\alpha 1$, same view), **** $p < 0.0001$ (XZ overall vs ROI, same protein); ##### $p < 0.0001$ as indicated (overlap coefficient ≥ 0.5).



Supplemental Figure 2: TBC1D25 and F-actin ring.

Human osteoclasts were cultured on bone slices or glass. Images are representative of 2 independent experiments (scale bar 10 μm). **S1-A: TBC1D25 expression in non-resorbing osteoclasts:** At the end of osteoclast cultures on glass, immunofluorescence double-staining was performed using antibodies against TBC1D25 (red) and phalloidin-633 (green) and counterstained with DAPI. Optical sections at nuclei level and matrix level (glass) are shown. **S1-B: Impact of knocking-down TBC1D25 on actin-ring:** At the end of osteoclast cultures bone slices, immunofluorescence double-staining was performed with phalloidin-633 (red) and antibodies against cathepsin K (green) in osteoclasts transfected at D17 with control or TBC1D25 DsiRNA or left untreated. Orthogonal views are shown (xz and zy sections). **S1-C: Impact of knocking-down TBC1D25:** An actin-staining was also performed in osteoclasts grown on glass.



Supplemental Figure 3: Evaluation of autophagy flux in mature osteoclasts after TBC1D25 down regulation.

CBMs were cultured for 21 days in the presence of MCSF and RANKL. After 17 days, mature osteoclasts were transfected with a negative control DsiRNA (CONT), with TBC1D25 DsiRNA or left untransfected (NT). At the end of the osteoclast cultures the cells were either subjected to starvation by incubating in EMEM without serum for 3 h to induce autophagy and plus chloroquine or not (40 μ M), or were left untreated in standard medium for the same period. **S2-A:** A representative immunoblot is shown. **S2-B:** ODs were measured with ImageJ software. The LC3B-II/LC3B-I ratios were calculated based on densitometry analysis of both bands (mean \pm SD); (n = 7 experiments). **S2-C: Immunofluorescence (IF)-** The IF study was performed using antibodies directed against LC3B. Representative photographs of LC3B punctas are shown in non-transfected cells (scale bar 10 μ m). **S2-D: Average number of puncta per surface unit (LC3B)-** An automated quantification of the number of LC3B punctas per osteoclast surface unit was performed. MNCs with 3 or more nuclei which represent osteoclasts were evaluated. The graph represents the data obtained from an average of 35 osteoclasts per condition (mean \pm SD) evaluated in 3 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. standard medium, same condition (NT, DsiRNA control or DsiRNA TBC1D25); #p<0.05 vs. standard medium, untransfected; °p<0.05, °°p<0.01, °°°p<0.0001 EMEM vs. EMEM plus chloroquine.

CHAPITRE 3 : ARTICLE 2

Galectin-8 modulates human osteoclast activity and autophagy partly through isoform-specific interactions

Michèle Roy¹, Léopold Mbous Nguimbus¹, Papa Yaya Badiane¹, Victor Goguen-Couture¹, Jade Degrandmaison¹, Jean-Luc Parent¹, Marie A. Brunet², Sophie Roux¹.

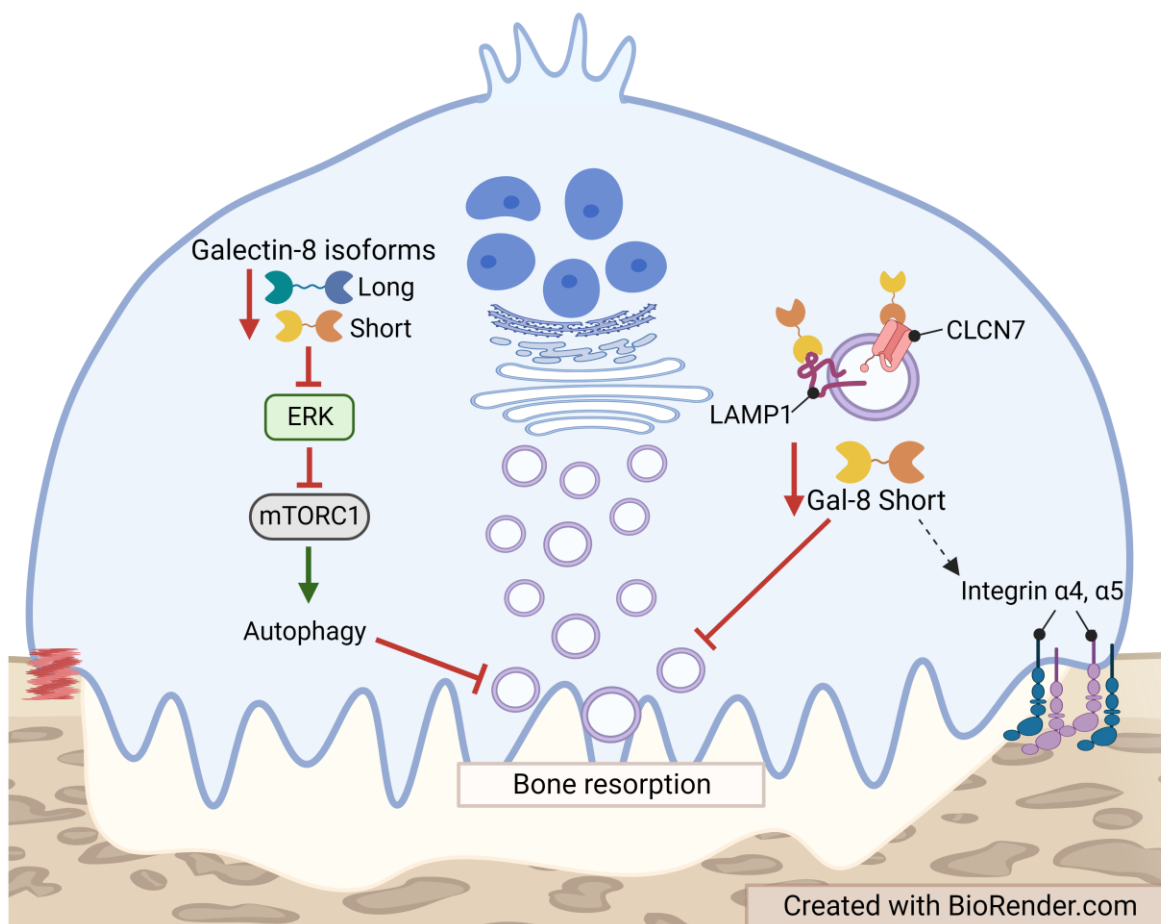
¹Division of Rheumatology, Department of Medicine, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke ²Department of Biochemistry and Functional Genomics, Faculty of Medicine and Health Sciences, University of Sherbrooke

Statut de l'article

En révision pour le journal Life Science Alliance en date du 13 octobre 2023

Avant-propos

J'ai réalisé ces travaux de recherche sous la direction de Dre Sophie Roux. J'ai effectué la conceptualisation, la mise au point et les expériences *in vitro* reliées à l'évaluation de l'expression et de la fonction de la galectine-8 dans les ostéoclastes humains. Les expériences *in vitro* ont été effectuées en collaboration avec Papa Yaya Badiane et Victor Goguen-Couture, qui était sous ma supervision immédiate lors de leur contribution. Avec l'aide et l'expertise de Jade Degrandmaison, j'ai fait la conception de l'approche expérimentale et des plasmides utilisés pour l'élaboration de l'interactome des isoformes de la galectine-8 à l'aide de la protéomique. En collaboration avec ma directrice de recherche, j'ai fait l'acquisition et l'interprétation des données ainsi que la création des figures, la rédaction et la révision du manuscrit.



Résumé graphique - Graphical abstract 1

- Dans les ostéoclastes humains, l'expression réduite de la galectine-8 inhibe la résorption osseuse et la nucléarité, en plus d'induire l'autophagie. L'isoforme courte a un effet sur la résorption osseuse qui implique des partenaires d'interaction spécifiques tels que des protéines d'adhésion cellulaire et des protéines lysosomales. La galectine-8 est un facteur important dans la maturation terminale des ostéoclastes.

- In human osteoclasts, reduced galectin-8 expression inhibits bone resorption and osteoclast nuclearity, and induces autophagy. The short isoform has an impact on bone resorption and involves specific interactors such as cell adhesion proteins and lysosomal proteins. Galectin-8 is an important factor in the terminal maturation of osteoclasts.

Résumé

Chez les ostéoclastes humains hyperactifs, nous avons précédemment identifié un événement d'épissage alternatif dans *LGALS8*, codant pour la galectine-8, entraînant une diminution de l'expression de l'isoforme longue. La galectine-8, qui module les interactions cellule-matrice et fonctionne de manière intracellulaire comme un récepteur de reconnaissance de danger, n'a jamais été associée à la biologie des ostéoclastes. Cette étude visait donc à étudier l'expression différentielle et les fonctions des isoformes de la galectine-8 dans les ostéoclastes humains et à identifier leurs partenaires d'interaction. L'inhibition de l'expression de la galectine-8 a révélé ses rôles dans la résorption osseuse, la nucléarité des ostéoclastes et la régulation de la signalisation de MTORC1. Des expériences d'inhibition spécifique des isoformes ont montré un rôle prédominant pour l'isoforme courte dans la résorption osseuse. De plus, une analyse protéomique par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) des isoformes de galectine-8 réalisée dans les cellules HEK293T a identifié 22 partenaires d'interaction partagés par les deux isoformes. De plus, neuf partenaires d'interaction étaient spécifiques à l'isoforme courte, aucun n'était unique à l'isoforme longue. Les interacteurs spécifiques de l'isoforme courte de la galectine-8 comprenaient des protéines d'adhésion cellulaire (ITGA4, ITGA5, TPBG), des protéines lysosomales (LAMP1, SCL17A5) et des récepteurs membranaires (M6PR, PTGFRN). La structure tertiaire de chaque isoforme générée par AlphaFold2 suggère un encombrement stérique de l'isoforme longue avec certains sites de liaison. Enfin, nous avons confirmé les interactions de la galectine-8 avec CLCN3, CLCN7, LAMP1 et LAMP2, toutes connues pour localiser aux vésicules de sécrétion chez les ostéoclastes humains. Dans l'ensemble, notre étude révèle des rôles directs de la galectine-8 dans la multinucléation et l'activité des ostéoclastes, y compris des fonctions spécifiques dans le trafic des lysosomes sécrétoires impliqués dans la résorption osseuse, principalement attribuables à l'isoforme courte.

Mots clés: Galectin-8; Isoformes; Ostéoclastes humains; Résorption osseuse; MTORC1; Autophagie; Protéomique; CLCN3; CLCN7; LAMP1; LAMP2

Abstract

In overactive human osteoclasts, we previously identified an alternative splicing event in *LGALS8*, encoding galectin-8, resulting in decreased expression of the long isoform. Galectin-8, which modulates cell-matrix interactions, and functions intracellularly as a danger recognition receptor, has never been associated with osteoclast biology. This study therefore aimed to investigate the differential expression and functions of galectin-8 isoforms in human osteoclasts and identify their interacting partners. Inhibition of galectin-8 expression revealed its roles in bone resorption, osteoclast nuclearity, and MTORC1 signaling regulation. Galectin-8 isoform-specific inhibition experiments asserted a predominant role for the short isoform in bone resorption. Moreover, a liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) proteomic analysis of galectin-8 isoforms performed in HEK293T cells identified 22 interacting partners shared by both isoforms. Meanwhile, nine interacting partners were specific for the short isoform, none were unique to the long isoform. Interactors specific for the galectin-8 short isoform included cell adhesion proteins (ITGA4, ITGA5, TPBG), lysosomal proteins (LAMP1, SCL17A5), and membrane receptors (M6PR, PTGFRN). The tertiary structure of each isoform generated by AlphaFold2 suggested spatial interference of the long isoform with some binding sites. Finally, we confirmed the interactions of galectin-8 with CLCN3, CLCN7, LAMP1, and LAMP2, all known to localize to secretory vesicles, in human osteoclasts. Altogether, our study reveals direct roles of galectin-8 in multinucleation and osteoclast activity, including specific functions in secretory vesicle trafficking involved in bone resorption, mostly attributable to the short isoform.

Keywords: Galectin-8; Spliced isoforms; Human osteoclasts; Bone resorption; MTORC1; Autophagy; Proteomics; CLCN3; CLCN7; LAMP1; LAMP2.

1. Introduction

Osteoclasts, large multinucleated cells formed by the fusion of precursors of the monocyte-macrophage lineage, are the only cells responsible for bone resorption. (Boyle, Simonet et al., 2003) In Paget's disease of bone (PDB) characterized by excessive and chaotic bone remodeling, osteoclasts are highly resorptive, and their phenotype includes PDK1/AKT1-dependent MTORC1 activation, apoptosis resistance, and defective autophagy. (McManus, Bisson et al., 2016) In a previous study, we identified six alternative splicing (AS) events associated with the pagetic phenotype in peripheral blood mononuclear cells (PBMC)-derived osteoclasts. Among them, the AS of *LGALS8*, which encodes for galectin-8, was associated with decreased expression of the long isoform, even though total galectin-8 expression was increased in PDB osteoclasts compared to control osteoclasts. (Klinck, Laberge et al., 2014)

Although several galectins repress osteoclastogenesis and osteoclast function, including galectin-1 and galectin-9 (Moriyama, Kukita et al., 2014, Muller, Duray et al., 2019), most osteoclast data are related to galectin-3 in mice. Global galectin-3 knockout mice exhibit increased bone resorption, consistent with the suppressive effect of recombinant galectin-3 on osteoclastogenesis. (Li, Kukita et al., 2009, Simon, Derer et al., 2017) The expression and role of galectin-8 in osteoclasts remain unknown, although it was demonstrated to promote bone resorption in mice indirectly through the production of RANKL by galectin-8-stimulated osteoblasts. (Vinik, Shatz-Azoulay et al., 2018, Vinik, Shatz-Azoulay et al., 2015) Like all galectins, galectin-8 binds to β -galactoside and interacts with membrane glycoproteins and glycolipids, but additionally binds to cytosolic and nuclear noncarbohydrate ligands. (Johannes, Jacob et al., 2018) The best characterized functions of galectin-8 are performed extracellularly, where it binds glycans to modulate cell-matrix interactions and trigger β 1 integrin-mediated signaling cascades and cytoskeletal organization. (Elola, Ferragut et al., 2014, Johannes et al., 2018) Galectin-8 has been implicated in cell spreading (Carcamo, Pardo et al., 2006, Levy, Auslender et al., 2006), as well as in the modulation of both innate and adaptive immune responses (Tribulatti, Carabelli et al., 2020), and neutrophil functions (Nishi, Shoji et al., 2003). In addition to its involvement in the activation of dendritic cells and antigen-specific costimulation (Carabelli, Prato et al., 2018, Carabelli, Quattrocchi et al., 2017), galectin-8 also appears to be a potent proapoptotic agent in T cells and inflammatory cells (Eshkar Sebban, Ronen et al., 2007, Norambuena, Metz et al., 2009). The functions of intracellular galectin-8 are not well known; however, cytosolic galectin-8 acts as a danger recognition receptor. Whereas the cytosol is devoid of complex carbohydrates under physiological conditions (Helenius & Aebi, 2001), damaged

cytoplasmic vesicles, regardless of whether they are related to pathogens, expose sugars that recruit galectin-8, which appears to be a critical component for activating selective autophagy. (Huang & Brumell, 2012, Thurston, Wandel et al., 2012) By recruiting the adaptor NDP52, bound galectin-8 targets damaged vesicles for intracellular trafficking to autophagosomes in a ubiquitin-independent manner. (Thurston et al., 2012) Galectin-8 also acts as an escort protein for KRAS4B and participates in the regulation of its downstream signaling, enabling KRAS4B to localize to vesicles and promote ERK1/2 signaling. (Meinohl, Barnard et al., 2019) Galectin-8 could also be involved in the trafficking of proteins other than GTPases, as it enables the apical localization of podocalyxin in renal epithelial cells. (Lim, Yu et al., 2017)

LGALS8 AS leads to the formation of distinct splice variants encoding two validated isoforms that share identical carbohydrate recognition domains (CRDs, N-terminal and C-terminal) and differ only in their linker region (insertion of 9 and 42 amino acids in the linker peptide of mouse and human galectin-8, respectively). The length and structure of the linker domain might alter the galectin-8/NDP52 interaction (Kim, Hong et al., 2013) and influence its biological function. (Levy et al., 2006, Zhang, Moussodia et al., 2015) Moreover, human galectin-8 with the longest linker peptide is highly susceptible to thrombin cleavage, whereas the other isoform is resistant. (Nishi, Itoh et al., 2006) Considering that *LGALS8* AS has been associated with a hyperactive osteoclast phenotype and is involved in pathways known to be critical in osteoclasts, such as autophagy, and adhesion, our study aimed to assess the direct impact of galectin-8 and its isoforms on osteoclast phenotypes and identify interaction partners for each isoform to better understand the differential role of galectin-8 variants in these cells.

2. Results

Temporal expression and localization of galectin-8 in human osteoclasts

The presence of AS events in *LGALS8* led to the first evidence of galectin-8 expression by human osteoclasts (Klinck et al., 2014), although its expression and localization have not been thoroughly evaluated. Using a specific galectin-8 antibody recognizing both isoforms (Fig. 1A), we therefore assessed galectin-8 by immunoblotting at different time points during osteoclast differentiation in long-term cultures (Fig. 1B). Total galectin-8 expression increased over time, reaching a plateau after

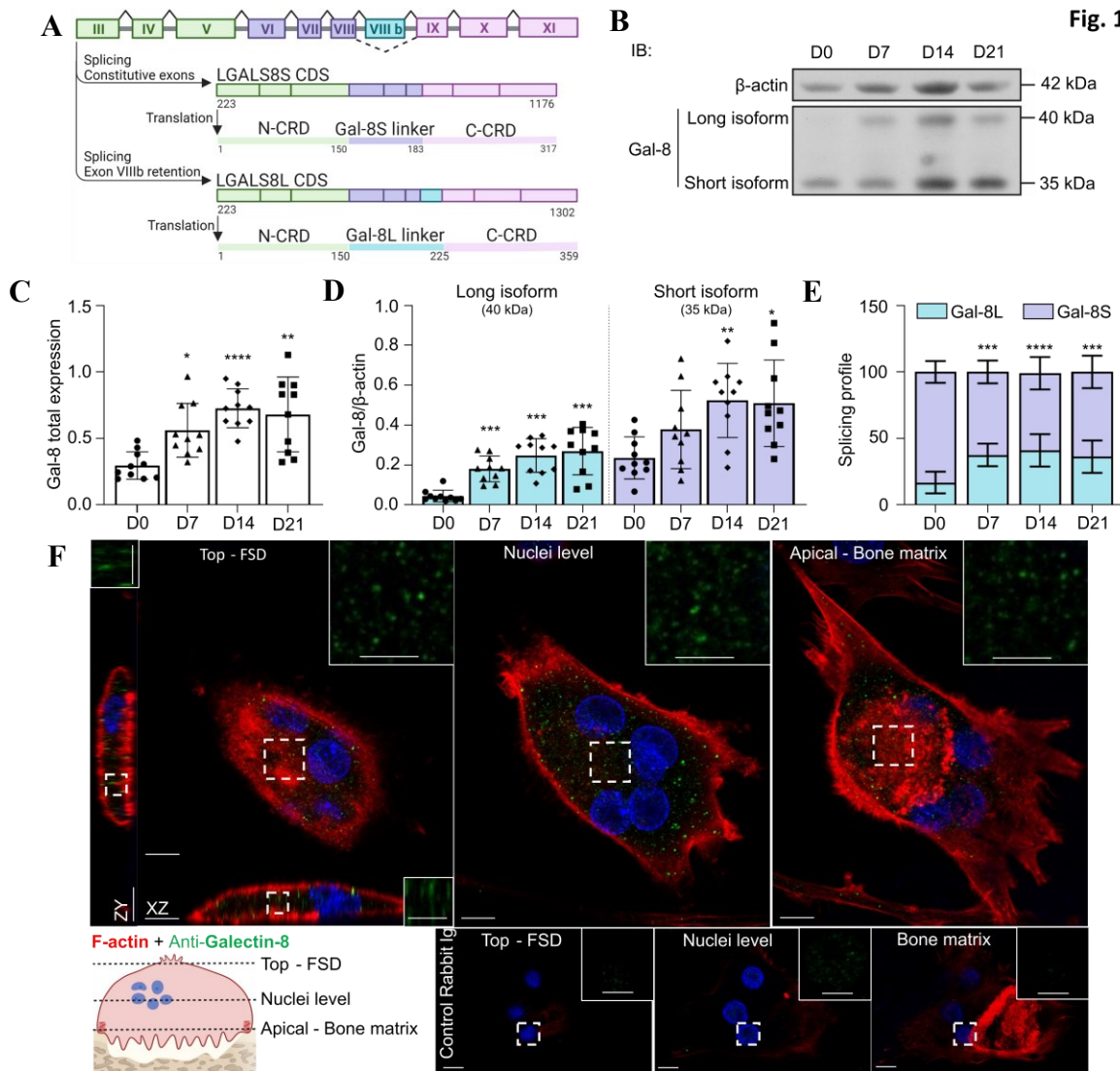


Figure 1: Expression of galectin-8 and its isoforms in human osteoclasts.

Osteoclasts were generated in long-term CBM cultures. (A) Alternative splicing of the human *LGALS8* gene. Diagram showing the position of exon VIIIb (blue), spliced in the short isoform (LGALS8S) and retained in the long isoform (LGALS8L) (42 aa longer peptide linker). Coding sequence (CDS) and primary structure of galectin-8 isoforms are presented. (B) Time-dependent expression of galectin-8 during differentiation. Protein lysates were obtained after monocyte isolation (D0) or after cells were cultured for 7 (D7), 14 (D14) or 21 (D21) days and analyzed by immunoblotting using antibodies recognizing both galectin-8 isoforms (long isoform: 40 kDa; short isoform: 35 kDa) or β -actin. (C) Galectin-8 expression (immunoblotting quantification). Optical density was measured using ImageJ software. The relative expression of total galectin-8 (long + short) over β -actin is presented. (D) Galectin-8 isoforms (immunoblotting quantification). The graph represents the relative expression of galectin-8 long and short isoforms over β -actin. (E) The splicing profile was determined using the protein ratio of the long isoform to total galectin-8. All results are expressed as the mean \pm SD (N = 10 independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. D0). (F) Galectin-8 expression in osteoclasts (immunofluorescence). Osteoclasts cultured on bone slices were double-stained using phalloidin (red) and antibodies directed against galectin-8 (green) and counterstained with DAPI (blue). Optical Z-sections of whole MNCs were obtained. Optical Z-sections of the top (FSD), nuclear, and bone matrix levels of an osteoclast are presented with its orthogonal reconstructions (scale bar = 10 μ M) as well as magnification representing galectin-8 staining (scale bar = 5 μ M). Optical Z-sections of the negative control (rabbit Ig) at the three levels of cells are presented (scale bar = 10 μ M). Images are representative of three independent experiments with 10 acquired images per experiment.

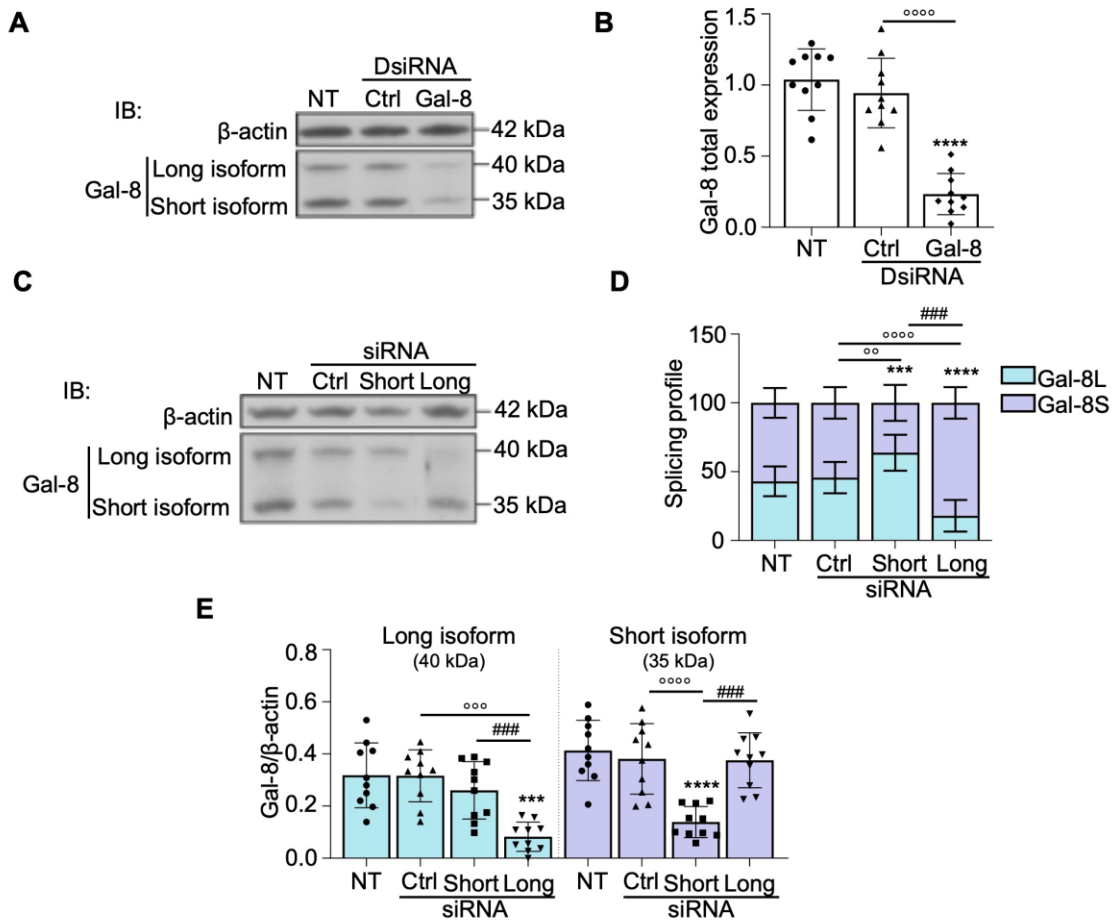


Figure 2: Modulation of galectin-8 expression using siRNAs

Modulation of galectin-8 expression using siRNAs. (A) Inhibition of galectin-8 global expression (immunoblotting). Cells were either transfected at D17 with negative control DsiRNA (Ctrl) or galectin-8 DsiRNA sequences (Gal-8) or not transfected (NT) at D17. Protein lysates were collected on D21 and analyzed by immunoblotting using antibodies recognizing both galectin-8 isoforms (long isoform: 40 kDa; short isoform: 35 kDa) or β -actin. (B) Galectin-8 expression (immunoblotting quantification). Optical density was measured using ImageJ software. The relative expression of galectin-8 (long + short) versus β -actin is shown. (C) Inhibition of specific galectin-8 isoforms (immunoblotting). Galectin-8 expression was downregulated using isoform-specific siRNAs directed against the short or long isoform at D17. Protein lysates were obtained on D21 from cultures that were either not transfected (NT) or transfected with negative control siRNA (Ctrl) or isoform-specific siRNA and analyzed by immunoblotting using antibodies against galectin-8 and β -actin. Galectin-8 isoform expression was quantified using ImageJ software to measure optical density. The graphs present (D) the splicing profile of the long and short isoforms to total galectin-8, and (E) the protein ratio of the galectin-8 long (40 kDa) and short isoforms (35 kDa) to β -actin. Boxplots: All results are expressed as the mean \pm SD (N = 10 independent experiments; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 vs. NT; $^{\circ}$ p < 0.05, $^{\circ\circ}$ p < 0.01, $^{\circ\circ\circ}$ p < 0.001, $^{\circ\circ\circ\circ}$ p < 0.0001 vs. Cont DsiRNA; ###p < 0.01, ####p < 0.001, #####p < 0.0001 Short vs. Long).

galectin-8 (Fig. 1C,D). Although galectin-8 short isoform represented the predominant isoform expressed throughout the 21 days of culture, a significant change in the isoform ratio was observed

from day seven (D7) (Fig. 1E). Moreover, by immunofluorescence analysis, we observed a dot-like cytoplasmic staining pattern of galectin-8 from the top (functional secretory domain (FSD)) to the apical domain and within the sealing zone defined by F-actin, which delimits the ruffled membrane in active osteoclasts seeded on bone slices (Fig. 1F).

Inhibiting galectin-8 using small interfering RNA (siRNA)

To explore the effect of galectin-8 on the multinuclearity of late-differentiating osteoclasts (D17) and bone resorption, siRNAs were used to reduce its expression globally or in an isoform-specific manner. Transfection of Dicer-substrate siRNA (DsiRNA) sequences targeting human *LGALS8* resulted in a 75% decrease in its expression (Fig. 2A,B). To specifically downregulate each isoform, osteoclast cultures were then transfected with siRNAs targeting either the short or the long isoform (Fig. 2C). When transfecting the long isoform-specific siRNA, expression of galectin-8 long isoform was decreased by approximately 74% versus the control. Meanwhile, siRNA specific for the short isoform decreased its expression by an average of 64%, with resulting changes in the isoform ratio of 20%-25% (Fig. 2D, E).

Inhibiting galectin-8 expression in osteoclasts decreases in vitro nuclearity and bone resorption

In osteoclast cultures transfected in the late stages of osteoclast maturation (D17), we observed significant decreases in the number of multinucleated cells (MNCs, -40%) and number of nuclei per MNC when galectin-8 expression was decreased compared to the findings in control cultures (Fig. 3A,C). MNCs were divided into three groups according to the number of nuclei: low (3-5), medium (6-10), and high (≥ 11). We found a significant decrease in the proportion of high-nucleated MNCs in the presence of galectin-8 DsiRNAs compared to the samples treated with a control DsiRNA, whereas the proportion of MNCs with medium and low nucleus numbers was increased (Fig. 3D). Specific inhibition of the galectin-8 long isoform did not affect the number of MNCs, but targeting the short isoform induced a significant decrease in the number of MNCs (-22%) versus the control (Fig. 3E,F). Although a slight decrease in the number of nuclei per MNC was observed in all transfected cells, this decrease was only significant upon inhibition of the short isoform compared to the control (Fig. 3G). No significant changes were observed in the proportions of low-, medium-, and high-nucleated cells across transfected cells, although a trend toward fewer high-nucleated MNCs was observed with both siRNAs (Fig. 3H). When osteoclasts were cultured on bone slices, inhibition of galectin-8 expression resulted in significant reductions in the resorbed bone area (-78%) and resorption area per MNC (-63%) compared to negative control and untransfected

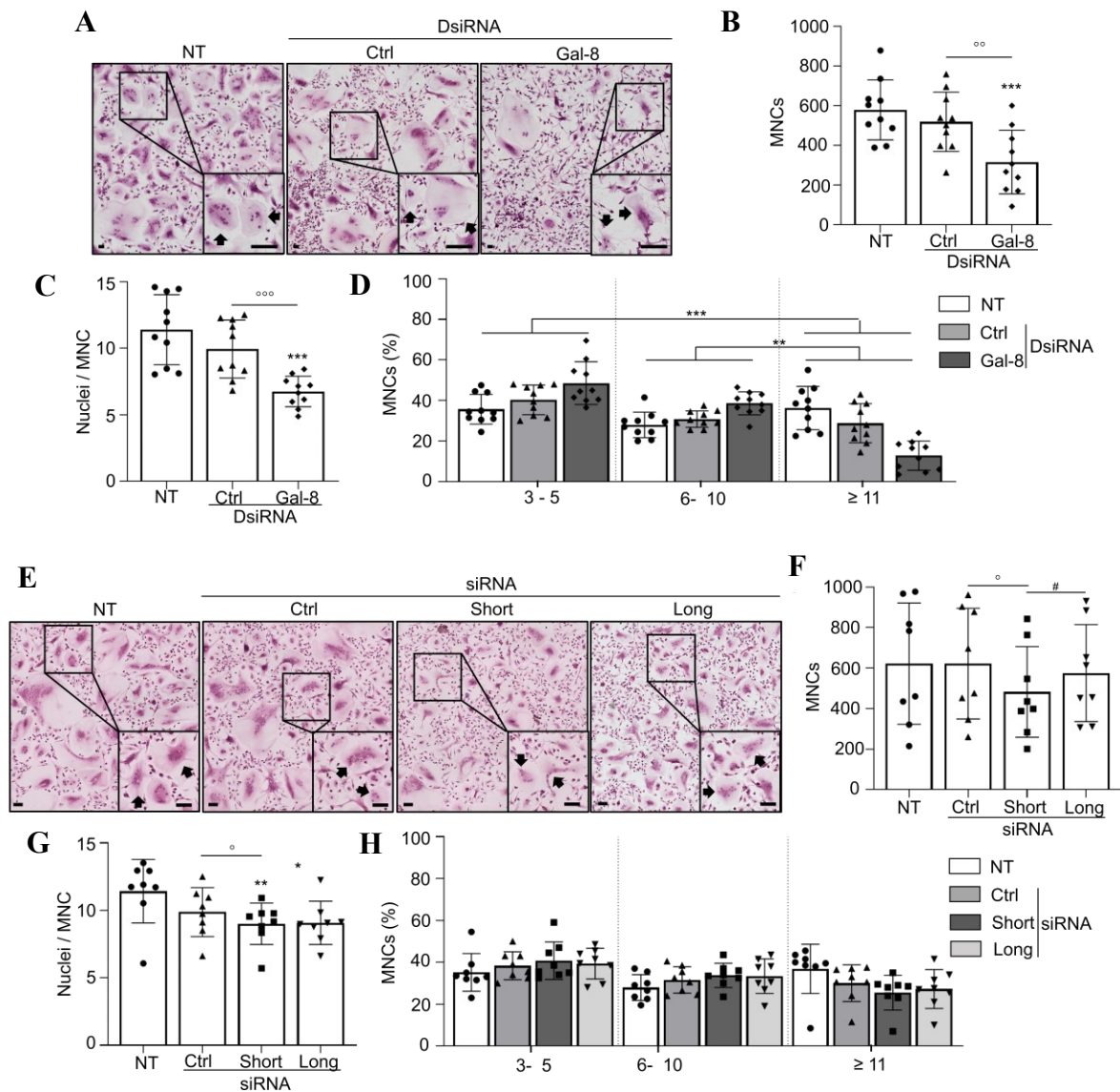


Figure 3: MNC formation and galectin-8 inhibition.

(A) Inhibition of galectin-8 global expression. CBM cultures were transfected with negative control DsiRNA (Ctrl) or galectin-8 DsiRNAs (Gal-8) or not transfected (NT) on D17. On D21, the cells were stained with hematoxylin and 0.25% eosin. Images were acquired using a Zeiss ApoTome 2 microscope. Representative images of MNCs in culture are shown (scale bar = 0.5 mm). (B) The total number of MNCs (cells containing three or more nuclei) was evaluated. Results are expressed graphically as the number of MNCs per well (surface area: 0.4 cm²). (C) Nuclei were counted in 100 MNCs per well. The results are graphically expressed as nuclei per MNC. (D) Percentages of MNCs with 3-5, 6-10, and ≥11 nuclei are presented on a graph representing the contingency table; Chi-square test was used to evaluate differences. (E) Effect of galectin-8 isoform-specific inhibition. On D17, the cells were transfected with isoform-specific siRNA directed against the short or long isoform or control siRNA (Ctrl) or not transfected (NT). Representative images of MNCs in culture are shown (scale bar = 0.5 mm). (F) Results are expressed graphically as the number of MNCs per well (surface area: 0.4 cm²). (G) The number of nuclei per MNC was counted in 100 MNCs per well (nuclei/MNC). (H) The graph presents the percentages of MNCs with 3-5, 6-10, or ≥11 nuclei. All results are expressed as the mean ± SD (N = 8-10 independent experiments, two images per experimental condition). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 vs. NT; ^op < 0.05, ^{oo}p < 0.01, ^{ooo}p < 0.001 vs. Ctrl).

osteoclasts (Fig. 4A,B). Upon specific inhibition of either galectin-8 isoform, siRNA directed against the long isoform did not induce a significant change in the resorbed area, whereas short isoform-specific siRNA transfection significantly decreased the resorbed area (~39%) compared to the findings for control siRNA, leading to a 26% decrease in the bone area per MNC (Fig. 4C,D). Thus, inhibition of galectin-8 expression decreased the number of MNCs and bone resorption activity of osteoclasts, which could be mainly related to the function of the short isoform. Meanwhile, nuclearity did not appear to be isoform-specific.

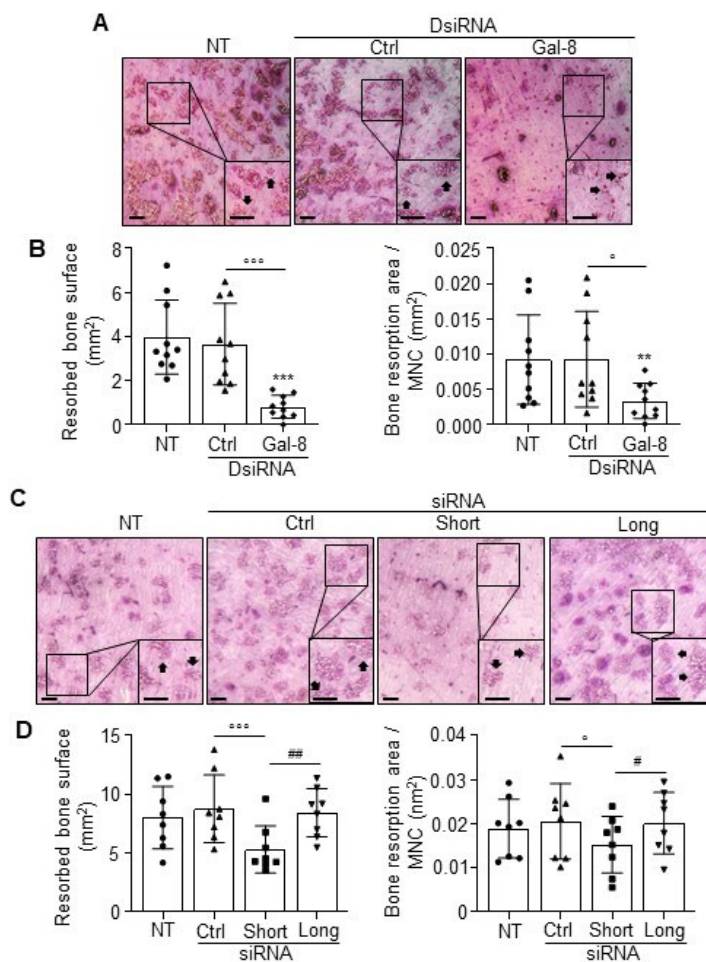


Figure 4: Osteoclast bone resorption and galectin-8 inhibition.

(A) Inhibition of galectin-8 global expression. CBMs were seeded and cultured on bovine bone slices. On D17, CBM cultures were transfected with negative control DsiRNA (Ctrl) or galectin-8 DsiRNA (Gal-8) or not transfected (NT). At the end of culture, bone slices were stained with toluidine blue, and bone resorption was assessed using optical light microscopy. Representative images illustrating bone resorption are shown (scale bar = 0.5 mm). (B) Resorbed bone area (mm²) was measured using ImageJ software, and bone resorption per MNC was then calculated. (C) Effect of galectin-8 isoform-specific inhibition. On D17, the cells were transfected with isoform-specific siRNAs directed against the short or long isoform or control siRNA (Ctrl) or not transfected. Representative images illustrating bone resorption are shown (scale bar = 0.5 mm). (D) Resorbed bone area (mm²) and bone resorption per MNC were assessed. All results are expressed as the mean \pm SD (N = 8-10 independent experiments, two bone slices per experimental condition). ^op<0.05, ^{ooo}p<0.001 vs. Ctrl: #p<0.05, ##p<0.01 short isoform siRNA vs. long isoform siRNA).

Galectin-8 inhibition in osteoclasts induces autophagy through MTORC1 signaling

Some functions of intracellular galectin-8 are closely associated with autophagy and MTORC1 signaling (Jia, Abudu et al., 2018), a crucial pathway in osteoclasts. Indeed, stimulation of autophagy in osteoclasts blocks bone differentiation and resorption (Hussein, Tiedemann et al., 2012), and PDK1-dependent MTOR hyperactivation with a defect in autophagy has been reported in pagetic overactive osteoclasts (McManus et al., 2016). We therefore evaluated osteoclast autophagy in the presence or absence of galectin-8 inhibition.

The global impact of galectin-8 inhibition on autophagy was first evaluated according to the expression of LC3B-II, a LC3–phosphatidylethanolamine conjugate, which is correlated with increased levels of autophagic vesicles. (Barth, Glick et al., 2010) The LC3B-II/LC3B-I ratio was higher in galectin-8 DsiRNA-transfected cells than in control DsiRNA-transfected cells, indicating that inhibiting galectin-8 expression increased basal autophagy in osteoclasts (Fig. 5A,B). AMPK α , the phosphorylation of which was increased upon galectin-8 downregulation, positively regulates autophagy via the inhibition of MTORC1 activity. As an upstream regulatory kinase of RPTOR that inhibits MTORC1 complex signaling (Gwinn, Shackelford et al., 2008), AMPK α activation might account for the increase in RPTOR phosphorylation at Ser⁷⁹² (Fig. 5C). MTORC1 activation was evaluated through the phosphorylation of its targets 4EBP1 at T³⁶/T⁴⁶ and serine/threonine kinase p70 S6K at T²²⁹, as well as the phosphorylation of ULK1 at Ser⁷⁵⁷, which prevents ULK1 activation, and autophagy induction. (Hara, Maruki et al., 2002) ULK1, 4EBP1, and p70 S6K phosphorylation was significantly lower in osteoclasts transfected with galectin-8 DsiRNAs than in control DsiRNA-transfected or untransfected cells, suggesting a dampening of MTORC1 signaling to mediate autophagy activation (Fig. 5D). Finally, the expression of activated/phosphorylated forms of AKT1, ERK1/2, and PDK1 was assessed as upstream stimulators of MTORC1. Phosphorylation of AKT1 at Thr³⁰⁸ is performed by PDK1, and this protein is secondarily phosphorylated within its C-terminus at Ser⁴⁷³ by MTOR, M-CSF, or RANKL.^(41,42) Phosphorylation of PDK1 at Ser²⁴¹ and AKT1 at Ser⁴⁷³ was not changed by galectin-8 inhibition, whereas that of ERK1/2 at Thr²⁰²-Tyr²⁰⁴ was significantly lower (Fig. 5E).

Specific inhibition of each galectin-8 isoform did not affect autophagy as assessed globally by the LC3B-II/LC3B-I ratio, nor did it affect the aforementioned MTORC1-related regulators and targets (Fig. S1), indicating that autophagy, and its associated signaling are not dependent on spliced galectin-8 isoforms, with the approximately 40% decrease in total galectin-8 expression not being sufficient to induce any change.

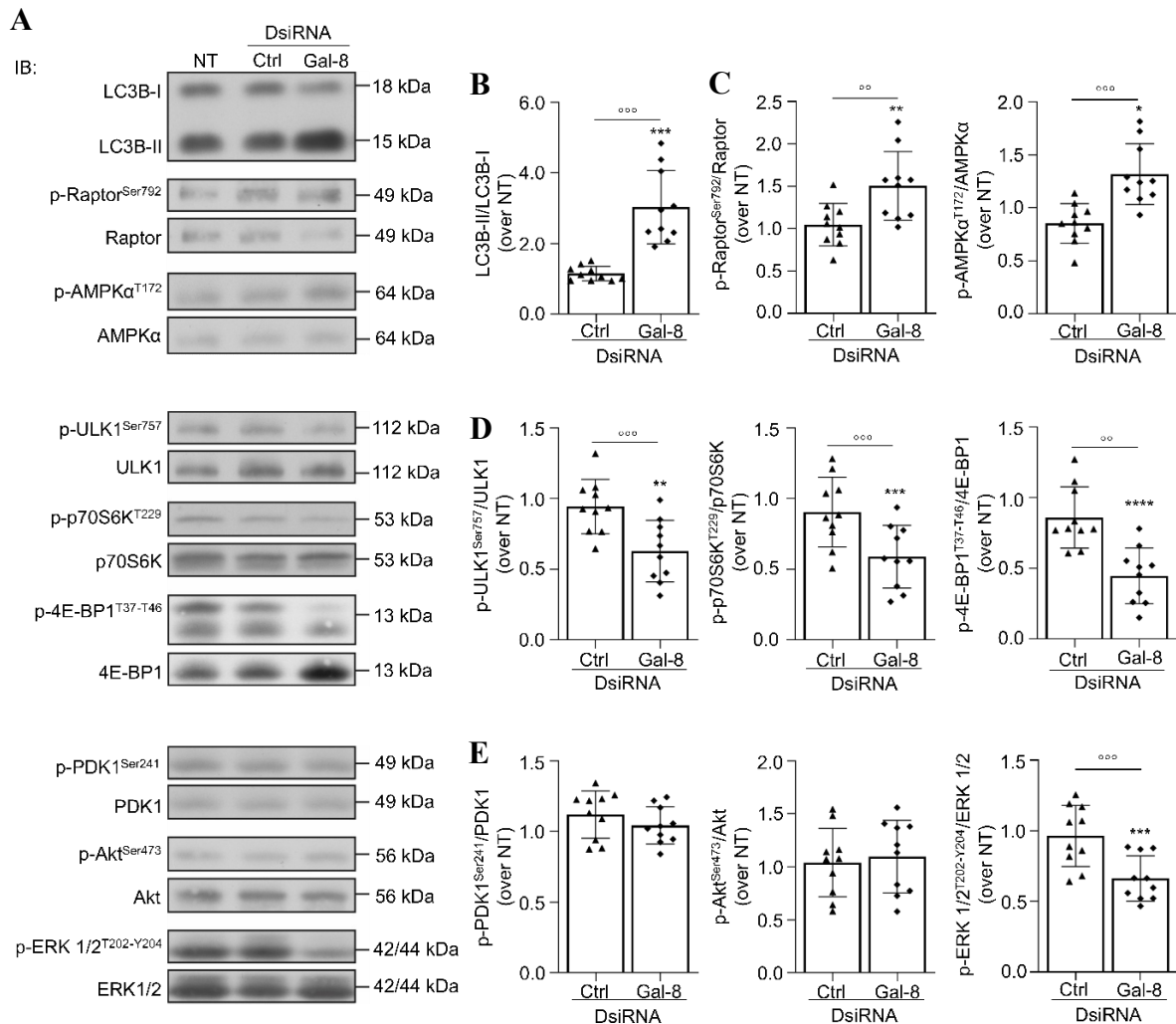


Figure 5: Impact of galectin-8 inhibition on MTORC1 signaling.

Osteoclasts were generated from long-term CBM cultures. On D17, the cells were transfected with galectin-8 DsiRNAs (Gal-8) or negative control DsiRNA (Ctrl) or not transfected (NT). (A) Analysis of autophagy- and mTOR-related proteins by immunoblotting. On D21, protein lysates were analyzed by immunoblotting using antibodies against the phosphorylated (p) or total forms of several proteins involved in MTORC1 signaling as well as LC3B. Optical density was measured using ImageJ software. (B) Autophagy levels. The graph shows the ratio of LC3B-II to LC3B-I as an indicator of basal autophagy. (C) MTORC1 inhibitors (AMPK α and its target Raptor). The Ser⁷⁹²p-RPTOR/RPTOR and T¹⁷²AMPK α /AMPK α ratios are presented. (D) MTORC1 targets. The graphs show the phosphorylation of downstream substrates of MTORC1, including the ratios of Ser⁷⁵⁷p-ULK1/ULK1, Thr²²⁹p-p70S6K/p70S6K, and Thr³⁷/Thr⁴⁶p-4EBP1/4EBP1. (E) Upstream MTORC1 activators. The graphs show the phosphorylation of kinases upstream of the MTORC1 complex, including the ratios of Ser²⁴¹p-PDK1/PDK1, Ser⁴⁷³p-AKT1/AKT1, and Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴p-ERK 1/2/ERK 1/2. Results are expressed as the mean \pm SD (N = 10 independent experiments; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. NT; ^{oo}p<0.01, ^{ooo}p<0.001 vs. Ctrl).

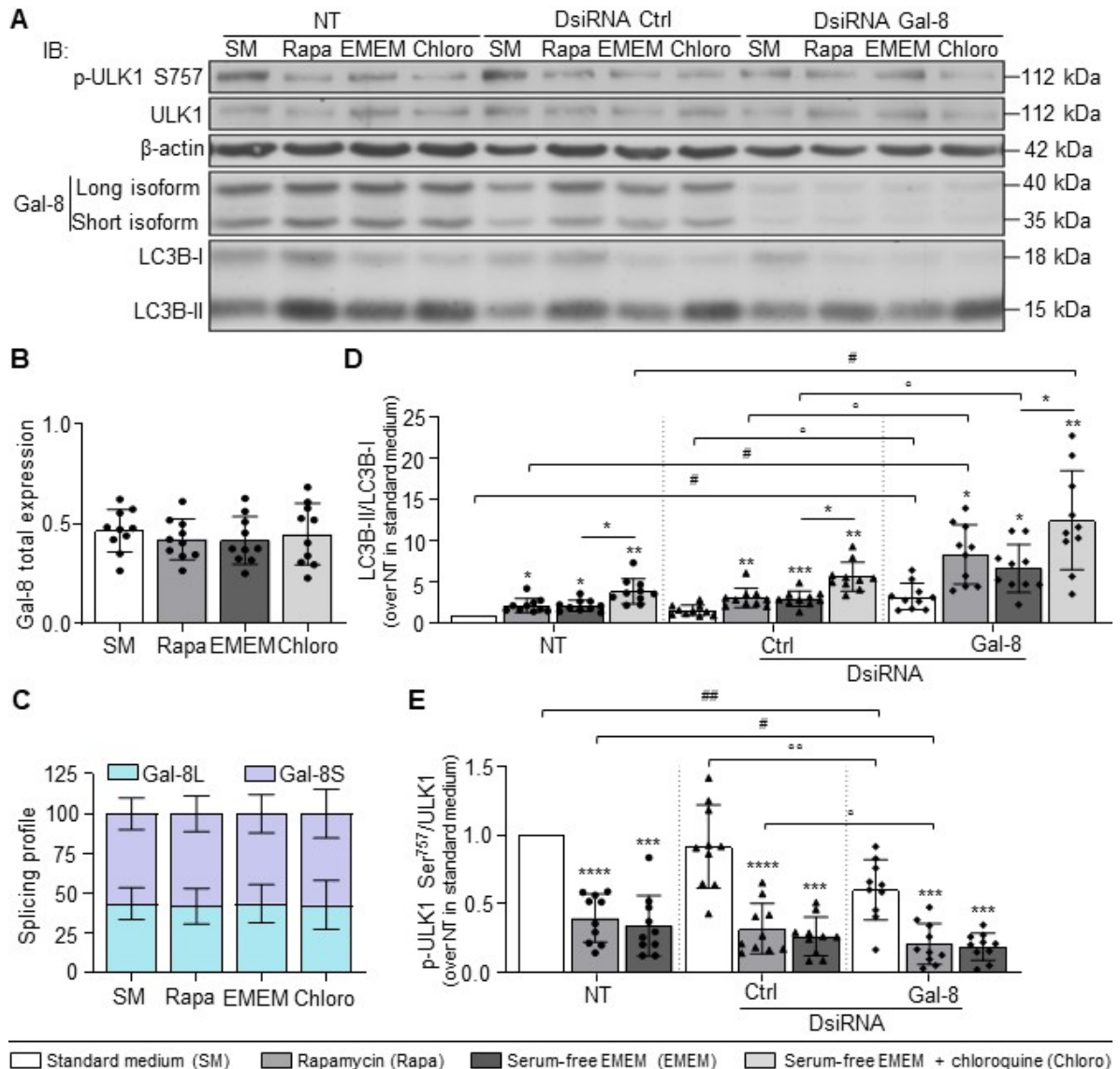


Figure 6: Effect of inhibiting galectin-8 expression on autophagy flux.

Cells were transfected with either galectin-8 DsiRNAs (Gal-8) or negative control DsiRNA (Ctrl) or not transfected (NT) on D17. On D21, cells were maintained in standard medium (SM), stimulated with 10 μ M rapamycin (Rapa), or incubated in serum-free EMEM (EMEM) in the presence or absence of 40 μ M chloroquine (Chloro) for 3h to evaluate autophagic flux. (A) Protein lysates were collected and analyzed using antibodies against ULK1 and its phosphorylated (Ser⁷⁵⁷) form, galectin-8, LC3B, and β -actin. Protein expression as quantified using optical density was measured using ImageJ software. (B) The graphs show the ratio of total galectin-8 (long + short) protein expression to β -actin, (C) the splicing profile determined as the ratio of the long isoform to total galectin-8, (D) the LC3B-II/LC3B-I ratio, and (E) the Ser⁷⁵⁷p-ULK1/ULK1 ratio. Data are presented as the mean \pm SD (N = 10 independent experiments; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. SM of the same cell culture condition; #p<0.05, ##p<0.01 vs. same autophagy stimulation of NT cells; °p<0.05 vs. same autophagy stimulation of Ctrl DsiRNA cells).

Decreasing galectin-8 expression stimulates autophagy without altering autophagic flux

The high basal LC3B-II/LC3B-I ratio induced by galectin-8 inhibition could result from an increase in autophagy induction or defective autophagosome processing, as LC3B-II is subject to autophagic degradation in lysosomes. This was investigated by measuring autophagic flux in the presence of chloroquine, a lysosomotropic agent that inhibits lysosome-mediated proteolysis. Therefore, galectin-8 or control DsiRNA-transfected cells and untransfected cells were either maintained in standard medium or treated with 10 μ M rapamycin (a potent MTORC1 inhibitor, used as a positive control for autophagy) or starvation in EMEM without serum to induce autophagy in the presence or absence of 40 μ M chloroquine (Fig. 6A).

First, the expression profile and splicing profile of galectin-8 in untransfected cells remained unchanged under all autophagic flux conditions, indicating that neither galectin-8 isoform is a substrate for autophagy (Fig. 6B,C). The LC3B-II/LC3B-I ratio was significantly increased when autophagy was induced by rapamycin and serum-free EMEM in untransfected cells and in galectin-8 or control DsiRNA-transfected cells compared to the findings in cells grown in standard medium. Inhibition of galectin-8 increased the basal autophagy rate, as indicated by a higher LC3B-II/LC3B-I ratio compared to that in control DsiRNA-transfected and untransfected cells, with a further increase achieved in the presence of chloroquine. These results indicate that high LC3B-II/LC3B-I ratios induced by galectin-8 depletion were related to autophagy induction, as suggested by the previously observed reduction in MTORC1 signaling, without impairment of autophagy clearance (Fig. 6D).

Finally, we studied ULK1 phosphorylation at Ser⁷⁵⁷ upon autophagy induction with rapamycin or serum-free EMEM. A strong decrease in ULK1 phosphorylation at Ser⁷⁵⁷ was observed when autophagy was induced by rapamycin or serum-free EMEM in all cell cultures compared to the findings in standard medium, with lower levels in observed cells transfected with galectin-8 DsiRNA than in control DsiRNA-transfected or untransfected cells (Fig. 6E).

Differential interactome of galectin-8 isoforms

Overall, the reduced proportion of the long galectin-8 isoform in overactive pagetic osteoclasts (Klinck et al., 2014), as well as the preferential impact of the short galectin-8 isoform *in vitro*, support the differential roles of galectin-8 isoforms in bone resorption and in the number of MNCs, whereas autophagy did not appear to be isoform-dependent in osteoclasts. The two isoforms might interact with distinct proteins and metabolic pathways, as indicated by the impact of linker length on

galectin-8 functions (Levy et al., 2006), which led us to analyze the interactome of galectin-8 isoforms by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Fig. 7A).

As the anti-galectin-8 antibodies currently available do not allow isoform specific detection, and mature human osteoclasts in primary culture are excessively challenging to transfect (Laitala-Leinonen, 2005), in order to study the galectin-8 interactome of each isoform we chose to use the model of HEK293T cells transfected with a plasmid containing cDNA of each isoform.

Identification of high-confidence interaction proteins (HCIP) specific for the galectin-8 short isoform

From the raw LC-MS/MS data, we first excluded interactions between the short and long isoforms by confirming the absence of unique peptides of each isoform in samples in which the other isoform was the bait. The results were then scored using SAINTexpress, with a score of at least 0.9 validating an interaction with one isoform and a score greater than 0.7 with the other isoform qualifying common interacting partners. Spearman's rank correlation matrices of biological replicates are also provided (Fig. S2). According to the selection criteria, 31 interacting proteins were identified, including 22 proteins shared by both isoforms and 9 short isoform-specific proteins (Fig. 7B). The common interacting proteins included classical partners of galectin-8, such as integrin beta 1 (ITGB1), proteins involved in autophagy (ATG9A, LAMP2), and numerous membrane transporters. Specific proteins for the galectin-8 short isoform included integrins and other proteins involved in cell adhesion (ITGA4, ITGA5, TPBG), lysosomal proteins (LAMP1, SCL17A5), and membrane receptors (M6PR, PTGFRN) (Table S1).

To better understand the differences in binding partners between the isoforms, we first assessed the N-CRD/C-CRD ratios (PSM of single peptides of N-CRD vs. C-CRD domain in biological replicates), which were not significantly different, indicating that both CRDs were equally represented in transfected HEK293T cells (Table S2). We then investigated whether the tertiary structure could explain such a difference in interacting proteins. The 3D structure of each isoform was therefore generated by AlphaFold2 using local predicted distance difference test (pLDDT) to measure the confidence of the models by residue. (Tunyasuvunakool, Adler et al., 2021) The loop presented for the long isoform linker peptide reflected the lack of a clear configuration, which remains unknown because of its high degree of flexibility as previously reported. (Gomez-Redondo, Delgado et al., 2021) (Fig. 7C; Fig. S3).

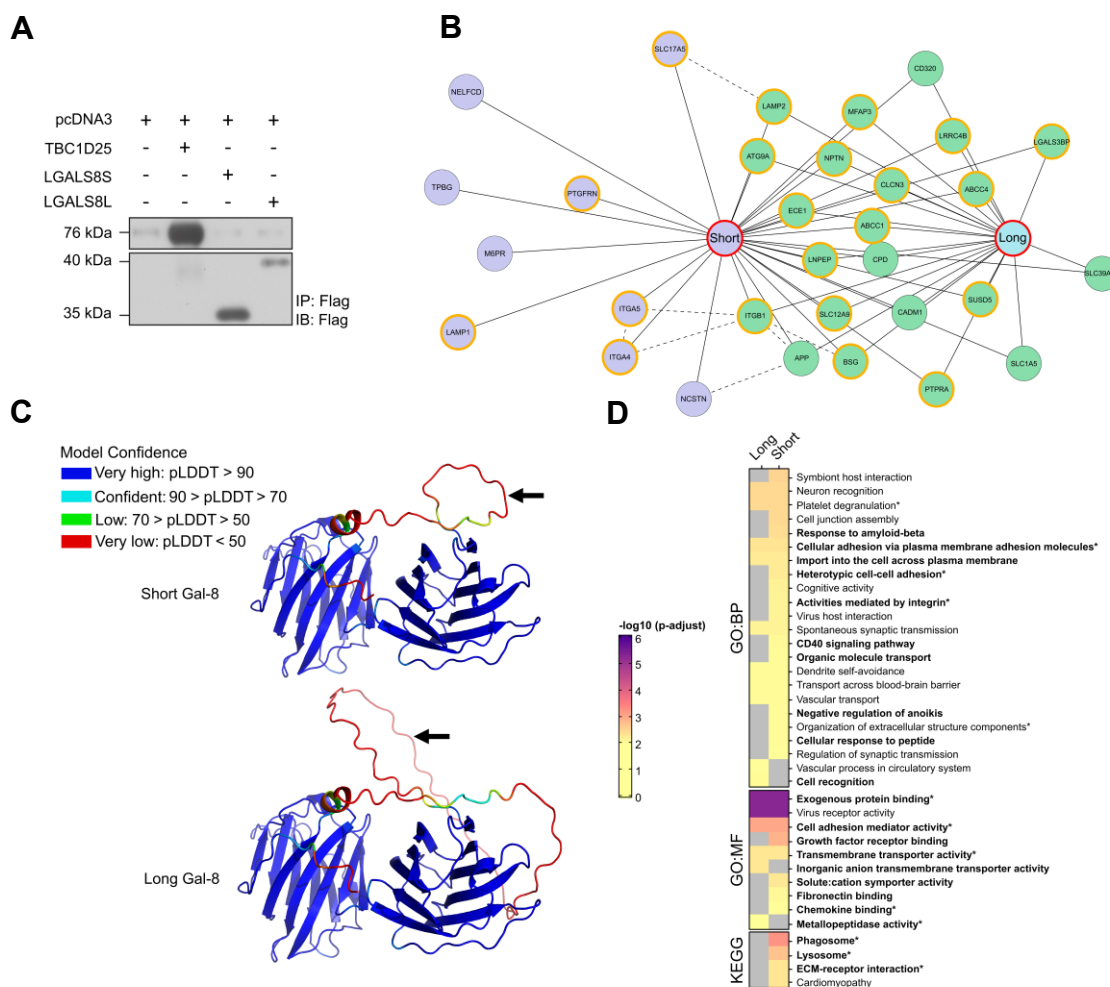


Figure 7: Identification of proteins interacting with galectin-8.

(A) AP-MS samples. HEK293T cells were transfected with pcDNA3, FLAG-TBC1D25 (TBC1D25), FLAG-LGALS8-short (LGALS8S), or FLAG-LGALS8-long (LGALS8L). Protein lysates were collected 48h post-transfection and incubated with FLAG M2-agarose magnetic beads overnight. After washing, the bead samples were boiled in sample buffer to elute the protein complexes, which were analyzed using an antibody against the FLAG epitope. (B) Interactomes of the short and long galectin-8 isoforms. The samples were digested with trypsin and processed for LC-MS/MS. Proteins were identified (MaxQuant), and their interactions were analyzed (SAINTexpress). Interacting proteins are presented as circles (green if common, blue if short isoform-specific, orange outline if previously reported), and each isoform is represented by a red circle (score >0.9 and >0.7 if common). The dashed lines represent prey interactions according to the STRING database (combined score >0.75). (C) Predicted 3D isoform structures. The 3D predictive structures of the short and long isoforms of galectin-8 according to their linker sequence (arrows) were generated using AlphaFold2 software using local predicted distance difference test (pLDDT). (D) Heatmap of GO enrichment analyses of common and specific interacting proteins (prey) of the short and long isoforms of galectin-8 (bait). The heatmap displays all significant enrichments (FDR <1%, Benjamini–Hochberg correction), and nonenriched GO terms are presented in gray. GO terms presented in boldface are relevant to osteoclast biology, whereas asterisks indicate previously reported functions of galectin-8. BP: biological processes; MF: molecular functions.

Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) metabolic pathway enrichment analyses

Finally, the functional differences between the long and short isoforms of galectin-8 were studied through enrichment analysis of GO terms and metabolic pathways, including all interactors (common and specific) for the short isoform and those only shared by the long isoform (Fig. 7D). To simplify the reading of the data representation, some GO terms were grouped according to their similarity (Table S3). GO enrichment analyses showed that galectin-8 isoforms shared several common functions, some of which were well characterized or relevant in osteoclasts (Ribet, Ng et al., 2021), such as cell adhesion, membrane trafficking, as well as phagosome and lysosome metabolic pathways.

Co-localization of short isoform-associated proteins in osteoclasts

A few proteins, including some shared interactors (CLCN3 and LAMP2) and some interactors specific for the short isoform (CLCN7 and LAMP1), were chosen to evaluate the validity of the interactome in human osteoclasts because these data were obtained in HEK293T cells. These proteins were selected for further study considering the highly represented GO terms associated with lysosomal proteins and membrane trafficking and associated pathways of the interactome. Moreover, the chloride channels CLCN3 and CLCN7 are known to participate in bone resorption because CLCN7 ablation leads to osteopetrosis in humans (Kornak, Kasper et al., 2001) and CLCN3 contributes to organelle acidification in mice. (Okamoto, Kajiya et al., 2008) In addition, the membrane proteins LAMP1 and LAMP2 are expressed in lysosomes and autophagosomes, and they were localized to secretory vesicles associated to bone resorption along with CLCN3/CLCN7, at least in mice. (Ng, Ribet et al., 2023)

Importantly, LAMP1 was highly specific for the short isoform (SAINT score: 0.99 for the short isoform vs. 0 for the long isoform), whereas LAMP2 and CLCN3 were among the strongest galectin-8 interactors (SAINT score of 1.00 for both isoforms). Although the SAINT score for CLCN7 was below our stringent threshold, it was selected because this interactor is specific for the short isoform (SAINT score of 0.74 for the short isoform vs. 0 for the long isoform) and because of its crucial role in bone resorption (Table S1).

As mentioned previously, galectin-8 displayed a dot-like cytoplasmic staining pattern from the top (FSD) to the apical domain in active osteoclasts (Fig. 1F). CLCN7 was highly expressed near the bone matrix at the ruffled membrane surrounded by F-actin structures, which characterize the sealing zone (Fig. 8A). Conversely, CLCN3 was strongly expressed at the nuclear level and found to

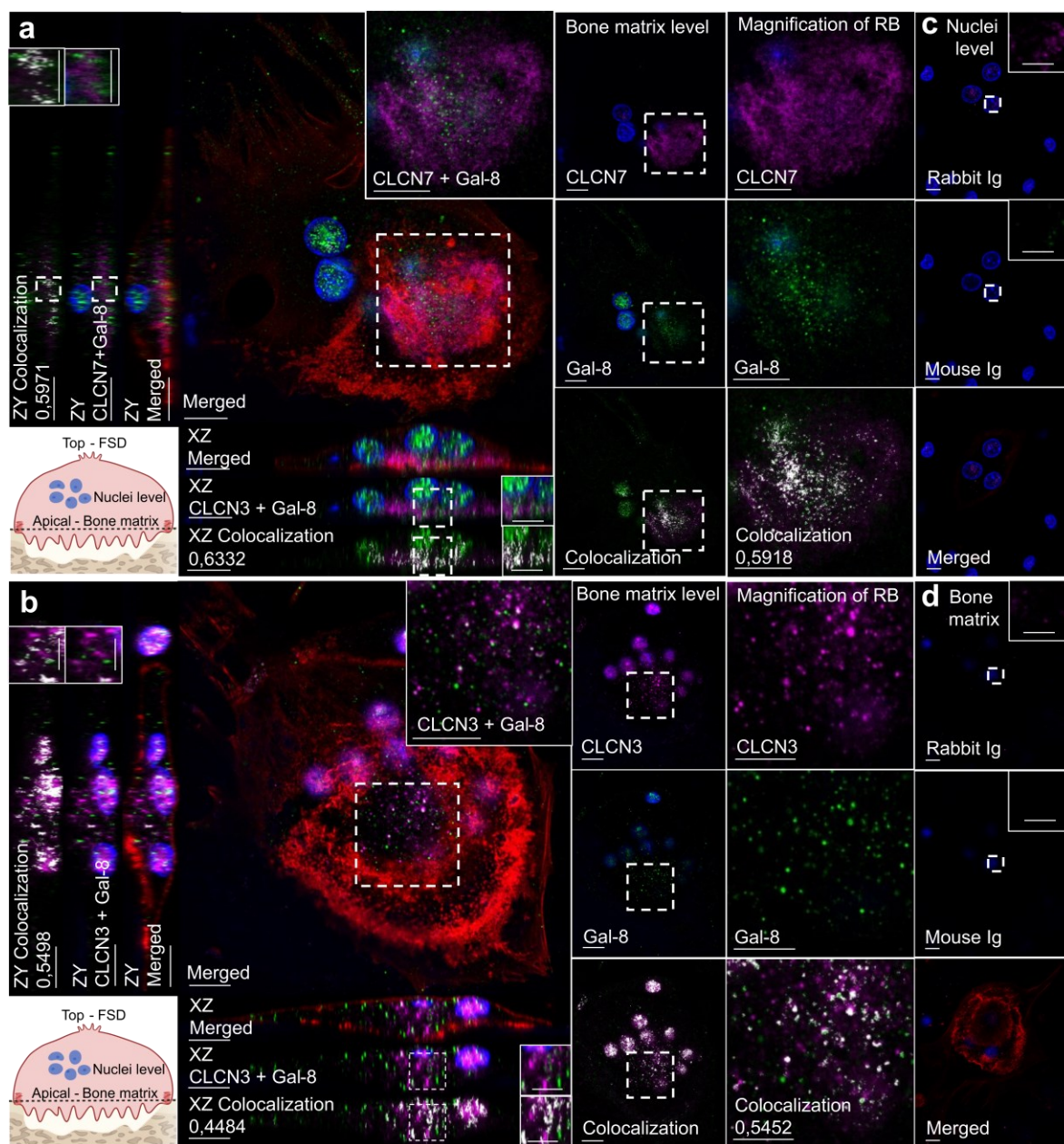


Figure 8: Co-immunofluorescence staining of galectin-8 and the chloride channels CLCN3 and CLCN7.

CBMs were seeded on bone slices. At D21, human osteoclasts cultured on bone slices were fixed, permeabilized then double-stained using antibodies against galectin-8 (green) and CLCN3/CLCN7 (magenta). Phalloidin AlexaFluor 488 was used to detect F-actin (red). Merged images represent active osteoclasts with F-actin to delimit the sealing zone which delimits the ruffled border, the two characteristic structures of resorbing osteoclasts. Cells were also counterstained with DAPI (blue) to select MNCs for image acquisition. Optical sections at bone matrix level are shown with orthogonal reconstruction of the presented cells and magnification the galectin-8 and CLCN7 (A) or CLCN3 (B) expression at the ruffled border with their colocalization overlay (scale bar: 10 μ m). Images are representative of three independent experiments with the acquisition of at least 10 osteoclasts per experiment. Rabbit and mouse Ig controls are represented at the nuclei (C) and bone matrix levels (D).

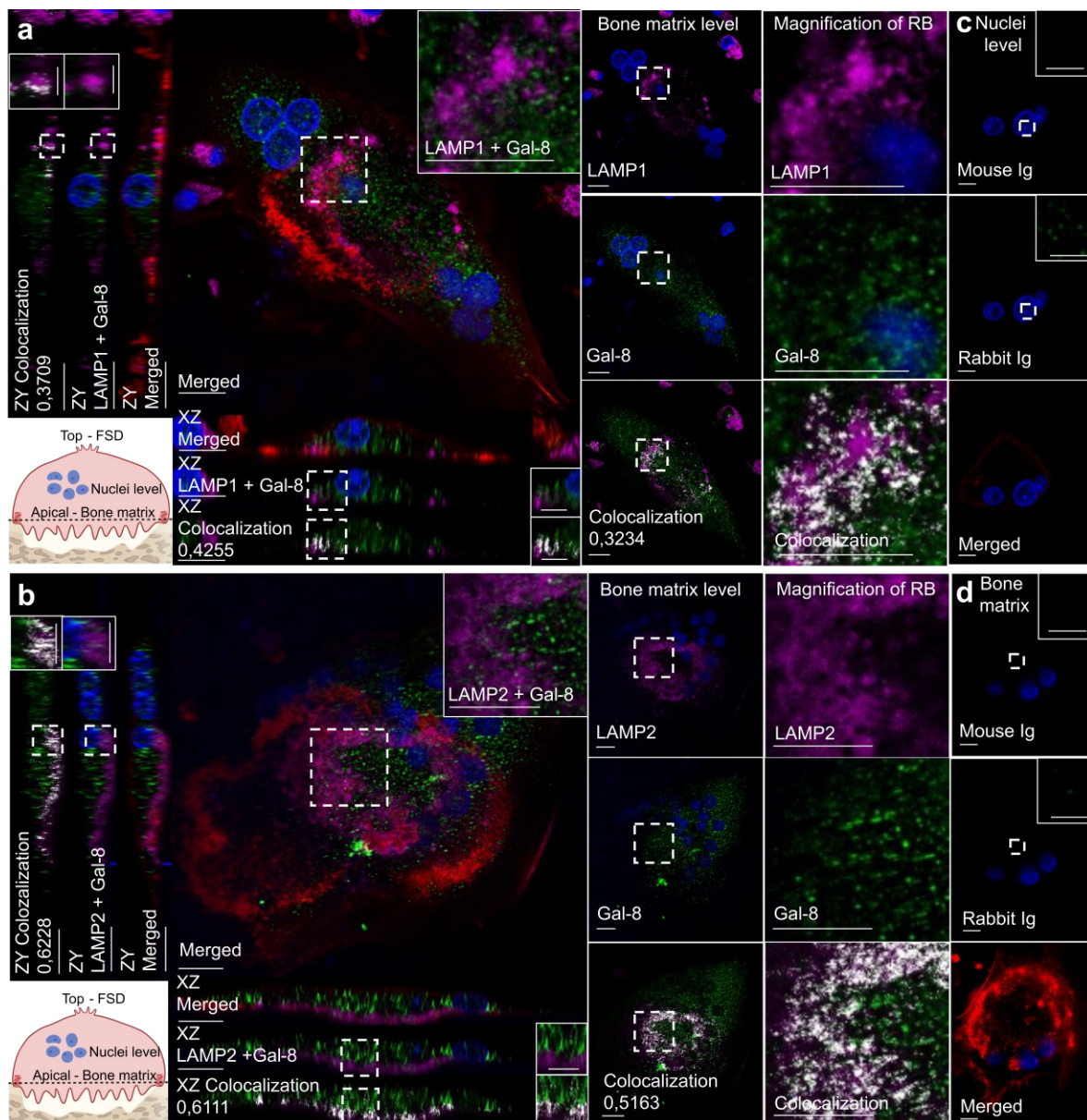


Figure 9: Co-immunofluorescence staining of galectin-8 and the lysosomal membrane proteins LAMP1 and LAMP2.

CBMs were seeded on bone slices. At D21, human osteoclasts cultured on bone slices were fixed, permeabilized then double-stained using antibodies against galectin-8 (green) and LAMP1/LAMP2 (magenta). Phalloidin AlexaFluor 488 was used to detect F-actin (red). Merged images represent active osteoclasts with F-actin to delimit the sealing zone which delimits the ruffled border, the two characteristic structures of resorbing osteoclasts. Cells were also counterstained with DAPI (blue) to select MNCs for image acquisition. Optical sections at bone matrix level are shown with orthogonal reconstruction of the presented cells and magnification the galectin-8 and LAMP1 (A) or LAMP2 (B) expression at the ruffled border with their colocalization overlay (scale bar: 10 μ M). Images are representative of three independent experiments with the acquisition of at least 10 osteoclasts per experiment. Rabbit and mouse Ig controls are represented at the nuclei (C) and bone matrix levels (D).

be diffused in the cytoplasm between the nuclear level and the apical domain (Fig. 8B). To assess the proximity between galectin-8 and its interactors, Mander's co-localization coefficient (R) was obtained from the nuclear level, bone matrix level, and orthogonal reconstruction. Because we observed nonspecific staining in nuclei, they were excluded from the region of interest when assessing co-localization. Galectin-8 co-localized with CLCN3 at different levels in the cytoplasm between nuclei and the bone matrix (R = 0.35–0.54) (Fig. S4A,D). The co-localization between galectin-8 and CLCN7 was mostly restricted to the ruffled membrane (R = 0.72) (Fig. S4C,D). By interacting with CLCN7 at the ruffled membrane, the short isoform might play a direct and greater role in bone resorption.

Furthermore, we investigated the proximity of galectin-8 with LAMP1 and LAMP2. Surprisingly, in all experiments, although detection was clear in mononuclear cells, LAMP1 was detected only in a few osteoclasts, in which it localized near galectin-8 at the periphery of the ruffled membrane (Fig. 9A; Fig. S5). As expected, LAMP2 was strongly detected at the ruffled membrane with faint expression at the nuclear level (Fig. 9B). Galectin-8 co-localized to some extent with LAMP2 at the ruffled membrane, as observed in sections acquired near the bone matrix as well as from orthogonal cell reconstructions (R = 0.41-0.71) (Fig. S4B,D).

4. Discussion

Osteoclasts are highly motile, and they alternate between migratory and bone-resorbing states (Ory, Brazier et al., 2008) by using major intracellular vesicular trafficking pathways, which include the formation of the ruffled membrane (essential for bone resorption capacity), transcytosis of degraded products, and fusion of secretory lysosomes with the ruffled membrane. (Coxon & Taylor, 2008) Although galectins, a family of adhesive lectins, are largely involved in the regulation of cell adhesion, cell spreading (cytoskeleton reorganization), and migration, their involvement in the different facets and functions of osteoclasts remains poorly understood.

In this study, we confirmed the diffuse dot-like cytoplasmic expression pattern of galectin-8 expression in human osteoclasts and the predominance of the short isoform. Inhibition of galectin-8 expression resulted in the inhibition of bone resorption, as well as the stimulation of autophagy associated with inhibition of MTORC1 signaling and activation of AMPK. These two phenomena could be related as activation of autophagy inhibits bone resorption. (Hussein et al., 2012) As ULK1 phosphorylation at Ser⁷⁵⁷ by MTORC1 results in suppression of ULK1 catalytic activity, the low levels of Ser⁷⁵⁷ phosphorylation observed upon galectin-8 knockdown reflect its impact on autophagy initiation. Our results contradict the reported intracellular role of galectin-8 as a stimulator of

autophagy. Galectin-8 classically inhibit MTORC1 and stimulate autophagy following the detection of lysosomal damage. (Bell, Lopez et al., 2021, Jia et al., 2018, Pied, Daussy et al., 2022) However, because autophagy plays a central role in cellular homeostasis and galectins have multiple intra- and extracellular roles, the resulting effects of galectin-8 and other galectins must depend on cell type and culture conditions, and an impact on autophagy can be observed upon cellular stress or endosomal damage. (Johannes et al., 2018) Conversely, some autophagy-related proteins, including LC3B, ATG5, and RAB7, are involved in formation of the ruffled membrane and sealing zone and the fusion of secretory lysosomes to the plasma membrane, and their use may be diverted to bone resorption in active osteoclasts. (Chung, Yoon et al., 2012, DeSelm, Miller et al., 2011) In the absence of lysosomal stress, galectin-8 could therefore promote resorption and inhibit autophagy in osteoclasts. Our results revealed a direct role of intracellular galectin-8 in promoting bone resorption in human osteoclasts, whereas only an indirect role was observed via RANKL production in a transgenic mouse model overexpressing galectin-8 (Vinik et al., 2015).

Galectin CRDs are highly conserved among species (Johannes et al., 2018), but AS giving rise to the long isoform with 42 additional amino acids is specific to humans. The proresorptive effect of galectin-8 is enhanced by a decrease in the long/short isoform ratio. Indeed, in pagetic osteoclasts, upregulation of galectin-8 and a decrease in long isoform expression (ratio of long isoform to total (long + short) isoform RNA < 10%) were associated with increased bone resorption, increased MTOR signaling, and a defect in autophagy. (Klinck et al., 2014) Splice switches might represent a biological mechanism for regulating osteoclast activation and alternation between bone migration and resorption states through a downstream impact on protein-protein interactions and signaling pathways, as indicated by our *in vitro* experiments of downregulation of the short galectin-8 isoform, leading to an inhibition of bone resorption and decrease in the number of MNCs, whereas autophagy was not isoform-dependent.

The impact of late DsiRNA transfection (D17) on multinucleation was studied in parallel with that on resorption, in order to identify the contribution to the resorption process itself (resorption per multinucleated cell). While the impact on OC differentiation cannot be assessed by transfection carried out at the end of differentiation, a decrease in the number of multinucleated cells at this stage may be linked to excessive fission or apoptosis of OCs, both alternatives following the resorption activity of these cells (McDonald, Khoo et al., 2021). Our results suggest at least a partial impact of galectin-8 on the osteoclast resorption process, to which the short isoform would contribute.

One of the limitations of our transfection study is the incomplete elimination of galectin-8 and its isoforms. While transfection of osteoclasts is challenging with standard approaches (Laitala-Leinonen, 2005), a 65-75% decrease in total galectin-8 or its isoforms was still achieved and was sufficient to induce significant functional changes, although it only resulted in 20-25% changes in the ratio of isoforms. Nevertheless, small changes in spliced isoforms can induce significant functional changes, with AS events leading to fundamentally different functions or interactors (Schwerk & Schulze-Osthoff, 2005).

To further understand the role of galectin-8 isoforms in osteoclasts, proteomic analysis of their interaction partners was conducted. Few interacting proteins have been identified to date, and the interactors varied by cell type in prior research. Galectin-8 binding partners were identified in murine macrophages during intracellular bacterial infection by IP-LC/MS, including autophagy-related proteins such as TAX1BP1 and ubiquitin, as well as lysosomal proteins and membrane trafficking proteins, including RAB7, and RAB14. (Bell et al., 2021) In endothelial cells, the ligands for galectin-8 included podoplanin, CD44, and CD166 of the immunoglobulin superfamily. (Troncoso, Ferragut et al., 2014) Galectin-8 also binds several integrins, mainly β 1 integrins depending on the cell type (Carcamo et al., 2006, Hadari, Arbel-Goren et al., 2000, Nishi et al., 2006), or NDP52 in selective autophagy (Thurston et al., 2012).

Our study therefore represents the first proteomic assessment of interactions as a function of the galectin-8 isoform. Our galectin-8 interactome analysis detected 22 proteins common to both isoforms and 9 proteins specific for the short isoform. Despite the identical presence of CRDs in galectin-8 short and long isoform samples, the short isoform had more interacting proteins than the long isoform, but the latter is known to be unstable (Levy et al., 2006), with a linker region sensitive to thrombin. (Nishi, Itoh et al., 2005) Apart from protein cleavage, which was not present in our *in vitro* system, the difference in interacting proteins between galectin-8 isoforms could be explained by spatial interference of the long flexible loop with some binding sites or the spacing of CRDs altering the conformational sites involving their proximity. The long isoform could thus block the binding of certain interaction partners, thereby inhibiting certain functions such as resorption; in other words, splicing of *LGALS8* appears to be a regulation pathway for bone resorption.

Among the biological processes, molecular functions, and metabolic pathways associated with short isoform-specific proteins, we identified pathways related to intracellular vesicles and membrane trafficking. Thus, since inhibition of the short isoform affected bone resorption and because we wanted to validate the interactions of short isoform-specific proteins with galectin-8 in

human osteoclasts, we studied its co-localization with chloride channels (CLCN3 and CLCN7) and lysosomal proteins (LAMP1 and LAMP2). We observed that galectin-8 mainly co-localized with LAMP2 and CLCN7 at the ruffled membrane of active osteoclasts, whereas it co-localized with CLCN3 in a dot-like staining pattern between nuclei and bone matrices. LAMP1 was detected in few osteoclasts. As osteoclasts alternate rapidly between resorbing and migrating states, LAMP1 could be transiently expressed during one of that states that were not predominantly represented in our culture conditions. The co-localization of galectin-8 with the other three proteins of our studied interactome indicates that galectin-8 partially localizes to secretory vesicles being transported to the apical domain for fusion with the plasma membrane facing the bone matrix. As suggested in other studies, intracellular galectin-8 in human osteoclasts could facilitate protein or vesicle trafficking to the ruffled membrane through microtubules and participate in cell polarization, which is crucial for bone resorption (Lim et al., 2017, Lo, Li et al., 2021). The specific interaction of the galectin-8 short isoform with CLCN7 could contribute to short isoform-related bone resorption, a CLCN7 major function in osteoclasts. Finally, both isoforms might be involved in bone resorption because interactors such as LAMP2 and CLCN3 can contribute, although the long isoform may be less effective because it has been shown to be slower to bind glycans (Zhang et al., 2015). Several galectin-8 interactors have thus been discovered, but given the diffuse localization of galectin-8 in human osteoclasts, it is likely that additional interacting partners remain to be identified, thereby helping to further delineate the functions of galectin-8 in osteoclast biology.

In conclusion, AS of certain proteins appears essential in the regulation of human osteoclast functions. Galectin-8 is a protein for which an appreciable difference between long and short isoforms could be demonstrated in terms of multinucleation and bone resorption. Galectin-8 appears to be an important factor in the maturation of human osteoclasts, and AS to the short isoform could involve endomembrane systems to regulate bone resorption.

3. Materials and methods

Reagents. Opti-Eagle's minimum essential medium (Opti-MEM) was purchased from Gibco (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). EMEM, antibiotics (penicillin, streptomycin, fungizone), and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Wisent (Montreal, QC, Canada). Ficoll–Paque was purchased from Cytiva (Marlborough, MA, USA). MethoCult was acquired from StemCell Technologies (Vancouver, BC, Canada). Twelve-well plates, eight-well chamber slides, and culture dishes were procured from Falcon (Corning, Corning, NY, USA). Modified Mayer's Hematoxylin (Lillie's Modification) was purchased from Dako (Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA). Human

recombinant (hr) M-CSF and hrGM-CSF were purchased from R&D Systems (Bio-Techne; Minneapolis, MN, USA). Soluble hrRANKL was produced in-house as described elsewhere. (Manolson, Yu et al., 2003) Detailed information on the antibodies used for immunoblotting and immunofluorescence is available in Tables S4 and S5, respectively. Lipofectamine LTX and Qubit Protein Broad Range Assay were purchased from Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), anti-FLAG M2 magnetic beads were obtained from Sigma-Aldrich (Millipore Sigma; Burlington, MA, USA), DsiRNA and custom siRNA were acquired from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA), and negative-control siRNA was purchased from Qiagen (Hilden, Germany; sequences provided in Table S6).

Osteoclast cultures. We used cord blood monocytes (CBMs) as osteoclast precursors. Umbilical cord blood was obtained from healthy parturient women and harvested at delivery after obtaining informed consent, as approved by our institution's review board (CRCHUS). CBMs were isolated from heparinized blood by density-gradient centrifugation and seeded on a methylcellulose-based medium for 10 days. CBMs were then collected and seeded in 8-well culture slides or 12-well plates for an additional 10 days in Opti-MEM supplemented with 2% FBS, MCS-F (25 ng/ml), hrRANKL (100 ng/ml) and antibiotics. These culture conditions yield MNCs with osteoclast markers and bone resorption ability. (Roy, Stephens et al., 2021)

HEK293T cell culture and transfection. Human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Transient plasmid transfections were carried out using the *TransIT-LT1* reagent (Mirus Bio, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. Empty pcDNA3 vector was added to each transfection preparation to ensure a constant quantity of DNA in each culture dish. Protein lysates were collected after 48 h.

Immunoblotting. In 12-well plates, whole-culture proteins were extracted at the end of the 3-week culture (D21) or at different stages of differentiation (D0, D7, D14, and D21), quantified using the Qubit Protein Assay, and separated by SDS-PAGE. Immunoblotting was performed by incubating membranes with primary antibodies overnight at 4°C (Table S4). HRP-conjugated secondary antibodies were used for detection using a chemiluminescent system. Anti- β -actin antibody was used as a loading control. The optical density of the bands was quantified using NIH ImageJ software and normalized to that of the β -actin bands.

Immunofluorescence and confocal microscopy. At the end of the maturation period, osteoclasts seeded on bone slices were quickly washed with cold PBS and fixed with 3% paraformaldehyde (PFA). After permeabilization using 0.1% Triton X-100 and autofluorescence quenching using 0.25 M glycine, nonspecific binding sites were blocked using a ready-to-use Protein Block serum-free solution (Dako). Specific antibodies directed against galectin-8, CLCN3, CLCN7, LAMP1, and LAMP2 (Table S5) were incubated in a ready-to-use antibody diluent with background component solution (Dako) overnight at 4°C. After washing, cells were incubated with Texas Red anti-mouse (orange), Alexa Fluor 647 anti-rabbit (near infrared), and phalloidin Alexa Fluor 488 (green). Cells were also counterstained with 0.5 ng/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) to visualize the nuclei. After 1h of incubation, cells were washed several times with PBS and mounted using Vectashield (Vector Laboratories, Newark, CA).

Cells were examined using a scanning confocal microscope (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) coupled to an inverted microscope with an HC PL APO ×63 oil immersion objective (Photonic microscopy platform, UdS, Leica Microsystems). Digitized images were computed and processed using Leica LASX software as previously described. (Roy, Stephens et al., 2021) In immunofluorescence double labeling, an intermediate color indicating co-localization is obtained only if the fluorescence emission intensities of the two probes are similar, which is not the case for our antibodies. Therefore, we used white in the overlay picture for pixels with positive signals for both probes. Co-localization was quantified using Mander's overlap coefficient (range, 0–1) (Bolte & Cordelieres, 2006) computed from fluorescence imaging to determine the proportion of overlapping pixels between the two channels (Leica LASX software).

RNA interference. To investigate the roles of galectin-8, osteoclast cultures (D17) were either not transfected, transfected with a negative control DsiRNA or with DsiRNA sequences downregulating both isoforms of human *LGALS8* (galectine-8 DsiRNA). To optimize the inhibition of *LGALS8* expression, two sequences targeting different regions of the coding sequences of both isoforms were used. When studying the effects of each isoform, cells were either not transfected or transfected with negative control siRNA or siRNA sequences targeting specific regions of each isoform. All sequences are provided in Table S6. Transfection was performed according to the manufacturer's protocol; that is, the cell culture medium was replaced with serum and antibiotic-free Opti-MEM containing a mixture of 0.2 μM DsiRNA or siRNA and Lipofectamine LTX. After 4h of incubation at 37°C, the transfection mixture was replaced with fresh medium, and cells were cultured for five more days. Protein downregulation of galectin-8 and its isoforms was assessed by

immunoblotting, and only experiments with a minimum of 55% downregulation of both isoforms were used for further analysis. Based on previous observations and knowing that human osteoclasts are difficult to transfect, the downregulation was considered sufficient to evaluate the effect of the downregulation of galectin-8 or its isoforms on resorption and MNC formation. (Laitala-Leinonen, 2005; Roy, Stephens et al., 2021) Note that it is a minimum threshold, but downregulation ranged from 74% to 91% for the expression of total galectin-8 reduction, from 55% to 85% for the expression of the long isoform reduction, and from 55% to 70% for the expression of the short isoform reduction.

Analysis of MNC formation. To evaluate MNC formation, cells were fixed using 3% PFA, permeabilized using 1% Triton X-100, stained using 10% modified Mayer's Hematoxylin followed by 0.25% eosin, and preserved in 50% glycerol mounting medium. Slides were visualized using a Zeiss ApoTome 2 microscope (Photonic microscopy platform, University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada), and the number of MNCs containing three or more nuclei was counted for each condition (area analyzed per well: 4 mm²), along with the number of nuclei from 100 MNCs.

Bone resorption. After extraction from MethoCult, CBMs were allowed to settle on devitalized bovine bone slices (0.3 cm² × 0.15 mm) and cultured for 2 weeks as previously described. (Roy, Stephens et al., 2021) After removal from the cell culture, the bone slices were quickly washed in sodium hydroxide, sonicated in distilled water to remove cell debris, and stained with 1% toluidine blue solution containing 1% sodium borate. Dyed bone slices were observed under a light microscope with epi-illumination (Zeiss Semi 2000-c stereomicroscope, magnification ×45), and photos were taken. Resorption pits were defined by purple areas with a sparkling appearance and quantified using NIH ImageJ software.

Plasmid constructs. The cDNA sequences encoding for the *LGALS8* short (NM_201543.2) and long (NM_006499.4) isoforms were amplified from a human leukocytes MATCHMAKER cDNA library (Clontech). The FLAG-tagged *LGALS8* constructs were generated by PCR using the Q5 high-fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and primers containing the sequence encoding for the FLAG epitope in-frame with the N-terminal open-reading frame. The PCR fragments were digested with *KpnI* and *NotI* and inserted into the pcDNA3 vector previously digested with the same restriction enzymes. The integrity of the coding sequences of all constructs was confirmed by sequencing at Génome Québec (McGill University, Montreal, QC, Canada) to confirm the integrity

of the two constructs. Note that both generated LGALS8 constructs presented the following single nucleotide polymorphisms (SNPs) classified as natural variants: dbSNP:rs1126407 (F19Y), dbSNP:rs1041935 (R36C), dbSNP:rs1041937 (M56V) and dbSNP:rs2243525 (R184S for the short isoform or R226S for the long isoform).

Affinity purification-mass spectrometry (AP-MS). HEK293T cells were transiently transfected with pcDNA3 (negative control), FLAG-TBC1D25 (gifted by Steve Jean's laboratory, used as a control for the FLAG epitope) or FLAG-LGALS8-short (LGALS8S) or -long (LGALS8L). Samples analyzed by LC-MS/MS were processed as previously described with some minor modifications. (Degrandmaison, Abdallah et al., 2020, Frechette, Degrandmaison et al., 2021) At 48h post-transfection, cells were washed in PBS and then incubated in solubilization buffer (1% octyl B-D-glucopyranoside, 75 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂) supplemented with protease inhibitors (complete EDTA-free protease inhibitor cocktail supplemented with NaF, PMSF, Na₃VO₄ and β-glycerophosphate) at 4°C for 1h. Supernatants were collected and quantified using the Qubit Protein Assay. Equal quantities of protein from each sample were incubated overnight with 75 μL of anti-FLAG M2 magnetic beads at 4°C. Subsequently, the beads were washed 4 times in solubilization buffer without protease inhibitors and then 4 times with an ammonium bicarbonate buffer (20 mM NH₄HCO₃, pH 8.0). Immunoblotting was performed to validate the immunoprecipitation. The following steps were carried out by the Proteomics Platform (University of Sherbrooke, Québec, Canada). Trypsin was added to the beads for a minimum of 5h, and protein digestion was stopped by acidification with 1% formic acid solution. The supernatants were then transferred to LoBind tubes. The beads were incubated for 5 min in a solution of 60% acetonitrile and 0.1% formic acid, and the supernatants were collected again and pooled in LoBind tubes. The samples were dried, resuspended in sample buffer (0.1% trifluoroacetic acid), and desalted using a ZipTip. Finally, the samples were separated using HPLC Ultimate 3000 Binary RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) and injected into a Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Protein identification was performed using MaxQuant and the human Proteins UniProt Knowledgebase at a false discovery rate (FDR) <1%. (Leblanc & Brunet, 2020)

Identification of HCIPs for galectin-8 isoforms. The selection of biological replicates taken in pairs was based on a variation coefficient lower than 20%-25% for a Spearman rank correlation coefficient exceeding 0.75. Five replicates were used as negative controls (empty vector control or FLAG-TBC1D25 control), and two replicates were generated for each isoform. Protein-protein

interaction candidates from AP-MS data were scored using SAINTexpress algorithm. (Teo, Liu et al., 2014) Confident interactors were selected based on a SAINT score of ≥ 0.9 (stringent SAINT score) with one of the two isoforms and > 0.7 (threshold SAINT score) with the other isoform. The STRING database (<https://string-db.org/>) was used to detect interactions between proteins that interact with galectin-8 retaining a combined score greater than 0.75. The interaction network between the isoforms and their partners was constructed using Cytoscape version 3.9.1.

Interaction network analysis. We used the “clusterProfiler” R package for GO and KEGG pathway enrichment analyses of interacting proteins. (Wu, Hu et al., 2021) To compute the enriched annotations, the parameter for the “enrichGO” and “enrichKEGG” functions was an adjusted p-value of the FDR method with a Benjamini–Hochberg correction lower than 0.01. The “Heatmap” function of the “ComplexHeatmap” package was used for the graphical representation of the enriched terms as a function of $-\log_{10}(\text{p-adjust})$.

Statistical analysis. Results are presented as the mean \pm standard deviation (SD). Significant variations were analyzed using paired one-way ANOVA followed by Tukey’s test. Two-way ANOVA followed by Tukey’s test was used to analyse significant variations for the splicing profile. The chi-squared test with Bonferroni’s correction was used to assess significant variation in the MNC proportions of low-, medium-, or high-nucleated cells. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software 9.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Data availability

The datasets and supplemental information can be acquired by contacting the corresponding author. All data identifying HCIPs and the complete results of enrichment analyses are available (Suppl Data) upon request.

Acknowledgements

S.R. was supported by the Clinician Scientist Fellowship Program of the Department of Medicine, Faculty of Medicine, Sherbrooke University, and the study was granted by The **Natural Sciences and Engineering Research Council** of Canada (**NSERC**) (#RGPIN-2016-03900). M.A.B. is Junior research scholar from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). L.M.N received a scholarship of excellence from the Faculty of Medicine and J.D. received a PhD scholarship from the FRQS.

Author contributions

Study design and funding (SR, MR, MAB, JLP); *in vitro* experiments: cell cultures, functional and morphological osteoclast analysis (MR, PY B, V G-C), molecular biology and transfections (MR, JD); proteomics and bioinformatics (LNM, MAB); data acquisition and analysis (MR, SR, MAB, JLP); paper drafting (MR, SR). All authors reviewed critically the data and revised the manuscript, read and approved the final version.

Additional information

Conflict of Interest Statement: All authors confirm that they have no conflicts of interest

Supplementary information: The online version contains supplementary material

5. References

- Barth S, Glick D, Macleod KF (2010) Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 221: 117-24
- Bell SL, Lopez KL, Cox JS, Patrick KL, Watson RO (2021) Galectin-8 Senses Phagosomal Damage and Recruits Selective Autophagy Adapter TAX1BP1 To Control Mycobacterium tuberculosis Infection in Macrophages. *mBio*: e0187120
- Bolte S, Cordelieres FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224: 213-32
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-42
- Carabelli J, Prato CA, Sanmarco LM, Aoki MP, Campetella O, Tribulatti MV (2018) Interleukin-6 signalling mediates Galectin-8 co-stimulatory activity of antigen-specific CD4 T-cell response. *Immunology* 155: 379-386
- Carabelli J, Quattrocchi V, D'Antuono A, Zamorano P, Tribulatti MV, Campetella O (2017) Galectin-8 activates dendritic cells and stimulates antigen-specific immune response elicitation. *J Leukoc Biol* 102: 1237-1247
- Carcamo C, Pardo E, Oyanadel C, Bravo-Zehnder M, Bull P, Caceres M, Martinez J, Massardo L, Jacobelli S, Gonzalez A, Soza A (2006) Galectin-8 binds specific beta1 integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Exp Cell Res* 312: 374-86
- Chung YH, Yoon SY, Choi B, Sohn DH, Yoon KH, Kim WJ, Kim DH, Chang EJ (2012) Microtubule-associated protein light chain 3 regulates Cdc42-dependent actin ring formation in osteoclast. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 989-97
- Coxon FP, Taylor A (2008) Vesicular trafficking in osteoclasts. *Semin Cell Dev Biol* 19: 424-33
- Degrandmaison J, Abdallah K, Blais V, Genier S, Lalumiere MP, Bergeron F, Cahill CM, Boulter J, Lavoie CL, Parent JL, Gendron L (2020) In vivo mapping of a GPCR interactome using knockin mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 13105-13116
- DeSelm CJ, Miller BC, Zou W, Beatty WL, van Meel E, Takahata Y, Klumperman J, Tooze SA, Teitelbaum SL, Virgin HW (2011) Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. *Dev Cell* 21: 966-74
- Eloa MT, Ferragut F, Cardenas Delgado VM, Nugnes LG, Gentilini L, Laderach D, Troncoso MF, Compagno D, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA (2014) Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histol Histopathol* 29: 1093-105
- Eshkar Sebban L, Ronen D, Levartovsky D, Elkayam O, Caspi D, Amar S, Amital H, Rubinow A, Golan I, Naor D, Zick Y (2007) The involvement of CD44 and its novel ligand galectin-8 in apoptotic regulation of autoimmune inflammation. *J Immunol* 179: 1225-35
- Frechette L, Degrandmaison J, Binda C, Boisvert M, Cote L, Michaud T, Lalumiere MP, Gendron L, Parent JL (2021) Identification of the interactome of the DP1 receptor for Prostaglandin D(2):

Regulation of DP1 receptor signaling and trafficking by IQGAP1. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1865: 129969

Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA, Reszka AA (2003) M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ* 10: 1165-77

Gomez-Redondo M, Delgado S, Nunez-Franco R, Jimenez-Oses G, Arda A, Jimenez-Barbero J, Gimeno A (2021) The two domains of human galectin-8 bind sialyl- and fucose-containing oligosaccharides in an independent manner. A 3D view by using NMR. *RSC Chem Biol* 2: 932-941

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-26

Hadari YR, Arbel-Goren R, Levy Y, Amsterdam A, Alon R, Zakut R, Zick Y (2000) Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci* 113 (Pt 13): 2385-97

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110: 177-89

Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-9

Huang J, Brumell JH (2012) Microbiology: A sweet way of sensing danger. *Nature* 482: 316-7

Hussein O, Tiedemann K, Murshed M, Komarova SV (2012) Rapamycin inhibits osteolysis and improves survival in a model of experimental bone metastases. *Cancer letters* 314: 176-84

Jia J, Abudu YP, Claude-Taupin A, Gu Y, Kumar S, Choi SW, Peters R, Mudd MH, Allers L, Salemi M, Phinney B, Johansen T, Deretic V (2018) Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Mol Cell* 70: 120-135 e8

Johannes L, Jacob R, Leffler H (2018) Galectins at a glance. *J Cell Sci* 131

Kim BW, Hong SB, Kim JH, Kwon DH, Song HK (2013) Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat Commun* 4: 1613

Klinck R, Laberge G, Bisson M, McManus S, Michou L, Brown JP, Roux S (2014) Alternative splicing in osteoclasts and Paget's disease of bone. *BMC Med Genet* 15: 98

Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ (2001) Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104: 205-15

Laitala-Leinonen T (2005) Unsatisfactory gene transfer into bone-resorbing osteoclasts with liposomal transfection systems. *J Negat Results Biomed* 4: 5

Leblanc S, Brunet MA (2020) Modelling of pathogen-host systems using deeper ORF annotations and transcriptomics to inform proteomics analyses. *Comput Struct Biotechnol J* 18: 2836-2850

Levy Y, Auslender S, Eisenstein M, Vidavski RR, Ronen D, Bershadsky AD, Zick Y (2006) It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology* 16: 463-76

Li YJ, Kukita A, Teramachi J, Nagata K, Wu Z, Akamine A, Kukita T (2009) A possible suppressive role of galectin-3 in upregulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. *Lab Invest* 89: 26-37

Lim H, Yu CY, Jou TS (2017) Galectin-8 regulates targeting of Gp135/podocalyxin and lumen formation at the apical surface of renal epithelial cells. *Faseb J* 31: 4917-4927

Lo YH, Li CS, Chen HL, Chiang CY, Huang CC, Tu TJ, Lo TH, Choy DF, Arron JR, Chen HY, Liu FT (2021) Galectin-8 Is Upregulated in Keratinocytes by IL-17A and Promotes Proliferation by Regulating Mitosis in Psoriasis. *J Invest Dermatol* 141: 503-511 e9

Manolson MF, Yu H, Chen W, Yao Y, Li K, Lees RL, Heersche JN (2003) The $\alpha 3$ isoform of the 100-kDa V-ATPase subunit is highly but differentially expressed in large (≥ 10 nuclei) and small (< 10 nuclei) osteoclasts. *J Biol Chem* 278: 49271-8

McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P, Kyaw W, Pathmanandavel K, Grootveld AK, Moran I, Butt D, Nguyen A, Corr A, Warren S, Biro M, Butterfield NC, Guilfoyle SE, Komla-Ebri D, Dack MRG, Dewhurst HF et al. (2021) Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell* 184: 1330-1347 e13

McManus S, Bisson M, Chamberland R, Roy M, Nazari S, Roux S (2016) Autophagy and 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 (PDK1)-Related Kinome in Pagetic Osteoclasts. *J Bone Miner Res* 31: 1334-1343

Meinohl C, Barnard SJ, Fritz-Wolf K, Unger M, Porr A, Heipel M, Wirth S, Madlung J, Nordheim A, Menke A, Becker K, Giehl K (2019) Galectin-8 binds to the Farnesylated C-terminus of K-Ras4B and Modifies Ras/ERK Signaling and Migration in Pancreatic and Lung Carcinoma Cells. *Cancers (Basel)* 12

Moriyama K, Kukita A, Li YJ, Uehara N, Zhang JQ, Takahashi I, Kukita T (2014) Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: possible involvement of the Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. *Lab Invest* 94: 1200-11

Muller J, Duray E, Lejeune M, Dubois S, Plougouven E, Leonard A, Storti P, Giuliani N, Cohen-Solal M, Hempel U, Thijssen VL, Beguin Y, Heusschen R, Caers J (2019) Loss of Stromal Galectin-1 Enhances Multiple Myeloma Development: Emphasis on a Role in Osteoclasts. *Cancers (Basel)* 11

Ng PY, Ribet ABP, Guo Q, Mullin BH, Tan JWY, Landao-Bassonga E, Stephens S, Chen K, Yuan J, Abudulai L, Bollen M, Nguyen E, Kular J, Papadimitriou JM, Soe K, Teasdale RD, Xu J, Parton RG, Takayanagi H, Pavlos NJ (2023) Sugar transporter Slc37a2 regulates bone metabolism in mice via a tubular lysosomal network in osteoclasts. *Nat Commun* 14: 906

Nishi N, Itoh A, Fujiyama A, Yoshida N, Araya S, Hirashima M, Shoji H, Nakamura T (2005) Development of highly stable galectins: truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins. *FEBS Lett* 579: 2058-64

Nishi N, Itoh A, Shoji H, Miyanaka H, Nakamura T (2006) Galectin-8 and galectin-9 are novel substrates for thrombin. *Glycobiology* 16: 15C-20C

Nishi N, Shoji H, Seki M, Itoh A, Miyanaka H, Yuube K, Hirashima M, Nakamura T (2003) Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin α M. *Glycobiology* 13: 755-63

Norambuena A, Metz C, Vicuna L, Silva A, Pardo E, Oyanadel C, Massardo L, Gonzalez A, Soza A (2009) Galectin-8 induces apoptosis in Jurkat T cells by phosphatidic acid-mediated ERK1/2 activation supported by protein kinase A down-regulation. *The Journal of biological chemistry* 284: 12670-9

Okamoto F, Kajiya H, Toh K, Uchida S, Yoshikawa M, Sasaki S, Kido MA, Tanaka T, Okabe K (2008) Intracellular CIC-3 chloride channels promote bone resorption in vitro through organelle acidification in mouse osteoclasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C693-701

Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A (2008) Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol* 87: 469-77

Pied N, Daussy CF, Denis Z, Ragues J, Faure M, Iggo R, Tschan MP, Roger B, Rayne F, Wodrich H (2022) TBK1 is part of a galectin 8 dependent membrane damage recognition complex and drives autophagy upon Adenovirus endosomal escape. *PLoS Pathog* 18: e1010736

Ribet ABP, Ng PY, Pavlos NJ (2021) Membrane Transport Proteins in Osteoclasts: The Ins and Outs. *Front Cell Dev Biol* 9: 644986

Roy M, Stephens E, Bouhour S, Roux S (2021) RabGAP TBC1D25 is involved in human osteoclast activity. *Eur J Cell Biol* 100: 151145

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-101

Schwerk C, Schulze-Osthoff K (2005) Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 19: 1-13

Simon D, Derer A, Andes FT, Lezuo P, Bozec A, Schett G, Herrmann M, Harre U (2017) Galectin-3 as a novel regulator of osteoblast-osteoclast interaction and bone homeostasis. *Bone* 105: 35-41

Teo G, Liu G, Zhang J, Nesvizhskii AI, Gingras AC, Choi H (2014) SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INTeractome software. *J Proteomics* 100: 37-43

Thurston TL, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A, Randow F (2012) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482: 414-8

Tribulatti MV, Carabelli J, Prato CA, Campetella O (2020) Galectin-8 in the onset of the immune response and inflammation. *Glycobiology* 30: 134-142

Troncoso MF, Ferragut F, Bacigalupo ML, Cardenas Delgado VM, Nugnes LG, Gentilini L, Laderach D, Wolfenstein-Todel C, Compagno D, Rabinovich GA, Elola MT (2014) Galectin-8: a matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology* 24: 907-14

Tunyasuvunakool K, Adler J, Wu Z, Green T, Zielinski M, Zidek A, Bridgland A, Cowie A, Meyer C, Laydon A, Velankar S, Kleywegt GJ, Bateman A, Evans R, Pritzel A, Figurnov M, Ronneberger O, Bates R, Kohl SAA, Potapenko A et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* 596: 590-596

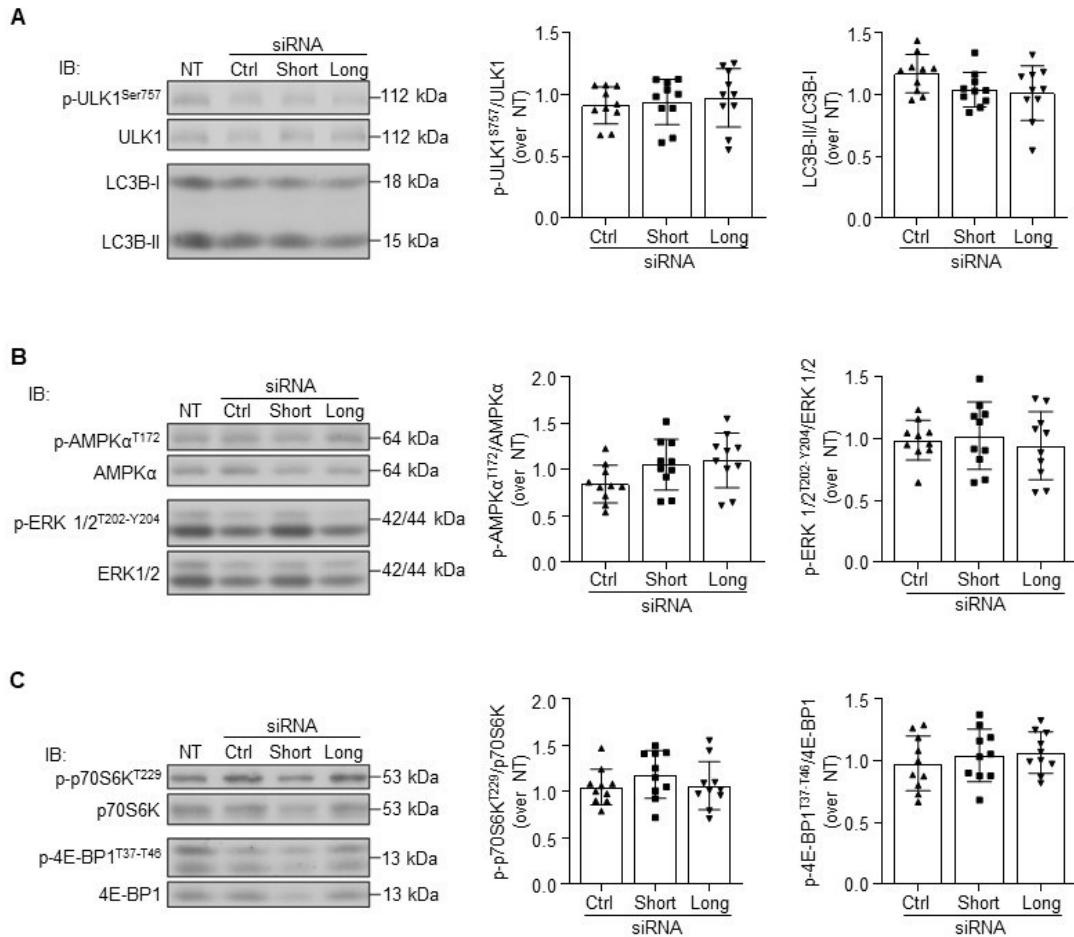
Vinik Y, Shatz-Azoulay H, Hiram-Bab S, Kandel L, Gabet Y, Rivkin G, Zick Y (2018) Ablation of the mammalian lectin galectin-8 induces bone defects in mice. *Faseb J* 32: 2366-2380

Vinik Y, Shatz-Azoulay H, Vivanti A, Hever N, Levy Y, Karmona R, Brumfeld V, Baraghithy S, Attar-Lamdar M, Boura-Halfon S, Bab I, Zick Y (2015) The mammalian lectin galectin-8 induces RANKL expression, osteoclastogenesis, and bone mass reduction in mice. *Elife* 4: e05914

Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, Fu X, Liu S, Bo X, Yu G (2021) clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* 2: 100141

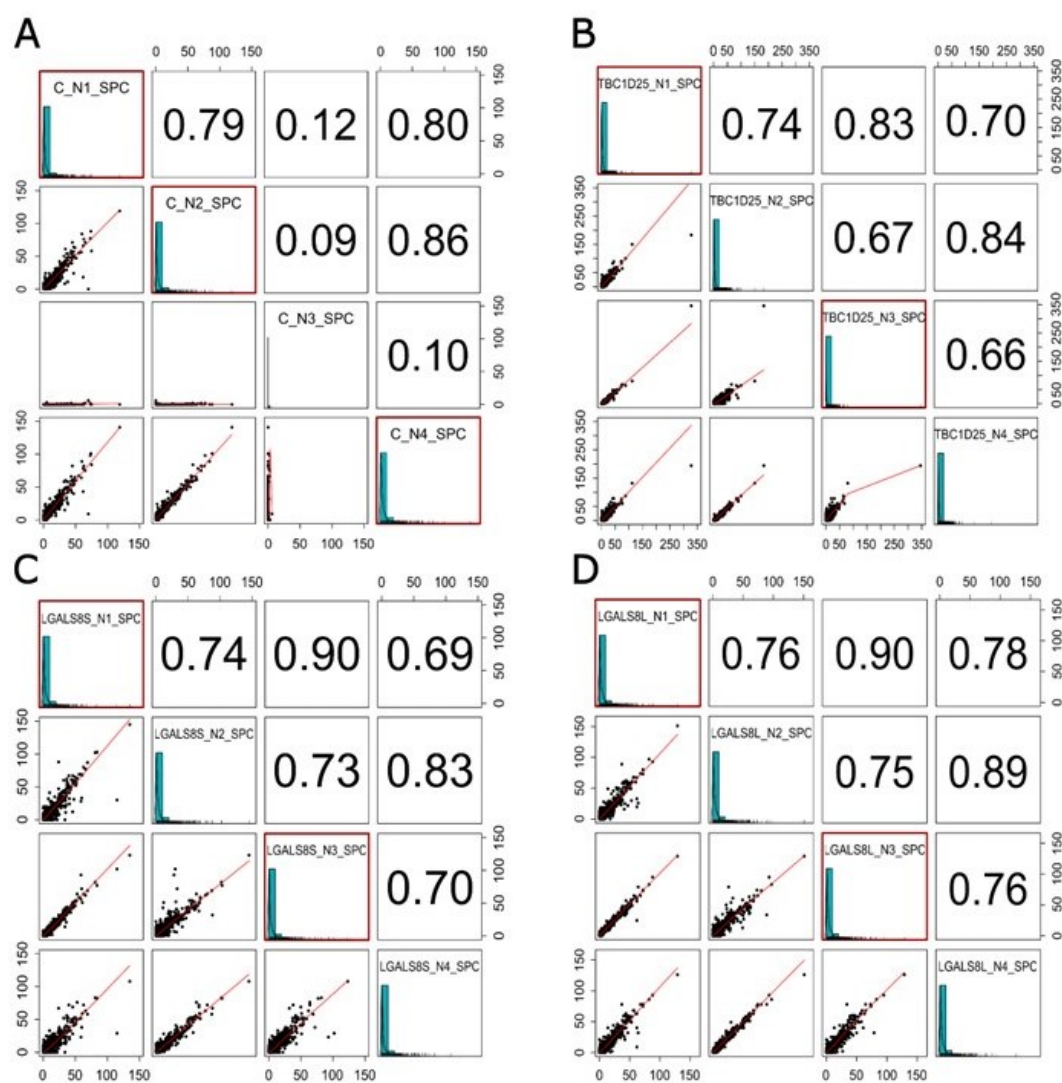
Zhang S, Moussodia RO, Vertesy S, Andre S, Klein ML, Gabius HJ, Percec V (2015) Unraveling functional significance of natural variations of a human galectin by glycodendrimersomes with programmable glycan surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 5585-90

6. Supplemental materials



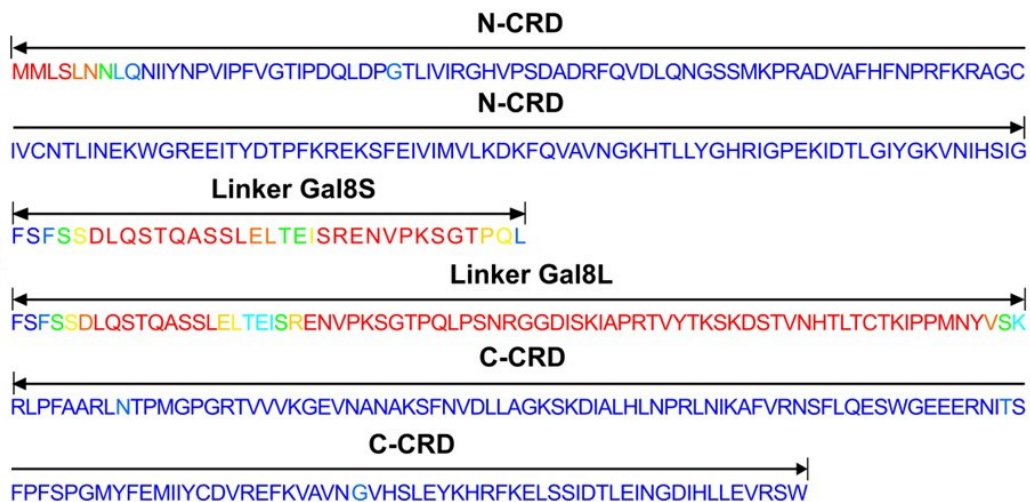
Supplemental Figure 1: Impact of galectin-8 isoform-specific inhibition on autophagy and mTORC1 signaling.

Osteoclasts were generated from long-term CBM culture. At D17, cells were transfected with isoform-specific siRNAs directed against the short or long isoform, with a control siRNA (Ctrl), or left non-transfected. On day 21, protein lysates were analyzed by IB using antibodies against the phosphorylated (p) or total forms of several proteins involved in MTORC1 signaling as well as LC3B. ODs were measured with ImageJ software. (A) Autophagy related proteins: The graphs show the ratio of Ser⁷⁵⁷p-ULK1/ULK1 as well as the ratio of LC3B-II over LC3B-I evaluating basal autophagy. (B) AMPK α and ERK1/2 activation: Ratios of Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ p-ERK 1/2/ERK 1/2 and T¹⁷² AMPK α /AMPK α are presented. (C) MTORC1 targets: The graphs show the phosphorylation of downstream substrates of MTORC1, including the ratios of Thr²²⁹ p-p70S6K/p70S6K and Thr³⁷/Thr⁴⁶ p-4EBP1/4EBP1. Results are expressed as the mean \pm SD, n = 10 independent experiments.



Supplemental Figure 2: Spearman's rank correlation matrices of biological replicates.

This figure shows the results of Spearman's rank correlation analysis between biological replicates for samples constituting the empty vector (A) and irrelevant Flag.TBC1D25 (B) negative controls, as well as short (Flag.LGALS8S) (C) and long (Flag.LGALS8L) (D) galectin-8 isoform overexpression. Squares with red borders indicate the replicates used to generate the SAINT array (coefficient > 0.75). For TBC1D25, LGALS8S, and LGALS8L samples, only replicates 1 and 3 containing sufficient peptide-spectrum match (PSM) to reflect overexpression were selected.

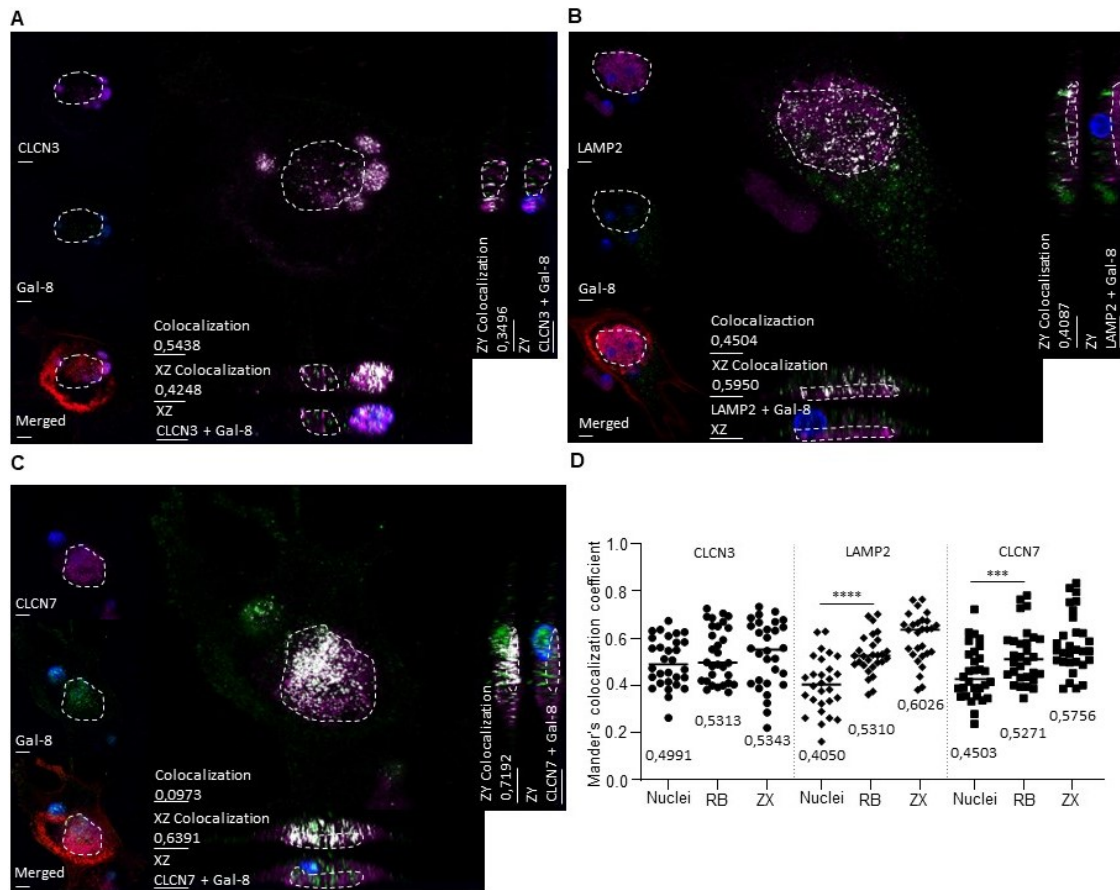


Supplemental Figure 3: Sequences of galectin-8 isoforms.

The colors of the amino acids are similar to those used for the prediction level of the models of Fig 7C

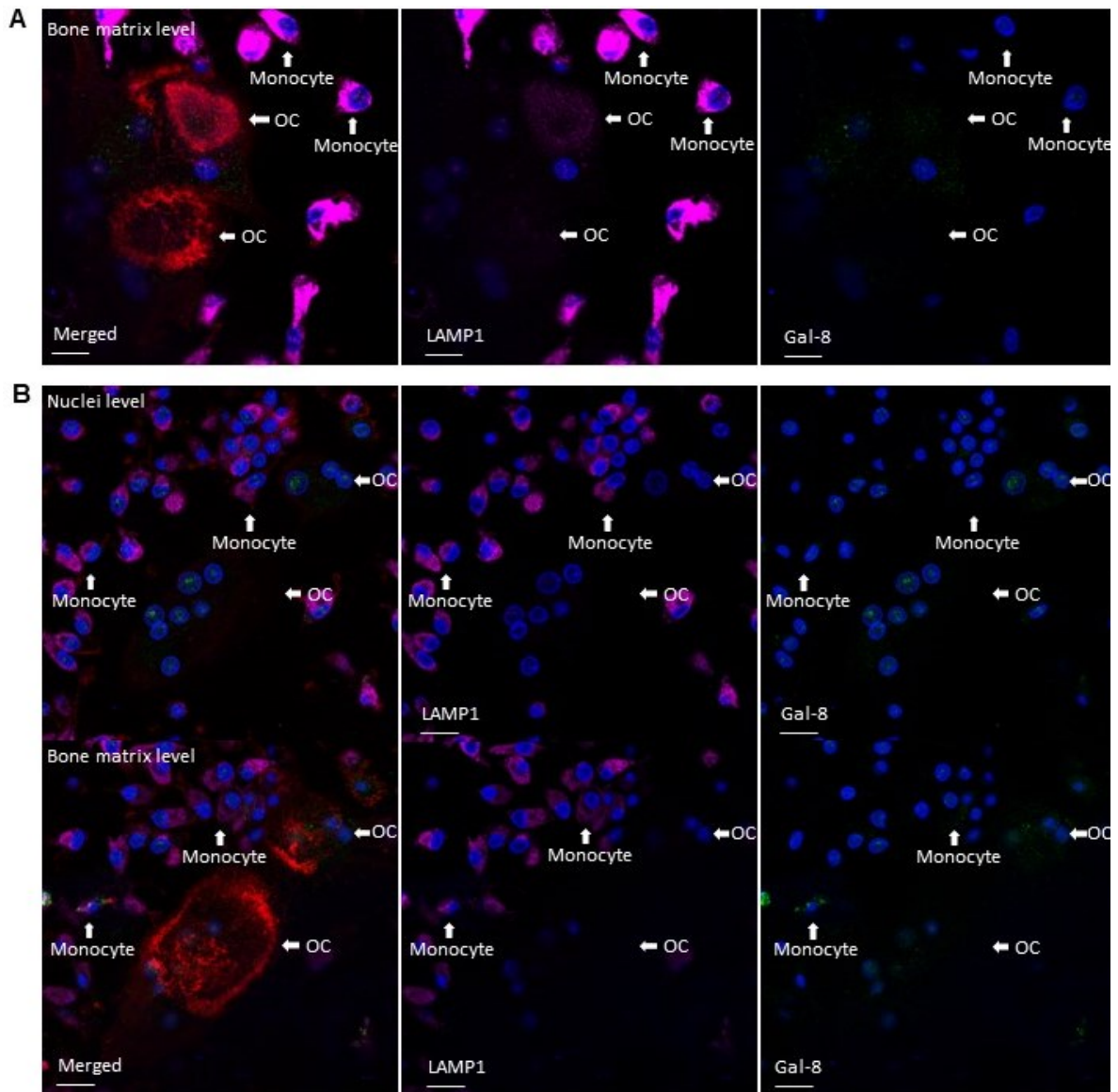
Adapted from Zhang, Moussodia and al., 2015

(<https://www.uniprot.org/uniprotkb/O00214/entry>).



Supplemental Figure 4: Analyses of colocalisation between galectin-8 and its interacting partners.

Using LasX software, Mander's colocalization coefficient was evaluated at the nuclei level, the ruffle border and on orthogonal reconstruction. ROI are represented by region delimited by dashed lines. (A) Optical section at bone matrix level is shown as well as orthogonal reconstructions with their respective colocalization overlay of CLCN3 and galectin-8 (scale bar = 10 μ M). (B) LAMP2 and galectin-8 expression at the bone matrix level is shown with orthogonal reconstruction of the presented cell with their respective colocalization overlay (scale bar = 10 μ M). (C) Optical sections of galectin-8 and CLCN7 expression at the bone matrix level are presented with their respective colocalization overlay (scale bar = 10 μ M). (D) The graph represents Mander's colocalization coefficient at the optical section of the nuclei level, the ruffle border (RB) as well as the ruffle border of the orthogonal reconstruction (ZX). Computed for 3 independent experiments of 10 osteoclasts. T-test of nuclei vs RB, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.



Supplemental Figure 5: Galectin-8 and LAMP1 expression in a heterogeneous cell culture of mononucleated and multinucleated cells.

At D21, osteoclasts were double-stained using antibody against galectin-8 (green) and LAMP1 (magenta). F-actin was stained (red) to highlight resorptive osteoclast. Cells were also counterstained with DAPI to identify monocytes and osteoclasts for images acquisition. (A) Optical section at bone matrix level of monocytes and two osteoclasts with sealing zone representing active osteoclasts but just one faintly expressing LAMP1 compared to monocytes (scale bar = 10 μ M). (B) Optical sections at nuclei level and bone matrix level are shown of monocytes and osteoclasts (scale bar = 10 μ M). Most monocytes are expressing LAMP1 while no osteoclast are expressing LAMP1. About 1/10 osteoclast expressed LAMP1 with the signal being less than in monocytes.

Supplemental Table 1: Interactome of the short and long galectin-8 isoforms

Prey	SAINTexpress score		Interactor	GO: BP	References
	LGAL8L	LGAL8S			
ABCC1	1.0	1.0	Shared	Vascular process in circulatory system; Cellular response to peptide; Vascular transport; Transport across blood-brain barrier; Organic molecule transport; Response to amyloid-beta; Vascular transport	15; 16; 17
ABCC4	1.0	0.87	Shared	Vascular process in circulatory system; Vascular transport; Transport across blood-brain barrier; Organic molecule transport; Platelet degranulation; Vascular transport	15; 16; 17
APP	1.0	0.97	Shared	Regulation of synaptic transmission; Cellular response to peptide; Organization of extracellular structure components; Spontaneous synaptic transmission; Cognitive activity; Response to amyloid-beta; Cell junction assembly; Platelet degranulation; Neuron recognition; Cell recognition	--
ATG9A	0.99	1.0	Shared	--	15; 16; 17
BSG	0.77	0.96	Shared	Cell recognition; Organization of extracellular structure components; Dendrite self-avoidance; Virus host interaction; Cellular adhesion via plasma membrane adhesion molecules; Neuron recognition; Symbiont host interaction	8; 10
CADM1	0.97	1.0	Shared	Cell recognition; Cellular adhesion via plasma membrane adhesion molecules	--
CD320	0.81	0.97	Shared	--	--
CLCN3	1.0	1.0	Shared	--	15; 16; 17
CLCN7*	0.0	0.74	Specific to LGALS8.Short	--	15; 16; 17
CPD	1.0	1.0	Shared	--	--
ECE1	0.99	1.0	Shared	Vascular process in circulatory system	15; 16; 17
ITGA4	0.0	1.0	Specific to LGALS8.Short	Cellular response to peptide; Organization of extracellular structure components; Activities mediated by integrin; Heterotypic cell-cell adhesion; Import into the cell across plasma membrane; Response to amyloid-beta	13; 15; 16; 17
ITGA5	0.5	1.0	Specific to LGALS8.Short	Organization of extracellular structure components; Negative regulation of anoikis; CD40 signaling pathway; Virus host interaction; Activities mediated by integrin; Cognitive activity; Heterotypic cell-cell adhesion; Cellular adhesion via plasma membrane adhesion molecules; Cell junction assembly; Symbiont host interaction	3; 4; 5; 11; 13; 14; 15; 16; 17
ITGB1	1.0	1.0	Shared	Regulation of synaptic transmission; Organization of extracellular structure components; Negative regulation of anoikis; Organic molecule transport; CD40 signaling pathway; Spontaneous synaptic transmission; Virus host interaction; Activities mediated by integrin; Heterotypic cell-cell adhesion; Import into the cell across plasma membrane; Cellular adhesion via plasma membrane adhesion molecules; Symbiont host interaction	2; 3; 4; 5; 6; 7; 9; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17

*Not included in Figure 7-B; Gene in bold are related to osteoclast biology

Supplemental Table 1. Continued

Prey	SAINTexpress score		Interactor	GO: BP	References
	LGAL8L	LGAL8S			
LAMP1	0.0	0.99	Specific to LGALS8.Short	Virus host interaction; Symbiont host interaction	15; 16; 17
LAMP2	1.0	1.0	Shared	Platelet degranulation	1; 15
LGALS3BP	0.96	0.95	Shared	Platelet degranulation	10; 15
LNPEP	1.0	1.0	Shared	---	15; 16; 17
LRRC4B	1.0	1.0	Shared	Cellular adhesion via plasma membrane adhesion molecules; Cell junction assembly	15; 16; 17
M6PR	0.34	1.0	Specific to LGALS8.Short	---	---
MFAP3	0.96	1.0	Specific to LGALS8.Short	---	15; 16; 17
NCSTN	0.34	1.0	Specific to LGALS8.Short	Cell recognition; Regulation of synaptic transmission; Cognitive activity	---
NELFCD	0.65	0.96	Specific to LGALS8.Short	---	---
NPTN	0.97	1.0	Shared	Regulation of synaptic transmission; Dendrite self-avoidance; Cognitive activity; Cellular adhesion via plasma membrane adhesion molecules; Cell junction assembly; Neuron recognition	15
PTGFRN	0.0	1.0	Specific to LGALS8.Short	---	10; 15; 16; 17
PTPRA	0.96	0.97	Shared	Cellular response to peptide; Activities mediated by integrin; Cell junction assembly	15; 16; 17
SLC12A9	0.96	1.0	Shared	Regulation of synaptic transmission; Import into the cell across plasma membrane	15; 16; 17
SLC17A5	0.0	0.95	Specific to LGALS8.Short	Organic molecule transport	15; 16; 17
SLC1A5	1.0	0.99	Shared	Vascular process in circulatory system; Transport across blood-brain barrier; Organic molecule transport; Virus host interaction; Import into the cell across plasma membrane; Symbiont host interaction; Vascular transport	---
SLC39A14	0.93	0.84	Shared	Cellular response to peptide; Vascular transport; Import into the cell across plasma membrane	---
SUSD5	1.0	1.0	Shared	---	15; 16; 17
TPBG	0.0	0.99	Specific to LGALS8.Short	Cognitive activity; Cell junction assembly	---

Gene in bold are related to osteoclast biology

All proteins interacting with galectin-8 isoforms and selected in our analysis according to the interacting scores determined by SAINTexpress (at least 0.9 to validate an interaction with one isoform, and greater than 0.7 with the other isoform to qualify common partners) have been represented, indicating the SAINTexpress score for each isoform, the type of interaction (shared or specific), and detailing the associated metabolic pathways (GO: BP). References used in this table are listed below.

References

1. Bell, S.L., Lopez, K.L., Cox, J.S., Patrick, K.L., Watson, R.O., 2021. Galectin-8 Senses Phagosomal Damage and Recruits Selective Autophagy Adapter TAX1BP1 To Control Mycobacterium tuberculosis Infection in Macrophages. *mBio* 12, e01871-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01871-20>
2. Boura-Halfon, S., Voliovitch, H., Feinstein, R., Paz, K., Zick, Y., 2003. Extracellular Matrix Proteins Modulate Endocytosis of the Insulin Receptor *. *J. Biol. Chem.* 278, 16397–16404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212385200>
3. Cárcamo, C., Pardo, E., Oyanadel, C., Bravo-Zehnder, M., Bull, P., Cáceres, M., Martínez, J., Massardo, L., Jacobelli, S., González, A., Soza, A., 2006. Galectin-8 binds specific $\beta 1$ integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Exp. Cell Res.* 312, 374–386. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.025>
4. Chen, W.-S., Cao, Z., Sugaya, S., Lopez, M.J., Sendra, V.G., Laver, N., Leffler, H., Nilsson, U.J., Fu, J., Song, J., Xia, L., Hamrah, P., Panjwani, N., 2016. Pathological lymphangiogenesis is modulated by galectin-8-dependent crosstalk between podoplanin and integrin-associated VEGFR-3. *Nat. Commun.* 7, 11302. <https://doi.org/10.1038/ncomms11302>
5. Diskin, S., Cao, Z., Leffler, H., Panjwani, N., 2009. The role of integrin glycosylation in galectin-8-mediated trabecular meshwork cell adhesion and spreading. *Glycobiology* 19, 29–37. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn100>
6. Diskin, S., Chen, W.-S., Cao, Z., Gyawali, S., Gong, H., Soza, A., González, A., Panjwani, N., 2012. Galectin-8 Promotes Cytoskeletal Rearrangement in Trabecular Meshwork Cells through Activation of Rho Signaling. *PLoS ONE* 7, e44400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044400>
7. Hadari, Y.R., Arbel-Goren, R., Levy, Y., Amsterdam, A., Alon, R., Zakut, R., Zick, Y., 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J. Cell Sci.* 113, 2385–2397. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.13.2385>
8. Jia, J., Abudu, Y.P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S.W., Peters, R., Mudd, M.H., Allers, L., Salemi, M., Phinney, B., Johansen, T., Deretic, V., 2018. Galectins Control MTOR in Response to Endomembrane Damage. *Mol. Cell* 70, 120-135.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.009>
9. Levy, Y., Arbel-Goren, R., Hadari, Y.R., Eshhar, S., Ronen, D., Elhanany, E., Geiger, B., Zick, Y., 2001. Galectin-8 Functions as a Matricellular Modulator of Cell Adhesion *. *J. Biol. Chem.* 276, 31285–31295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100340200>
10. Lo, Y.-H., Li, C.-S., Chen, H.-L., Chiang, C.-Y., Huang, C.-C., Tu, T.-J., Lo, T.-H., Choy, D.F., Arron, J.R., Chen, H.-Y., Liu, F.-T., 2021. Galectin-8 Is Upregulated in Keratinocytes by IL-17A and Promotes Proliferation by Regulating Mitosis in Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 141, 503-511.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.07.021>
11. Pardo, E., Barake, F., Godoy, J.A., Oyanadel, C., Espinoza, S., Metz, C., Retamal, C., Massardo, L., Tapia-Rojas, C., Inestrosa, N.C., Soza, A., González, A., 2019. GALECTIN-8 Is a Neuroprotective Factor in the Brain that Can Be Neutralized by Human Autoantibodies. *Mol. Neurobiol.* 56, 7774–7788. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1621-3>

12. Shatz-Azoulay, H., Vinik, Y., Isaac, R., Kohler, U., Lev, S., Zick, Y., 2020. The Animal Lectin Galectin-8 Promotes Cytokine Expression and Metastatic Tumor Growth in Mice. *Sci. Rep.* 10, 7375. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64371-z>
13. Yamamoto, H., Nishi, N., Shoji, H., Itoh, A., Lu, L.-H., Hirashima, M., Nakamura, T., 2008. Induction of Cell Adhesion by Galectin-8 and its Target Molecules in Jurkat T-Cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 143, 311–324. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm22>
14. Zamorano, P., Koning, T., Oyanadel, C., Mardones, G.A., Ehrenfeld, P., Boric, M.P., González, A., Soza, A., Sánchez, F.A., 2019. Galectin-8 induces endothelial hyperpermeability through the eNOS pathway involving S-nitrosylation-mediated adherens junction disassembly. *Carcinogenesis* 40, 313–323. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz002>

Database

15. Oughtred, R., Stark, C., Breitkreutz, B.-J., Rust, J., Boucher, L., Chang, C., Kolas, N., O'Donnell, L., Leung, G., McAdam, R., Zhang, F., Dolma, S., Willems, A., Coulombe-Huntington, J., Chatr-aryamontri, A., Dolinski, K., Tyers, M., 2019. The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res* 47, D529–D541. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1079>
16. Huttlin, E.L., Bruckner, R.J., Navarrete-Perea, J., Cannon, J.R., Baltier, K., Gebreab, F., Gygi, M.P., Thornock, A., Zarraga, G., Tam, S., Szpyt, J., Gassaway, B.M., Panov, A., Parzen, H., Fu, S., Golbazi, A., Maenpaa, E., Stricker, K., Thakurta, S.G., Zhang, T., Rad, R., Pan, J., Nusinow, D.P., Paulo, J.A., Schweppe, D.K., Vaites, L.P., Harper, J.W., Gygi, S.P., 2021. Dual Proteome-scale Networks Reveal Cell-specific Remodeling of the Human Interactome. *Cell* 184, 3022-3040.e28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.011>
17. Del Toro, N., Shrivastava, A., Ragueneau, E., Meldal, B., Combe, C., Barrera, E., Perfetto, L., How, K., Ratan, P., Shirodkar, G., Lu, O., Mészáros, B., Watkins, X., Pundir, S., Licata, L., Iannuccelli, M., Pellegrini, M., Martin, M.J., Panni, S., Duesbury, M., Vallet, S.D., Rappsilber, J., Ricard-Blum, S., Cesareni, G., Salwinski, L., Orchard, S., Porras, P., Panneerselvam, K., Hermjakob, H., 2021. The IntAct database: efficient access to fine-grained molecular interaction data. *Nucleic Acids Res* 50, D648–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1006>

Supplemental Table 2: CRD ratios

Peptides	LGALS8S			LGALS8L		
	Sample 1	Sample 3	Mean	Sample 1	Sample 3	Mean
N-CRD (18)						
ADVAHFHNPR	2	2	2	2	2	2
AGCIVCNTLINEK	2	2	2	2	2	2
DKFQVAVNGK	1	1	1	1	1	1
DKFQVAVNGKHTLLYGHR	1	1	1	0	0	0
EEITYDTPFK	1	1	1	1	1	1
EEITYDTPFKR	2	3	2.5	2	2	2
EKSFEIVIMVLK	3	4	3.5	2	4	3
EKSFEIVIMVLKDK	2	2	2	2	2	2
FQVAVNGK	1	1	1	1	1	1
HTLLYGHR	3	4	3.5	4	2	3
IDTLGIYGK	3	3	3	2	3	2.5
IGPEKIDTLGIYGK	2	3	2.5	3	2	2.5
RAGCIVCNTLINEK	4	3	3.5	2	3	2.5
SFEIVIMVLK	2	2	2	2	2	2
SFEIVIMVLKDK	1	1	1	1	1	1
SFEIVIMVLKDKFQVAVNGK	2	2	2	2	2	2
WGREEITYDTPFK	2	3	2.5	2	2	2
WGREEITYDTPFKR	7	6	6.5	4	4	4
	score N-CRD 2.361111			score N-CRD 2.088235		
C-CRD (16)						
DIALHLNPR	4	2	3	3	2	2.5
EFKVAVNGVHSLEYK	1	1	1	0	1	1
ELSSIDTLEINGDIHLLEVR	2	3	2.5	2	2	2
ELSSIDTLEINGDIHLLEVRSW	1	1	1	0	1	1
FKELSSIDTLEINGDIHLLEVR	33	32	32.5	13	24	18.5
GEVNANAKSFNVDLLAGK	2	2	2	2	2	2
LNIKAFVR	2	2	2	2	2	2
LNTPMGPGR	2	4	3	3	2	2.5
LNTPMGPGRVTVVVKGEVNANAK	1	0	1	0	0	0
NITSPFPSPGMYFEMIIYCDVR	7	7	7	5	6	5.5
NSFLQESWGEEER	5	6	5.5	4	4	4
SFNVDLLAGK	4	3	3.5	2	3	2.5
SFNVDLLAGKSK	1	1	1	1	2	1.5
SKDIALHLNPR	2	3	2.5	2	3	2.5
TVVVKGEVNANAK	5	3	4	3	4	3.5
VAVNGVHSLEYK	2	2	2	2	2	2
	score C-CRD 4.59375			score C-CRD 3.533333		
	LGALS8S			N-CRD/C-CRD = 0.513983		
	LGALS8L			N-CRD/C-CRD = 0.59101		

Supplemental Table 3: Grouping of GO terms

MF: Molecular function
<i>Transmembrane transporter activity:</i> GO:0022804 (active transmembrane transporter activity) GO:0022853 (active ion transmembrane transporter activity) GO:0008509 (anion transmembrane transporter activity) GO:0140359 (ABC-type transporter activity) GO:0015291 (secondary active transmembrane transporter activity) GO:0015293 (symporter activity) GO:0042626 (ATPase-coupled transmembrane transporter activity) GO:0015399 (primary active transmembrane transporter activity) GO:0015562 (efflux transmembrane transporter activity) GO:0015296 (anion:cation symporter activity) GO:0090482 (vitamin transmembrane transporter activity) GO:0042910 (xenobiotic transmembrane transporter activity)
KEGG terms ID
<i>Cardiomyopathy:</i> hsa05412 (Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)) hsa05410 (Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)) hsa05414 (Dilated cardiomyopathy).
BP: Biological process
<i>Symbiont host interaction:</i> GO:0044409 (entry into host) GO:0052126 (movement in host environment) GO:0051701 (biological process involved in interaction with host)
<i>Import into the cell across plasma membrane:</i> GO:0098657 (import into cell) GO:0098739 (import across plasma membrane)
<i>Cognitive activity:</i> GO:0007611 (learning or memory) GO:0050890 (cognition) GO:0008306 (associative learning)
<i>Response to amyloid-beta:</i> GO:1904646 (cellular response to amyloid-beta) GO:1904645 (response to amyloid-beta)
<i>Regulation of synaptic transmission:</i> GO:1900271 (regulation of long-term synaptic potentiation) GO:0060291 (long-term synaptic potentiation) GO:0050804 (modulation of chemical synaptic transmission) GO:0099177 (regulation of trans-synaptic signaling)
<i>Activities mediated by integrin:</i> GO:0033631 (cell-cell adhesion mediated by integrin) GO:0007229 (integrin-mediated signaling pathway) GO:0033627 (cell adhesion mediated by integrin)
<i>Virus host interaction:</i> GO:0046718 (viral entry into host cell) GO:0019058 (viral life cycle)
<i>Cellular adhesion via plasma membrane adhesion molecules:</i> GO:0098742 (cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules) GO:0007156 (homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules)
<i>Organization of extracellular structure components:</i> GO:0030198 (extracellular matrix organization) GO:0043062 (extracellular matrix organization) GO:0045229 (external encapsulating structure organization)
<i>Cell junction assembly:</i> GO:0034329 (cell junction assembly) GO:190188 (regulation of cell junction assembly)

Supplemental Table 4: Immunoblot antibodies information

Antigen	Catalog #	Host	Clonality	Supplier	Dilution
Galectin-8	sc-377133	Mouse	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	1/1000
Actin	A2066	Rabbit	Polyclonal	Sigma-Aldrich (Millipore Sigma)	1/4000
Phospho-ULK1 Ser ⁷⁵⁷	6888	Rabbit	Polyclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
ULK1	8054	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-p70 S6 Kinase Thr ²²⁹	44-918G	Rabbit	Polyclonal	Invitrogen (ThermoFisher Scientific)	1/1000
p70 S6 Kinase	2708	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
LC3B	2775	Rabbit	Polyclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-4EBP1 Thr ^{37/46}	2855	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Non-Phospho-4EBP1 Thr ⁴⁶	4923	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-RPTOR Ser ⁷⁹²	2083	Rabbit	Polyclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
RPTOR	2280	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-PDK1 Ser ²⁴¹	3438	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
PDK1	5662	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-AMPKa Thr ¹⁷²	2535	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
AMPKa	5832	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-AKT1 Ser ⁴⁷³	4060	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
AKT1	4691	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/1000
Phospho-ERK1/2 Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴	4370	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/2000
ERK1/2	4695	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/2000
Flag epitope	F7425	Rabbit	Polyclonal	Millipore (Millipore Sigma)	1/2000

Supplemental Table 5: Immunofluorescence antibodies information

Antigen	Catalog #	Host	Clonality	Supplier	Dilution
Galectin-8	HPA012734	Rabbit	Polyclonal	Sigma-Aldrich (Millipore Sigma)	1/50
Galectin-8	MAB13051	Mouse	Monoclonal	R&D Systems (Bio-technie)	1/50
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	A12379	---	---	Invitrogen (ThermoFisher Scientific)	1/150
CLCN3	13359S	Rabbit	Monoclonal	Cell Signaling Technology	1/50
CLCN7	HPA043019	Rabbit	Polyclonal	Sigma-Aldrich (Millipore Sigma)	1/100
LAMP1	sc-18821	Mouse	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	1/50
LAMP2	sc-18822	Mouse	Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	1/100

Supplemental Table 6: Sequences of small interfering RNAs (DsiRNA, siRNA)

DsiRNA	Sequences	Nucleotides
Galectin-8 DsiRNA #1	5' - GUC CUU AAA CAA CCU ACA GAA UAT C - 3' 3' - AAC AGG AAU UUG UUG GAU GUC UUA UAG - 5'	231-256
Galectin-8 DsiRNA #2	5' - CGC CUG AAU AUU AAA GCA UUU GUA A - 3' 3' - GUG CGG ACU UAU AAU UUC GUA AAC AUU - 5'	919-944 (Short isoform CDS) 1045-1070 (Long isoform CDS)
Negative control DsiRNA	5' - CGU UAA UCG CGU AUA CGC GUA T - 3' 3' - CAG CAA UUA GCG CAU AUU AUG CGC AUA - 5'	---
Long galectin-8 siRNA	5' - UCU UGG UGU AGA CAG UUC UGG - 3' 3' - CG AGA ACC ACA UCU GUC AAG A - 5'	586-609 (Long isoform CDS)
Short galectin-8 siRNA	5' - UGG CAG CCU AAG CUG GGG CGU - 3' 3' - UU ACC GUC GGAU UCG ACC CCG - 5'	537-560 (Short isoform CDS)
Allstars negative control siRNA	Sequence not provided by the manufacturer(Qiagen catalog # 1027280)	---

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les diverses fonctions de l'ostéoclaste mature font appel au système endomembranaire et au trafic vésiculaire de multiples façons dont le transport des lysosomes sécrétoires et leur fusion avec la membrane plasmique adjacente à l'os lors de la résorption osseuse ainsi que l'endocytose des produits de dégradation, leur transcytose et leur exocytose au domaine sécrétoire fonctionnel. (Coxon et Taylor, 2008; Roy et Roux, 2018) En plus du trafic vésiculaire, l'assemblage et le désassemblage constant des podosomes ainsi que le réarrangement du cytosquelette permettent à l'ostéoclaste d'alterner entre sa position fixe pour effectuer la résorption et sa migration vers un autre site. (Georgess et al., 2014) Malgré des fonctions établies dans ces différents processus cellulaires, les rabGAPs et les galectines ont fait l'objet de peu d'études dans l'ostéoclaste et leurs fonctions sont jusqu'à maintenant peu connues dans cette cellule. (Frasa et al., 2012; Johannes et al., 2018)

Nos travaux ont montré l'implication des deux protéines d'intérêt du projet de recherche, TBC1D25 et la galectine-8, dans plusieurs aspects de l'ostéoclaste mature. Les résultats présentés au chapitre 2 suggèrent une implication directe de TBC1D25 dans la régulation de la résorption osseuse par sa localisation à la zone de scellement et dans une moindre mesure à la membrane plissée des ostéoclastes actifs. De plus, la réduction de l'expression de TBC1D25 diminue la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes humains. Finalement, une diminution de la multinucléarité des ostéoclastes a aussi été observée lors de la diminution de l'expression de TBC1D25 suggérant son implication dans la régulation d'autres aspects de l'ostéoclaste mature que son activité de résorption. Les résultats du chapitre 3 montrent que la galectine-8 est distribuée dans l'ensemble du cytoplasme des ostéoclastes actifs en plus de localiser à la membrane plissée. La réduction de l'expression de la galectine-8 ainsi que de celle de son isoforme courte diminue la capacité de résorption des ostéoclastes humains. Vu sa localisation, la galectine-8 pourrait donc avoir un rôle direct dans la régulation de la résorption osseuse. De plus, la galectine-8 pourrait réguler indirectement la résorption osseuse par son implication dans la régulation de la signalisation de ERK1/2, MTORC1 et de l'autophagie puisqu'une diminution de la signalisation des deux kinases et une augmentation de l'initiation de l'autophagie ont été observées lors de la réduction de la galectine-8. Finalement, la galectine-8 et ses isoformes pourraient réguler de nombreuses manières l'ostéoclaste mature vu ses multiples partenaires d'interaction qui sont des protéines lysosomales

(CLCN7, CLCN3, LAMP1, LAMP2, GLMP), des protéines d'adhésion (ITGB1, ITGA4, ITGA5, TPGB, CADM1) et des récepteurs membranaires (M6PR, PTGFRN).

La section suivante apporte des réflexions complémentaires à celles qui ont été discutées dans les chapitres 2 et 3. Les réflexions complémentaires au chapitre 2, concernant le rôle de *TBC1D25* dans l'ostéoclaste humain, sont accompagnées de quelques résultats non publiés, de travaux qui n'ont pas pu être terminés faute de temps.

4.1 Effet de l'épissage alternatif et le rôle de l'isoforme courte

Le laboratoire de Dre Roux avait précédemment identifié des événements d'épissages alternatifs de *TBC1D25* et *LGALS8* dans les ostéoclastes pagétiques. Dans les deux cas, une diminution du PSI a été observée indiquant une diminution de l'expression de l'isoforme longue. (Klinck et al., 2014) L'un des principaux objectifs de l'étude était donc de déterminer l'effet de l'altération de l'épissage alternatif sur le phénotype de l'ostéoclaste humain.

4.1.1 Le rôle de l'isoforme courte de *TBC1D25*

L'épissage alternatif de *TBC1D25* peut produire la protéine canonique de 688 aa, qui contient les domaines fonctionnels, et une protéine de 100 aa, qui ne contient aucun domaine fonctionnel connu. La séquence d'acides aminés de l'isoforme courte suggère que la protéine n'a pas de rôle fonctionnel et permet la régulation négative de la forme active de la protéine.

Une séquence d'acides aminés est proposée par la base de données *UniProt* pour l'isoforme courte de *TBC1D25* (identifiant Q3MII6-2) suggérant son expression protéique. Cependant, malgré plusieurs tentatives avec différentes approches telles que la production d'un anticorps reconnaissant spécifiquement l'isoforme courte (Roy et Roux, 2017) et la production de la construction de l'isoforme courte (BC125089.1) avec un épitope Flag permettant sa surexpression et sa détection avec un anticorps fonctionnel dirigé vers l'épitope, nous n'avons pas été en mesure de détecter l'expression protéique de l'isoforme courte de *TBC1D25*. De plus, la séquence en acides aminés est basée sur le projet *The National Institutes of Health's Mammalian Gene Collection*, qui n'a pas confirmé l'expression protéique des séquences codantes des gènes humains identifiés. ("The Status, Quality, et Expansion of the NIH Full-Length cDNA Project," 2004)

Lors de l'épissage alternatif, l'exclusion d'un exon est l'un des événements qui peuvent introduire un codon d'arrêt prématuré, comme il est observé dans la séquence codante de l'isoforme courte. Comme mentionné précédemment, l'intégration d'un codon d'arrêt prématuré peut mener au mécanisme de contrôle NMD. Bien que ce ne soient pas tous les transcrits possédant un codon

d'arrêt prématuré qui subissent ce processus, il est fréquent que l'épissage alternatif régule l'expression d'un gène par ce processus. (Nickless et al., 2017; Wright et al., 2022) Il est donc possible que le transcrit de l'isoforme courte subisse la dégradation par NMD.

L'émergence de la bio-informatique a permis de développer des outils de prédiction pour annoter le génome et les transcrits pouvant subir cette dégradation. En général, un transcrit subit la NMD si le codon d'arrêt est plus de 50 nucléotides après la jonction de deux exons, mais il existe des exceptions. (Hsu et al., 2017) Vu les caractéristiques du transcrit de l'isoforme courte de *TBC1D25*, *Ensembl* (Identifiant ENST00000481090.6) prédit que le transcrit subit la NMD. (Cunningham et al., 2022) Cette information ne nous était pas connue au moment de faire les travaux présentés au chapitre 2 et nous avons concentré nos efforts sur la détection de l'expression protéique de l'isoforme courte. Nous n'avons donc pas confirmé au niveau expérimental que l'isoforme courte de *TBC1D25* subit effectivement la NMD. Pour s'assurer que le transcrit de l'isoforme courte ne soit pas l'exception qui confirme la règle, la confirmation expérimentale serait possible par la quantification de l'expression du transcrit de l'isoforme courte de *TBC1D25* en présence et en absence d'un inhibiteur de NMD tel que l'anisomycine. Une augmentation de son expression en présence de l'inhibiteur confirmerait la dégradation du transcrit avant sa traduction. (Häuser et al., 2020) Cette technique permettrait de conclure définitivement sur la régulation de l'expression de la forme active de *TBC1D25* par l'épissage alternatif. Cependant, tout porte à croire que l'isoforme longue est la seule forme protéique de *TBC1D25*. L'isoforme longue sera donc référée par *TBC1D25* par la suite.

4.1.2 L'isoforme courte de *LGALS8*

L'épissage alternatif de *LGALS8* peut produire la protéine canonique de 317 aa et l'isoforme longue de 359 aa. Les deux isoformes possèdent les mêmes CRDs leur donnant la capacité de lier les glycanes mais leur taille varie en raison de la longueur de leur peptide de liaison dont celui de l'isoforme longue est composé de 42 aa supplémentaires. (Bidon et al., 2001a) Nous avons été en mesure de confirmer l'expression des deux isoformes ainsi que d'évaluer leurs fonctions dans l'ostéoclaste humain.

Comme les deux isoformes possèdent les domaines fonctionnels, il n'est pas surprenant que la plupart des fonctions de la galectine-8 identifiées dans notre étude soient communes aux deux isoformes. Il est cependant possible que nous n'ayons pas été en mesure d'identifier toutes les fonctions de l'isoforme courte. Notre modèle cellulaire comporte des avantages, mais aussi

quelques inconvénients. L'un de ces inconvénients est la difficulté de transfecter les ostéoclastes humains. (Laitala-Leinonen, 2005) Nous avons été en mesure de mettre au point un protocole de transfection des ostéoclastes humains qui n'affecte pas leur viabilité. Cependant, pour certaines protéines, telles que l'isoforme courte de la galectine-8, une diminution moindre est observée, mais jugée suffisante vu la difficulté de la procédure dans ce modèle. Une diminution de l'expression de l'isoforme courte d'environ 64% a été observée qui produit seulement une faible variation du profil d'expression des isoformes. Cette variation est toutefois suffisante pour induire des changements significatifs au niveau de la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes. Avec nos résultats, il est possible d'affirmer que l'isoforme courte est la forme dont les fonctions sont prédominantes dans la résorption osseuse de l'ostéoclaste humain. La diminution de l'expression de l'isoforme longue étant plus importante, il est peu probable que l'expression résiduelle de l'isoforme longue soit en mesure de maintenir la capacité de résorption des ostéoclastes. De plus, la diminution de l'expression globale de la galectine-8 lors de l'inhibition de l'une ou l'autre des isoformes est similaire. Les effets de la diminution de l'isoforme courte ne peuvent donc pas être attribués à la diminution de l'expression globale de la galectine-8. Nos résultats permettent donc d'affirmer que l'altération de l'épissage alternatif de *LGALS8* pourrait contribuer au phénotype de l'ostéoclaste pagétique par l'augmentation de l'expression de l'isoforme courte alors que la diminution de l'expression de l'isoforme longue n'affecterait pas directement la cellule. Selon les résultats de notre étude, la taille du peptide de liaison de l'isoforme courte favorise son interaction avec un plus grand nombre de partenaires d'interaction. Même si la plupart des fonctions de la galectine-8 sont communes aux deux isoformes, ces fonctions pourraient aussi contribuer au phénotype de l'ostéoclaste pagétique comme une augmentation de l'expression relative de la galectine-8 avait aussi été observée chez l'ostéoclaste pagétique. (Klinck et al., 2014)

4.2 Rôle dans l'autophagie

La régulation de l'autophagie est essentielle à l'ostéoclaste. L'autophagie basale est nécessaire à l'homéostasie de la cellule qui dégrade les protéines et organites défectueux en plus de fournir des nutriments à la cellule via les produits de la dégradation. (Montaseri et al., 2020) Cependant, l'augmentation de l'autophagie en réponse à différents stimuli diminue l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse. (Dai et al., 2017; Tong et al., 2019) TBC1D25 et la galectine-8 sont impliqués dans la régulation de l'autophagie dans d'autres types cellulaires. (Itoh et al., 2011; Jia et al., 2018; Thurston et al., 2012) Vu la contribution d'un défaut de l'autophagie dans le phénotype des

ostéoclastes pagétiques, nous avons défini leur rôle dans la régulation du processus dans l'ostéoclaste humain sain. (Gennari et al., 2022; McManus et al., 2016)

4.2.1 TBC1D25 et l'autophagie dans l'ostéoclaste humain

Le rôle le mieux défini de TBC1D25 est l'inactivation de son substrat, RAB33B, qui permet la régulation des étapes terminales de l'autophagie. (Itoh et al., 2011) L'un des objectifs de notre étude était donc de définir le rôle de TBC1D25 dans l'autophagie dans l'ostéoclaste humain. Cependant, ni l'initiation de l'autophagie ni le flux autophagique n'est altéré lors de la diminution de son expression. Il se peut que TBC1D25 joue un rôle redondant dans la régulation de l'autophagie et ne soit pas essentiel au maintien du processus dans l'ostéoclaste comme il a été montré que certaines rabs peut être activée par plusieurs rabGAPs. L'absence d'effet lors de la diminution de son expression pourrait aussi être lié au fait que l'impact de la diminution de TBC1D25 serait moins perceptible que lors de sa surexpression comme il a déjà été observé lors de l'étude de la variation de l'expression de certaines rabGAPs. (Frasa et al., 2012; Itoh et al., 2011) En effet, l'étude précédente, qui a identifié le rôle de TBC1D25 dans la maturation des autophagosomes, a observé un changement du flux autophagique seulement lors de la surexpression de TBC1D25. L'inhibition de la protéine dans cette étude n'a eu aucun effet sur le flux autophagique, que le groupe de recherche a attribué à l'expression résiduelle de TBC1D25 permettant de maintenir ses fonctions. (Itoh et al., 2011) Comme mentionné précédemment, les ostéoclastes humains sont difficiles à transfecter. Cette approche a permis la diminution d'environ 60% de l'expression protéique de TBC1D25. Une diminution plus importante serait souhaitable, mais cette diminution a été considérée comme acceptable compte tenu des difficultés de la procédure dans les ostéoclastes humains. Avec cette diminution, nous avons tout de même été en mesure d'identifier l'implication de TBC1D25 dans certaines fonctions de l'ostéoclaste. Toutefois, comme l'étude précédente, il est possible que nous n'ayons pas été en mesure d'identifier le rôle de TBC1D25 dans l'autophagie dans notre modèle en raison de l'expression protéique résiduelle d'environ 40 % qui serait suffisante pour le maintien de son rôle dans le processus.

Certaines protéines de l'autophagie sont strictement impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire associé à la résorption osseuse dans l'ostéoclaste, comme PLEKMH1, un effecteur de RAB7. Malgré un rôle établi dans l'autophagie dans d'autres types cellulaires, l'inhibition de PLEKMH1 n'altère pas le flux autophagique dans l'ostéoclaste, mais son interaction avec RAB7 est essentielle à la résorption osseuse. (Fujiwara et al., 2016; McEwan et al., 2015; Witwicka et al., 2015)

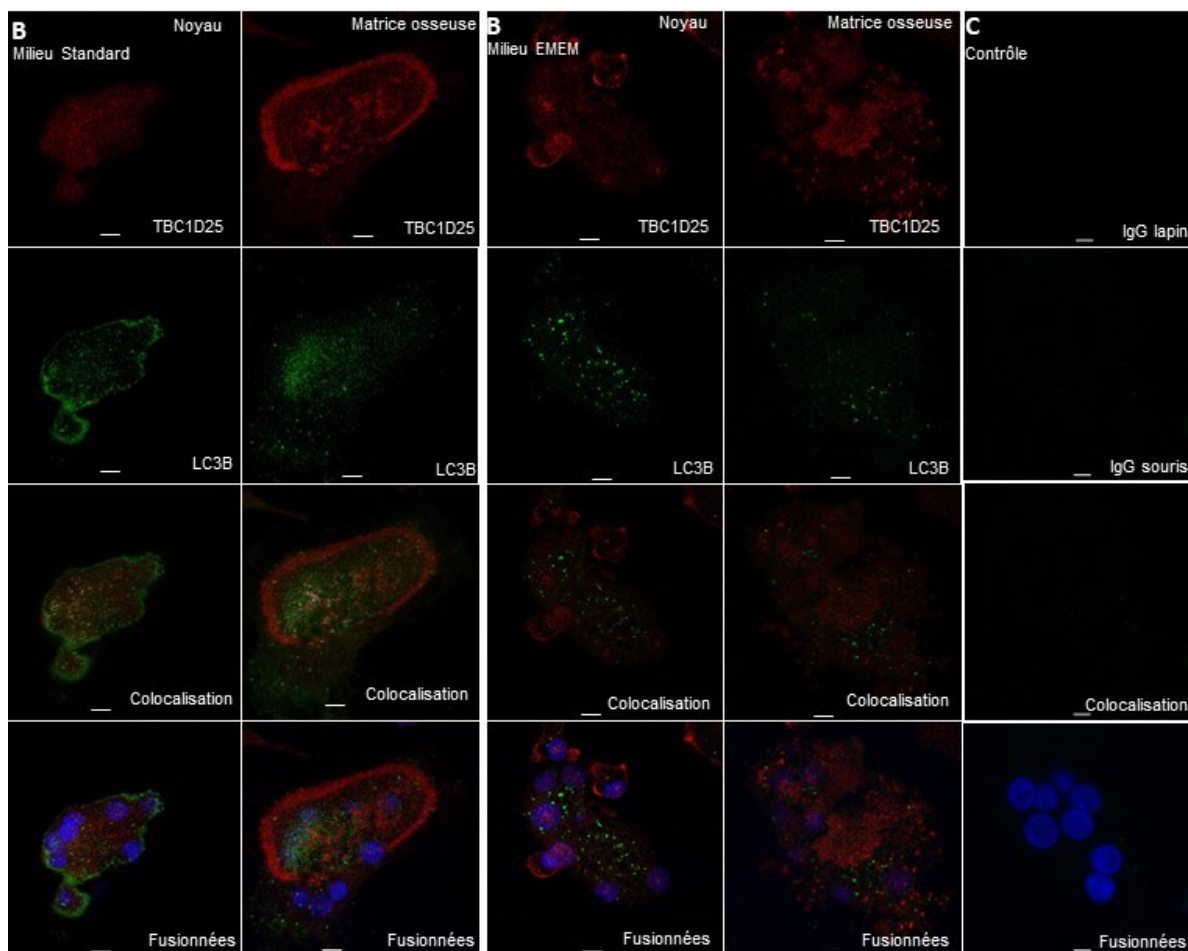


Figure 17: Localisation de TBC1D25 dans l'ostéoclaste actif en condition standard et lors de l'induction de l'autophagie

L'expression de TBC1D25 (rouge) et LC3B (vert), marqueur de l'autophagosome, est présentée au niveau des noyaux et près de la matrice osseuse dans les ostéoclastes cultivés dans le milieu standard (A) et placés dans le milieu EMEM pauvre en nutriments permettant l'induction de l'autophagie (B). Les contrôles appropriés d'immunofluorescence sont aussi présentés (C). Ces images ont été obtenues avec les méthodes décrites au chapitre 2 et sont représentatives de trois expériences indépendantes. Échelle = 10 μ m

Avec nos observations, il est probable que TBC1D25 soit strictement impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire associée à la résorption osseuse dans l'ostéoclaste humain. D'ailleurs, nos observations lors de l'évaluation de la localisation de TBC1D25 dans l'ostéoclaste en milieu standard comparée à sa localisation lors de l'initiation de l'autophagie dans l'ostéoclaste placé dans un milieu pauvre en nutriments appuient cette hypothèse. Lors de l'initiation de l'autophagie, il est possible d'observer un changement du motif d'expression de TBC1D25. Cependant, la protéine ne semble pas localisée aux autophagosomes, identifiés par LC3B. (Figure 17) La quantification de la colocalisation entre TBC1D25 et les autophagosomes serait toutefois nécessaire pour exclure définitivement un rôle pour TBC1D25 dans la régulation de l'autophagie. Nous pouvons tout de

même confirmer que l'accumulation des autophagosomes causée par un défaut dans les étapes terminales de l'autophagie dans l'ostéoclaste pagétique n'est pas attribuable à l'altération de l'épissage alternatif de TBC1D25. (McManus et al., 2016)

4.2.2 Régulation de MTORC1 par la galectine-8

Nous avons montré que notre seconde protéine d'intérêt, la galectine-8, régule la signalisation en amont de l'autophagie modulant ainsi son initiation dans l'ostéoclaste humain. En effet, la réduction de l'expression de la galectine-8 diminue la phosphorylation de la sérine 757 de ULK1, cible de MTOR, permettant l'activation du complexe ULK1 et son recrutement à la membrane d'isolation pour l'initiation de l'autophagie. (Gallagher and Chan, 2013; Jung et al., 2009; Kim et al., 2011) Comme souligné au chapitre 3, nos résultats sont toutefois quelque peu surprenants puisque, dans d'autres types cellulaires, la galectine-8 intracellulaire joue un rôle dans l'initiation de l'autophagie spécifiquement lors de dommages aux vésicules par un pathogène ou lors d'autres stress cellulaires. (Bell et al., 2021; Jia et al., 2018; Thurston et al., 2012) Par sa liaison aux glycanes exposés des vésicules endommagées, la galectine-8 favorise le recrutement de protéines impliquées dans l'autophagie sélective permettant l'initiation de l'autophagie. (Pied et al., 2022; Thurston et al., 2012) Les conditions expérimentales utilisées dans notre étude ne nous permettent pas de nous prononcer sur l'implication de la galectine-8 dans l'initiation de l'autophagie sélective dans ce contexte précis dans l'ostéoclaste. Cependant, la galectine-8 intracellulaire peut aussi initier l'autophagie lors de dommages aux vésicules par la modulation de son interaction avec MTOR. En condition normale, la galectine-8 est présente à la membrane des lysosomes et interagit directement avec MTOR. La perméabilisation de la membrane des vésicules diminue l'interaction des deux protéines ce qui favorise le départ de MTOR de la surface de la vésicule, son inactivation et l'initiation de l'autophagie. (Jia et al., 2018) Il est tentant de suggérer que la diminution de l'expression de la galectine-8 dans notre étude favorise aussi l'inactivation de MTOR causée par la diminution de sa localisation aux complexes de signalisation MTORC1 à la membrane des vésicules. Toutefois, l'étude précédente de Jia et ses collaborateurs n'a observé aucune diminution de la signalisation du complexe et aucune augmentation de l'autophagie lors de l'inhibition de l'expression de la galectine-8 en condition standard. (Jia et al., 2018) Le rôle des galectines varie d'un type cellulaire à un autre et même d'un contexte physiologique à un autre. Par exemple, la galectine-8 induit l'apoptose des lymphocytes T activés alors qu'elle favorise la prolifération des lymphocytes CD4⁺ naïfs. (Elola, 2014; Norambuena et al., 2009; Tribulatti et al., 2009) Il n'est donc pas impossible que la galectine-8 module l'initiation de l'autophagie par son interaction directe avec

MTOR, permettant sa stabilisation à la surface des vésicules et l'activation du complexe de signalisation MTORC1 dans l'ostéoclaste humain. Les niveaux de phosphorylation des substrats de MTORC1 dans notre étude confirment certainement qu'il y a une diminution de la signalisation du complexe favorisant l'initiation de l'autophagie lors de la diminution de la galectine-8. Il serait donc intéressant de déterminer s'il y a interaction entre la galectine-8 et MTOR dans l'ostéoclaste humain. (Figure 18)

Notre raisonnement derrière l'analyse du rôle de la galectine-8 dans l'autophagie était plutôt que la protéine module l'autophagie par la régulation de l'activation de ERK1/2 en amont de MTORC1. Un second rôle de la galectine-8 intracellulaire est la régulation de l'activation de la GTPase KRAS4B par son action de GDI qui module subséquentement l'activation de ERK1/2. (Meinohl et al., 2019) Par son action sur la GAP TSC1/TSC2, l'activation de ERK1/2 favorise la signalisation de MTORC1 et inhibe l'autophagie. (Laplante et Sabatini, 2009) Nous avons effectivement observé un changement de l'activation de ERK1/2 lors de la diminution de l'expression de la galectine-8. Cependant, ce résultat est discordant avec ce second rôle intracellulaire de la galectine-8. Dans l'étude précédente de Meinohl et ses collaborateurs, l'absence de la galectine-8 permet l'ancrage à la membrane et l'activation de KRAS4B ce qui favorise l'activation de ERK1/2 alors que nous observons une diminution de l'activation de ERK1/2 dans nos travaux. (Meinohl et al., 2019) La galectine-8 intracellulaire posséderait donc un partenaire d'interaction différent dans l'ostéoclaste humain qui favorise plutôt l'activation de ERK1/2. (Figure 18)

Une investigation plus poussée des partenaires d'interaction potentiels de la galectine-8 intracellulaire pouvant moduler l'activation de ERK1/2 et de MTORC1 permettrait de définir le mécanisme menant à la régulation de l'autophagie par la galectine-8 dans l'ostéoclaste humain. De plus, bien qu'il soit évident selon nos résultats que la signalisation en amont de l'autophagie soit favorable à son initiation lors de la diminution de l'expression de la galectine-8, l'analyse du flux autophagique n'a pas été effectuée à l'aide d'une technique permettant spécifiquement son évaluation dans l'ostéoclaste. Puisque nos cultures sont hétérogènes et que l'expression de LC3-II pourrait ne pas corrélérer de manière parfaite avec le niveau de l'autophagie compte tenu de ses autres rôles décrits dans l'ostéoclaste, en particulier dans la composition de la membrane plissée (DeSelm et al., 2011), il serait nécessaire d'évaluer le flux autophagique en immunofluorescence spécifiquement dans les ostéoclastes pour confirmer son rôle dans la régulation de l'initiation de l'autophagie, comme présenté au chapitre 2.

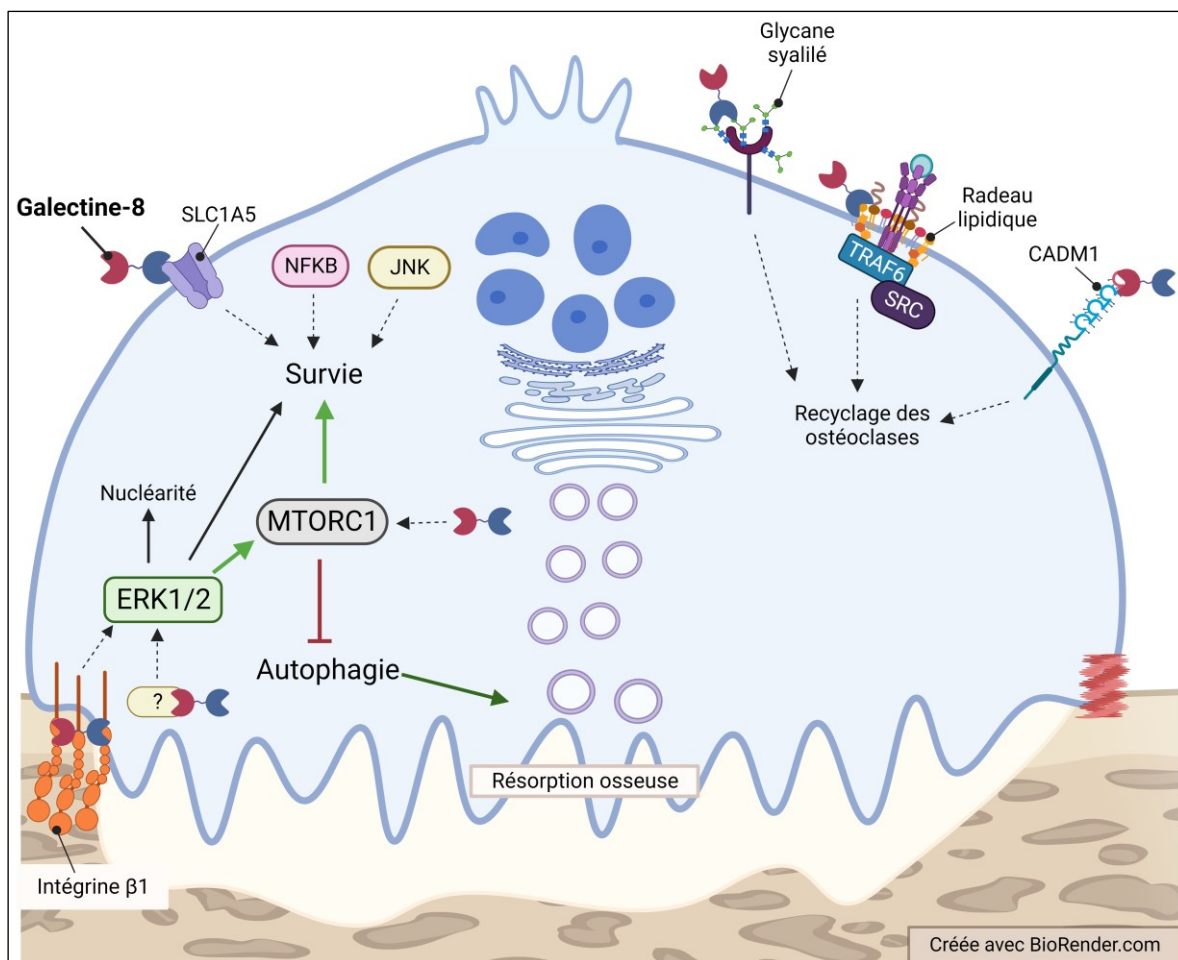


Figure 18: Implication de la galectine-8 dans la régulation de l'ostéoclaste

La galectine-8 module l'activation de ERK1/2, MTOC1 et l'initiation de l'autophagie dans l'ostéoclaste humain mais le mécanisme exact n'a pas été défini. En plus de ces signalisations, la galectine-8 pourrait réguler la survie de l'ostéoclaste par les voies de signalisation de JNK et de NFκB ou par son interaction avec SLC1A5. La galectine-8 pourrait aussi participer au recyclage des ostéoclastes de multiples façons.

L'interaction de la galectine-8 permettant l'activation de ERK1/2 et de MTOC1 pourrait expliquer en partie le phénotype de l'ostéoclaste pagétique. Premièrement, l'augmentation de l'expression globale de *LGALS8* pourrait contribuer à l'augmentation de l'activation de ERK1/2 observée dans l'ostéoclaste pagétique. (Klinck et al., 2014; McManus et al., 2016) De ce fait, l'activation de ERK1/2 par l'augmentation de l'expression de la galectine-8 favoriserait la survie et la résorption osseuse de l'ostéoclaste pagétique entre autres par l'activation de MTOC1. (Glantschnig et al., 2003b; Pennanen et al., 2021; Tong et al., 2019) Toutefois, comme pour *TBC1D25*, l'altération de l'épissage alternatif de *LGALS8* ne contribue pas au défaut des étapes terminales de l'autophagie favorisant l'accumulation d'autophagosomes dans les ostéoclastes pagétiques identifié antérieurement par le laboratoire de Dre Roux. (McManus et al., 2016)

4.2.2.1 Rôle extracellulaire de la galectine-8

Il serait possible que la modulation de la signalisation de ERK1/2 soit effectuée par la galectine-8 extracellulaire. Dans des études précédentes, l'augmentation de l'activation de ERK1/2 dans différents types cellulaires a été observée en présence de la galectine-8 recombinante qui permet l'évaluation de ses rôles extracellulaires. (Cárcamo et al., 2006; Norambuena et al., 2009; Jiali Shi et al., 2023; Tribulatti et al., 2009) Bien que son expression au niveau extracellulaire n'ait pas été évaluée dans notre étude, il est connu que la galectine-8, comme toutes les galectines, est sécrétée et localise aussi à la surface de la cellule. (Elola, 2014; Johannes et al., 2018) L'approche utilisée dans notre étude pourrait donc affecter autant ses fonctions intra- et extracellulaires. D'ailleurs, la régulation de l'activation de ERK1/2 pourrait être effectuée via son interaction avec l'un de ses partenaires d'interaction connus pour moduler cette signalisation, l'intégrine $\beta 1$. (Cárcamo et al., 2006; W.-S. Chen et al., 2016) Nous avons aussi identifié cette intégrine comme un partenaire d'interaction de la galectine-8 lors de notre analyse protéomique. (Figure 18)

Basée sur d'autres membres de la famille des galectines qui ont été mieux étudiés, la sécrétion d'une galectine peut varier d'un type cellulaire à un autre et durant plusieurs processus cellulaires tels que la migration, la différenciation et la fusion de cellules, en plus d'être favorisée par différents stimuli comme les cytokines. (Hughes, 1999; Johannes et al., 2018) La galectine-8 ne fait pas exception et a été détectée dans le milieu extracellulaire de certains types cellulaires et sa sécrétion varie selon les facteurs du micro-environnement. (Cattaneo et al., 2014; Cummings et al., 2022; Lo et al., 2021; Weinmann et al., 2018) Nous pouvons penser que les ostéoclastes sécrètent la galectine-8 comme le font leurs précurseurs provenant de la moelle osseuse. (Vinik et al., 2015) Cependant, comme mentionné, la différenciation influence les niveaux de galectine sécrétée. Il serait donc nécessaire dans un premier temps de déterminer si la galectine-8 est sécrétée dans le milieu extracellulaire ou se localise à la surface des ostéoclastes humains. Par la méthode de dosage enzymatique ELISA, il serait possible de déterminer la présence de la galectine-8 dans le milieu extracellulaire et à la surface de l'ostéoclaste. Toutefois, cette technique ne permettrait pas de quantifier l'expression des isoformes dans le milieu extracellulaire. L'immunoprécipitation de la galectine-8 dans le milieu extracellulaire permettrait de concentrer la galectine-8 présente dans le milieu de culture pour permettre sa détection par immunobuvardage et ainsi quantifier l'expression des isoformes dans le milieu extracellulaire. L'évaluation de l'expression de la galectine-8 au niveau extracellulaire permettrait de confirmer la pertinence d'étudier l'interaction entre la galectine-8 et plusieurs partenaires d'interaction localisés à la surface cellulaire identifiés dans notre interactome.

Si la possibilité d'une forme extracellulaire ne fait pas de doute, son importance relative, et l'impact possible de sa diminution au niveau extracellulaire lors de la diminution de l'expression de la galectine-8 avec notre approche reste à démontrer. La transfection de notre modèle comme présentée, avec l'analyse de la signalisation de ERK1/2 au jour 21, en présence et en absence de la galectine-8 recombinante pourrait permettre de conclure sur son rôle au niveau extracellulaire dans la régulation de la signalisation de ERK1/2. Il serait aussi nécessaire d'identifier ses partenaires d'interaction qui participent à la régulation de ces signalisations en commençant par évaluer la colocalisation entre la galectine-8 et l'intégrine $\beta 1$.

En résumé, nos résultats suggèrent que la galectine-8 extracellulaire pourrait réguler la signalisation de ERK1/2 et subséquemment moduler l'activation de MTORC1 ainsi que l'initiation de l'autophagie. Cependant, plusieurs éléments restent à confirmer. De plus, il a été proposé que selon la localisation intra- et extracellulaire, une galectine pourrait avoir des rôles opposés sur le même processus cellulaire permettant la régulation de ses activités et de la cellule. (Johannes et al., 2018; Kumar Das et al., 2023) Il n'est donc pas impossible que la galectine-8 intracellulaire favorise l'initiation de l'autophagie, mais qu'au niveau extracellulaire la protéine favorise l'activation de ERK1/2 et de MTORC1 qui régule négativement l'autophagie. (Lee et al., 2018)

4.3 Signalisation influençant la survie de l'ostéoclaste

La différenciation, la survie et l'activité de l'ostéoclaste sont principalement régulées par les voies de signalisation induites par RANKL et M-CSF. Celles-ci régulent indirectement la résorption osseuse par la modulation de l'ostéoclastogénèse et de l'apoptose. (Glantschnig et al., 2003; Xu et Teitelbaum, 2013) Nos études suggèrent que TBC1D25 et la galectine-8 sont impliquées dans la régulation de la survie et indirectement de l'activité de l'ostéoclaste. Nous avons observé une diminution du nombre de cellules multinucléées lors de la diminution de TBC1D25 et de la galectine-8. Cependant, la résistance à l'apoptose des ostéoclastes n'a pas été évaluée au cours de nos études. Pour mieux comprendre la cause de la diminution du nombre de cellules multinucléées, il serait nécessaire d'évaluer leur résistance à l'apoptose lors de la modulation de l'expression des protéines d'intérêt comme il a été effectué dans des études précédentes du laboratoire de Dre Roux. (Fong et al., 2013; McManus et al., 2016) Toutefois, vu leurs rôles connus, la modulation de l'expression de TBC1D25 et de la galectine-8 peut avoir favorisé l'apoptose par l'altération de différentes voies de signalisation telles que la modulation de la voie de signalisation de TAK1 par TBC1D25 ou de ERK1/2 par la galectine-8. (Norambuena et al., 2009; Zhang et al., 2022)

4.3.1 Régulation de l'activation de TAK1

L'activation de RANK permet l'activation de différentes kinases, dont TAK1, favorisant la survie de l'ostéoclaste par l'activation subséquente de NF κ B et des MAP kinases. (Lee et al., 2018; Takayanagi, 2021) Des études récentes ont montré l'implication de TBC1D25 dans la régulation négative de TAK1 ainsi que de plusieurs voies de signalisation en aval: p38, JNK et NF κ B. (Guo et al., 2020; Wu et al., 2023; Zhang et al., 2022) La modulation de ces voies de signalisation par TBC1D25 pourrait donc altérer la survie des ostéoclastes. Cependant, ce rôle de TBC1D25 ne peut pas expliquer la diminution du nombre de cellules multinucléées qui a été observée lors de la réduction de TBC1D25 puisque les études actuelles propose que TBC1D25 favoriserait l'inactivation de TAK1. Dans les ostéoclastes humains, si TBC1D25 favorise l'inactivation de TAK1, sa diminution impacterait négativement l'ostéoclastogénèse et la survie de l'ostéoclaste. (Lamothe et al., 2013) Il serait tout de même intéressant d'évaluer le rôle de TBC1D25 sur l'activation de TAK1 dans les ostéoclastes humains afin d'évaluer si TBC1D25 a un effet sur la survie des ostéoclastes. La diminution de l'expression de TBC1D25 dans l'ostéoclaste pagétique pourrait contribuer à son phénotype hyperactif par l'entremise de l'augmentation de l'activation de TAK1. Bien qu'il semble que cet effet soit moindre dans l'ostéoclaste mature, cette fonction pourrait jouer un rôle majeur lors de l'ostéoclastogénèse en favorisant l'expression et l'activation de NFATC1. (Park et al., 2017) Cependant, la diminution de la survie n'est peut-être pas la cause principale de la diminution du nombre de cellules multinucléées puisqu'une diminution du nombre de noyaux par cellule a aussi été observée. TBC1D25 pourrait plutôt réguler la multinucléarité.

4.3.2 Régulation de la survie par la galectine-8

La galectine-8 pourrait affecter la survie cellulaire de multiples façons. Évidemment, la diminution du nombre de cellules multinucléées pourrait être due à l'inactivation de MTORC1 qui favorise l'apoptose chez l'ostéoclaste. (Glantschnig et al., 2003b; Klinck et al., 2014) La diminution du nombre de cellules multinucléées pourrait aussi être attribuable à la diminution de l'activation de ERK1/2 comme une corrélation entre le niveau de phosphorylation de ERK1/2 et le nombre d'ostéoclastes humains a été observée. (Pennanen et al., 2021) D'ailleurs, l'inhibition de cette signalisation favorise aussi l'apoptose des ostéoclastes humains. (McManus et al., 2016) Comme mentionné ci-haut, la survie de l'ostéoclaste est régulée par plusieurs voies de signalisation, principalement activées par M-CSF et RANKL, et faisant intervenir AKT1, ou encore JNK et NF κ B. (Lee et Kim, 2003; Park et al., 2017) Selon son partenaire d'interaction, il a été montré que la

galectine-8 module certaines de ces voies de signalisation dont JNK et NF κ B et peut favoriser la survie ou l'apoptose en fonction du micro-environnement et du type cellulaire. (Arbel-Goren et al., 2005; Shatz-Azoulay et al., 2020) La galectine-8 pourrait donc aussi réguler la survie de l'ostéoclaste par la régulation de JNK et NF κ B. (Figure 18) De plus, l'activation de NF κ B dans plusieurs modèles favorise l'expression de cytokines pro-inflammatoires qui sont connues pour favoriser l'ostéoclastogénèse et la survie de l'ostéoclaste telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), de IL1B et de IL6. (Amarasekara et al., 2018; Shatz-Azoulay et al., 2020; Weinmann et al., 2018; Zick, 2022) Donc, en plus de la modulation de l'activation de JNK et NF κ B, la galectine-8 pourrait réguler l'expression de cytokines pro-inflammatoires produites par l'ostéoclaste ce qui favoriserait la survie de l'ostéoclaste grâce à l'action autocrine de ces facteurs. Il serait donc nécessaire dans un premier temps d'explorer le rôle de la galectine-8 dans la régulation de l'activation de JNK et NF κ B afin de mieux comprendre l'effet de la réduction de son expression sur la survie de l'ostéoclaste humain.

Outre ces signalisations, la diminution du nombre de cellules multinucléées pourrait être causée par l'interaction entre la galectine-8 et SLC1A5, un partenaire d'interaction commun aux deux isoformes, identifié dans notre interactome. Le transporteur transmembranaire est nécessaire à l'apport en L-glutamine de l'ostéoclaste et l'inhibition de ses fonctions diminue la formation de cellules multinucléées ainsi que la résorption osseuse. (Indo et al., 2013) Comme toutes les galectines, la galectine-8 régule l'activité des protéines de surface grâce à sa multivalence permettant de créer des réseaux à la surface d'une cellule. (Nabi et al., 2015) Selon le contexte, la galectine-8 peut favoriser la rétention et donc la fonction d'une protéine ou son endocytose et ainsi mettre fin à son activité. (Fernández et al., 2016; Renard et al., 2020) La diminution de l'expression de la galectine-8 pourrait donc avoir altéré l'activité de SLC1A5 par la diminution de sa rétention à la surface de la cellule et ainsi perturber l'apport en L-glutamine affectant la survie de l'ostéoclaste. (Figure 18) La confirmation de l'interaction entre les deux protéines chez l'ostéoclaste est toutefois nécessaire pour déterminer si la galectine-8 joue aussi un rôle dans la modulation de la survie par la régulation du métabolisme de l'ostéoclaste.

4.4 Régulation du recyclage des ostéoclastes

Comme mentionné, nous avons aussi observé une diminution de la multinucléation (nombre de noyaux par cellules) lors de la diminution de l'expression de nos deux protéines d'intérêt qui pourrait être la principale cause de la diminution du nombre de cellules multinucléées. Malgré quelques études dans les débuts de la recherche sur l'ostéoclaste montrant que l'ostéoclaste se dissocie en cellules mononucléées en présence de la calcitonine, régulateur négatif des fonctions

de l'ostéoclaste, les études subséquentes se sont concentrées sur l'apoptose comme étape terminale régulant la durée de vie de l'ostéoclaste et la résorption osseuse. (Baron and Vignery, 1981; Soysa and Alles, 2019) Or, de récentes études montrent que les ostéoclastes ont une durée de vie beaucoup plus longue que les prédictions originales et qu'ils peuvent se recycler. (Kim et al., 2022) C'est-à-dire qu'en présence de RANKL, les ostéoclastes subissent des cycles de fission et de fusion. Les cellules provenant de la fission, appelées ostéomorphes, sont motiles et peuvent fusionner avec d'autres cellules mononucléées ou multinucléées de la lignée ostéoclastique pour participer à la résorption osseuse à un nouveau site. L'étude a montré qu'*in vivo* ces événements de fusion et de fission sont beaucoup plus courants que l'apoptose. (Kim et al., 2022; McDonald et al., 2021) Cette capacité de l'ostéoclaste à se recycler grâce à la fission et la fusion a aussi été observée *in vitro*. (Jansen et al., 2012; McDonald et al., 2021)

Bien que les événements reliés au recyclage des ostéoclastes soient peu connus actuellement, les ostéomorphes possèdent un phénotype différent des ostéoclastes et des macrophages. Selon l'étude de McDonald et ses collaborateurs, l'expression de *Ctsk* et *Atp6v0d2*, codant pour la CTSK et la sous-unité D2 de la V-ATPASE, est plus élevée dans les ostéoclastes comparativement aux ostéomorphes alors que seuls les ostéomorphes expriment *Bpgm*, une biphosphoglycérase mutase, et *Fbxo7*, le membre 7 de la famille des protéines F-box. (McDonald et al., 2021) Afin de déterminer un possible rôle de TBC1D25 et de la galectine-8 dans la régulation du recyclage des ostéoclastes humains, la comparaison de l'expression des gènes *FBX07* et *BPMG*, dans les cultures contrôles et les cultures dans lesquelles l'expression de TBC1D25 ou de la galectine-8 a été diminuée, pourrait être effectuée. L'étude initiale de McDonald et ses collègues a cependant été effectuée chez la souris donc les gènes spécifiquement exprimés par l'ostéomorphe humain pourraient être différents. L'élaboration d'une approche efficace permettant d'évaluer le rôle d'une protéine sur le recyclage des ostéoclastes sera possible lorsque les ostéomorphes humains auront été caractérisés par le laboratoire de Dre Roux.

4.4.1 Rôle de la galectine-8 dans le recyclage des ostéoclastes

La galectine-8 pourrait participer au recyclage des ostéoclastes de plusieurs façons. Premièrement, la perturbation de la signalisation de RANKL peut certainement contribuer à l'altération du recyclage comme l'OPG favorise l'accumulation des ostéomorphes. (McDonald et al., 2021) La galectine-8 pourrait participer à la régulation du processus par son action sur la signalisation de RANK du fait de son affinité pour les glycosphingolipides. (Bohari et al., 2016; Carlsson et al., 2007b) En effet, la formation de radeaux lipidiques est essentielle à la signalisation

de RANK et permet le recrutement de TRAF6 et SRC au domaine intracellulaire du récepteur. (Ersek et al., 2015) La modulation de l'expression de la galectine-8 pourrait donc perturber la signalisation de RANK par la diminution de la formation de radeaux lipidiques et favoriser l'accumulation d'ostéomorphes. Pour définir son rôle dans la formation des radeaux lipidiques essentiel à cette signalisation, il serait possible d'évaluer l'effet de la diminution de l'expression de la galectine-8 sur l'association de TRAF6 et de SRC aux radeaux lipidiques en isolant ceux-ci et en évaluant leur expression protéique par immunobuvardage. (Abdelmaseeh et al., 2021; Ersek et al., 2015) De plus, par une seconde interaction glycane-dépendante, la galectine-8 pourrait altérer le recyclage des ostéoclastes en réduisant la fusion des ostéomorphes grâce à son affinité pour les glycanes sialylés. Il a été montré qu'en absence de ce groupement sur les glycanes, il y a formation de cellules mononucléées exprimant les gènes ostéoclastiques, mais la formation de cellules multinucléées est inhibée. Un aglycone spécifique est probablement en cause, mais l'inhibition de la production du groupement n'a pas permis de déterminer la glycoprotéine causant cet effet. (Takahata et al., 2007)

Finalement, la galectine-8 pourrait réguler les fonctions de l'ostéomorphe par son interaction avec l'un des partenaires d'interaction identifiés dans notre interactome, la molécule 1 d'adhésion cellulaire (CADM1). Bien que le rôle de la protéine d'adhésion n'ait pas été évalué chez l'ostéomorphe, elle est fortement exprimée à la surface de ces cellules. (McDonald et al., 2021) Comme pour d'autres molécules d'adhésion, la galectine-8 pourrait favoriser l'adhérence, la migration et l'interaction cellule-cellule des ostéomorphes et donc favoriser leur fusion avec d'autres cellules à proximité. (Fernández et al., 2016; Renard et al., 2020; Troncoso et al., 2014) Il serait dans un premier temps nécessaire de confirmer l'interaction entre la galectine-8 et CADM1. Comme l'isolation des ostéomorphes humains n'est pas encore au point, l'évaluation de la fonction de l'interaction entre la galectine-8 et CADM1 pourrait seulement être effectuée dans l'ostéoclaste humain. L'évaluation de la multinucléation en présence ou en absence de la galectine-8 recombinante lors de la modulation de l'expression de la CADM1 ainsi que de la modulation de leur interaction en présence du lactose, un compétiteur des glycanes couramment utilisé pour évaluer les fonctions des galectines, pourrait permettre de mieux définir le rôle de cette interaction dans le recyclage des ostéoclastes. (Figure 18) (Nishi et al., 2003; Tribulatti et al., 2007)

4.4.2 Implication de TBC1D25 dans le recyclage des ostéoclastes

Vu la diminution considérable de cellules multinucléées composées de six noyaux ou plus lors de la transfection de DsiRNAs spécifique de TBC1D25 à un stade tardif de la maturation des ostéoclastes, TBC1D25 semble aussi participer à la régulation du cycle de fission/fusion lors du

recyclage des ostéomorphes. TBC1D25 pourrait être impliquée dans la fusion des ostéomorphes ou la fission des ostéoclastes qui causent l'accumulation des ostéomorphes lors de la diminution de son expression. TBC1D25 pourrait participer à la fusion des ostéomorphes par un mécanisme similaire à la fusion cellulaire dans d'autres cellules impliquant RAB5 ainsi que V-ATPASE, essentielle à la fusion des précurseurs ostéoclastiques. (Kodama et Kaito, 2020; Smurova et Podbilewicz, 2016) De plus, TBC1D25 pourrait réguler la fission des ostéomorphes par un processus similaire à la cytokinèse impliquant certains rabs. (Gibieža et Prekeris, 2017) Afin de déterminer son rôle dans le recyclage des ostéoclastes, il serait nécessaire d'identifier les substrats et les partenaires d'interaction de TBC1D25.

4.4.2.1 Partenaires d'interaction de TBC1D25

Les circonstances ont fait en sorte que nous n'avons pas été en mesure de mieux définir le rôle de TBC1D25 dans l'ostéoclaste malgré des résultats intéressants qui suggèrent un rôle important de la rabGAP dans l'ostéoclaste humain. Comme mentionné, l'identification de ses partenaires d'interaction et de ses substrats serait nécessaire pour mieux comprendre son implication dans la régulation de la maturation terminale de l'ostéoclaste humain et de la résorption osseuse. La protéine recombinante Flag.TBC1D25 a été utilisée comme contrôle de l'épitope Flag lorsque nous avons défini l'interactome des isoformes de la galectine-8. Suivant la même méthode d'analyse que celle présentée au chapitre 3, il est aussi possible de définir l'interactome de TBC1D25 avec les résultats obtenus de cette expérience de protéomique. (Figure 19; Annexe I) Parmi les partenaires d'interaction identifiés, IST1 a été impliquée dans la cytokinèse (Caballe et al., n.d.; Wenzel et al., n.d.) ce qui renforce l'idée de la participation de TBC1D25 dans le recyclage des ostéoclastes. Cependant, l'expression d'IST1 et son rôle ne sont pas connus dans l'ostéoclaste. Il serait intéressant dans un premier temps de confirmer l'expression d'IST1 et ensuite évaluer son interaction avec TBC1D25 dans l'ostéoclaste humain.

Parmi les substrats potentiels de TBC1D25, RAB2A est la seule rab apparaissant dans l'interactome. Cette rab est déjà un substrat connu de TBC1D25. (Itoh et al., 2006) L'expression et la fonction de la RAB2A dans l'ostéoclaste sont inconnues alors qu'elle n'a pas été incluse dans les rabs dont l'expression a été évaluée dans l'ostéoclaste humain. (Hirvonen et al., 2012) Il serait aussi nécessaire dans un premier temps de déterminer si RAB2A est exprimée dans l'ostéoclaste humain et dans un deuxième temps de définir sa localisation intracellulaire dans l'ostéoclaste actif pour pouvoir déterminer s'il est possible que l'activité de la rab soit régulée par TBC1D25.

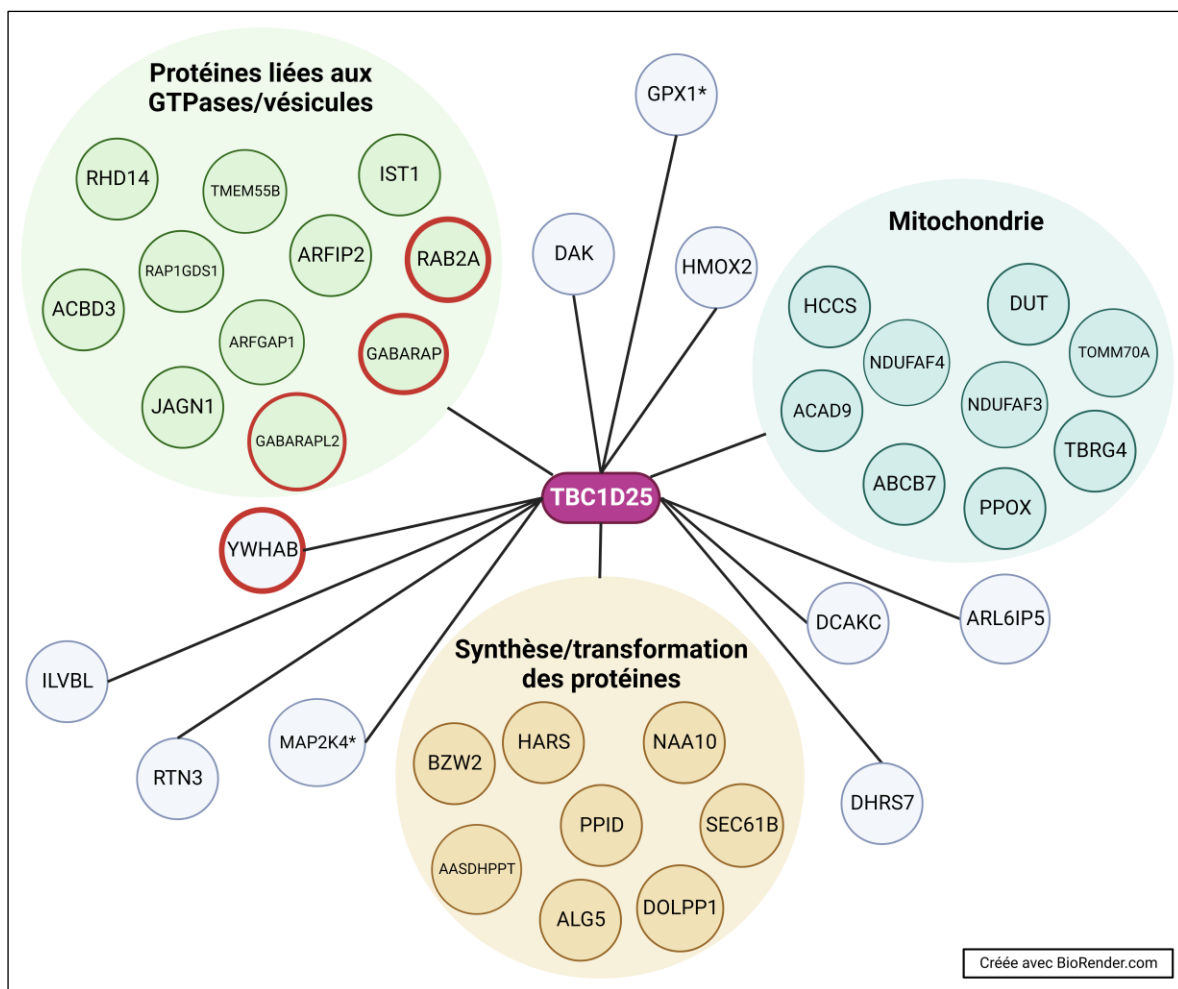


Figure 19: Interactome de TBC1D25

Les partenaires d'interaction de TBC1D25 identifiés par purification par affinité suivie de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) sont présentés. Certaines protéines sont regroupées selon leurs fonctions générales proposées par les banques de données *UniProt* et *GeneCard*. Les protéines encadrées en rouge sont des partenaires connus de TBC1D25 et celles avec un astérisque ont des fonctions connues dans l'ostéoclaste. Ces résultats proviennent des méthodes décrites dans le chapitre 3.

Le faible nombre de rab trouvé dans l'interactome ne signifie pas que l'activité de TBC1D25 chez l'humain est spécifique à RAB2A. La définition d'un interactome par la technique de purification par affinité a été montrée comme étant peu efficace pour bien définir l'interactome des rabs et permet rarement l'identification de leurs régulateurs. De plus, les régulateurs identifiés par cette technique sont souvent des partenaires d'interaction ou des effecteurs plutôt que des régulateurs de la rab étudiée. (Del Olmo et al., 2019; Kanno et al., 2010) De ce fait, pour mieux caractériser les substrats de TBC1D25, il serait préférable de définir son interactome à l'aide de la technique de marquage de proximité, une approche plus efficace pour identifier l'interactome des rabs. (Del Olmo et al., 2019)

Nous retrouvons tout de même quelques protéines intéressantes identifiées dans l'interactome tels que deux membres de la famille de protéines d'ATG8, GABARAP et GABARAPL2, qui sont des partenaires d'interaction de haute affinité connus. (Itoh et al., 2011) De plus, nous retrouvons quelques protéines liées à la régulation de la grande famille des GTPases ras (ARFGAP1, ARFIP2, RAP1GDS1) et au trafic vésiculaire (TMEM55B, JAGN1, ACBD3). Toutefois, très peu de ces protéines jouent un rôle connu dans l'ostéoclaste (GPX1, MAP2K4). Parmi ces partenaires d'interaction, outre RAB2A et IST1, il serait intéressant d'évaluer l'interaction entre TMEM55B et TBC1D25 impliquée dans le positionnement des lysosomes et entre TBC1D25 et MAP2K4, une kinase impliquée dans la signalisation de RANKL en amont de p38 et JNK. (Figure 19) (Araki and Kontani, 2021; Lee et al., 2018) Une analyse bio-informatique détaillée évaluant les processus biologiques et les voies dans lesquelles les différentes protéines de l'interactome de TBC1D25 font partie pourrait donner quelques idées sur les partenaires d'interactions pertinents à explorer dans l'ostéoclaste humain pour mieux définir le rôle de TBC1D25.

Toutefois, que l'interactome soit défini à partir de la méthode de purification par affinité ou par la méthode de marquage de proximité, ces deux méthodes ne peuvent pas être effectuées en utilisant notre modèle d'ostéoclaste humain vu la difficulté à les transfecter. La confirmation de ces interactions dans l'ostéoclaste humain est donc nécessaire. Comme présenté aux chapitres 2 et 3, l'analyse de la colocalisation à l'aide de la microscopie confocale permet de localiser nos protéines d'intérêt aux structures caractéristiques de l'ostéoclaste actif. Cependant, l'utilisation de méthodes plus précises serait nécessaire pour confirmer l'interaction entre deux protéines dans l'ostéoclaste actif. De ce fait, pour confirmer toutes les interactions intéressantes suggérées dans le présent chapitre, l'utilisation de l'essai de ligature de proximité serait idéale. Cette méthode permet de détecter un signal en immunofluorescence seulement pour les protéines qui sont à une distance de moins de 40 nm l'une de l'autre et donc permettrait de mieux conclure sur l'interaction entre deux protéines dans l'ostéoclaste actif. (Alam, 2018) Précisément pour TBC1D25, dans le cas de la confirmation d'une interaction avec une nouvelle rab, la confirmation de l'activité enzymatique de TBC1D25 sur celle-ci serait nécessaire pour définir si la rab identifiée est un substrat ou un partenaire d'interaction. L'activité GAP de TBC1D25 pourrait être évaluée dans les HEK293T à l'aide de la méthode décrite par Nottingham et Pfeffer. (Nottingham et Pfeffer, 2015)

4.5 L'ostéoclastogénèse

L'épissage alternatif est partie intégrante de la différenciation de plusieurs types cellulaires, l'altération de l'épissage alternatif de *TBC1D25* et *LGALS8* pourrait donc altérer l'ostéoclastogénèse.

(Baralle et Giudice, 2017) De ce fait, certains résultats de nos études suggèrent l'implication de ces protéines durant la différenciation mais nous n'avons pas réalisé d'analyses approfondies. Bien que l'ostéoclaste mature procède à la résorption, il est tout aussi important de déterminer le rôle des deux protéines d'intérêt dans les précurseurs lors de la différenciation. Une transfection plus précoce dans les deux premières semaines de la culture pourrait permettre d'évaluer le rôle des protéines dans la différenciation des précurseurs ostéoclastiques. D'ailleurs, il a été possible de transférer des mimics et des inhibiteurs de miARNs, des petites séquences d'oligonucléotides (20-mer à 22-mer), au jour 14 de la culture cellulaire dans notre modèle. (Stephens et al., 2020) Toutefois, ce protocole n'a jamais été utilisé pour la transfection des petits ARN interférents (siRNAs (21-mer) et DsiRNAs (27-mer)) qui sont des oligonucléotides de tailles similaires. Cependant, un protocole de transfection transitoire plus précoce, c'est-à-dire à la première semaine de culture, pour pouvoir évaluer l'effet sur la différenciation des ostéoclastes humains serait difficile à interpréter dans des cultures à long terme (21 jours).

4.5.1 Fonctions potentielles de TBC1D25 dans l'ostéoclastogénèse

TBC1D25 n'avait jamais été étudiée en détail dans les ostéoclastes humains avant notre étude. L'évaluation de son expression durant l'ostéoclastogénèse suggère que la protéine joue un rôle tôt dans l'ostéoclastogénèse. Une augmentation significative de l'expression de TBC1D25 a été observée dans les cultures de monocytes provenant de sang de cordon après sept jours en présence de RANKL et M-CSF. À cette période, les cultures contiennent des cellules mononucléées pré-ostéoclastiques. Il y a par la suite une diminution de l'expression de la protéine au cours de la différenciation. Bien sûr, comme l'atteste l'augmentation de l'expression de plusieurs rabs tels que RAB13 et RAB38, une augmentation de l'expression de TBC1D25 ne suggère pas nécessairement un rôle prédominant de la protéine durant la différenciation de l'ostéoclaste. (Charles et al., 2012b; Hirvonen et al., 2012) Cependant, quelques rabs sont impliquées dans la régulation de l'ostéoclastogénèse via la régulation du transport de C-FMS et RANK qui modulent leur expression de surface ou leur dégradation. (Feng et al., 2022; Okusha et al., 2020; Shimada-Sugawara et al., 2015; Tran et al., 2020b) Parmi celles-ci, RAB34 pourrait être un substrat potentiel de TBC1D25 dans la régulation du transport vésiculaire régulant l'ostéoclastogénèse. La rab a récemment été impliquée dans la régulation de l'expression de surface des récepteurs. La surexpression de la rab inhibe l'ostéoclastogénèse, ce qui suggère que la diminution de l'expression de la rabGAP qui régule son activation favoriserait la régulation négative de l'ostéoclastogénèse par RAB34. (Feng et al., 2022) D'autres rabs pourraient être la cible de TBC1D25 durant la différenciation, mais pour

l'instant, seule l'expression de RAB7, RAB13 et RAB32 est connue durant l'ostéoclastogénèse chez l'ostéoclaste humain. (Hirvonen et al., 2012) Afin de déterminer d'autres substrats potentiels de TBC1D25 durant l'ostéoclastogénèse, l'évaluation de l'expression des rabs durant la différenciation pourrait permettre l'identification de quelques rabs importantes au cours de ce processus.

4.5.2 Régulation de l'ostéoclastogénèse par les isoformes de la galectine-8

Notre seconde étude est aussi la première à confirmer l'expression protéique des deux isoformes de la galectine-8 dans l'ostéoclaste humain. Vu les changements au niveau de la glycosylation lors de la différenciation cellulaire, il serait important de définir le rôle de la galectine-8 et des isoformes dans ce processus également. (Gabiuis et al., 2022) Bien que ce n'ait pas été montré pour l'ostéoclaste, une variation de l'expression des gènes de la glycosylation a été montrée entre les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques appuyant le changement du profil des glycanes exprimés par les cellules au cours de la différenciation et leur importance dans la régulation de la différenciation des cellules de la lignée monocyte-macrophage. (Trottein et al., 2009) De plus, les glycanes sialylés ainsi que les glycosphingolipides sont tous deux importants pour la différenciation de l'ostéoclaste. (Ersek et al., 2015; Takahata et al., 2007) Comme mentionné auparavant, ces glycanes sont des substrats de haute affinité de la galectine-8 suggérant une possible implication de la galectine et de ses isoformes dans l'ostéoclastogénèse. (Carlsson et al., 2007b; Ideo et al., 2003) D'ailleurs, l'évaluation de l'expression des isoformes de la galectine-8 à différents moments de la différenciation de l'ostéoclaste montre une augmentation de l'expression de l'isoforme longue au jour sept de la culture cellulaire. Malgré tout, l'isoforme courte de la galectine-8 est l'isoforme exprimée de façon prédominante autant dans les précurseurs que les ostéoclastes matures. L'augmentation de l'expression de l'isoforme longue à partir du jour sept de la culture cellulaire suggère cependant que la modulation de l'expression des isoformes de la galectine-8 pourrait permettre la régulation de l'ostéoclastogénèse. Comme nos résultats suggèrent que la taille du peptide de liaison de l'isoforme longue altère sa capacité à lier certains partenaires d'interaction, l'augmentation de son expression durant l'ostéoclastogénèse pourrait permettre de réguler négativement les fonctions de l'isoforme courte qui elle favoriserait l'ostéoclastogénèse.

4.6 Fonction de TBC1D25 dans la résorption osseuse

C'est cependant dans l'ostéoclaste mature que nous avons le mieux caractérisé le rôle de TBC1D25. La localisation de TBC1D25 dans l'ostéoclaste actif indique que la protéine joue un rôle direct dans la régulation de la formation de la membrane plissée et de la zone de scellement et les

résultats évaluant l'effet de la diminution de son expression sur la résorption osseuse corroborent sa contribution importante dans la régulation de l'activité de l'ostéoclaste.

4.6.1 L'implication de la localisation de TBC1D25 à la membrane plissée

Nos résultats du chapitre 2 montrent une diminution de la capacité de résorption des ostéoclastes lors de la diminution de l'expression de TBC1D25. Vu sa localisation à la membrane plissée dans l'ostéoclaste actif, il n'est pas surprenant que la diminution de son expression impacte la résorption osseuse. Comme l'ostéoclaste pagétique est hyperactif, nous nous serions attendus à une augmentation de la résorption osseuse lors de la diminution de l'expression de TBC1D25. Selon nos observations, la rabGAP semble inactiver une rab qui régule négativement l'activité de l'ostéoclaste. L'interprétation des résultats n'est cependant pas aussi simple. L'inhibition et la surexpression d'une rabGAP ou de son substrat mènent parfois au même phénotype puisqu'il y a altération de la cascade de rabs dans les deux situations. Par exemple, la surexpression ainsi que l'inhibition de RAB34 diminuent l'aire résorbée par les ostéoclastes. (Feng et al., 2022; Frasa et al., 2012) De plus, bien que la localisation confirme son rôle direct dans le trafic vésiculaire associé à la membrane plissée, il n'est pas possible de conclure sur le rôle précis de TBC1D25 puisque la protéine pourrait réguler le transport des lysosomes sécrétoires, la formation de la membrane plissée, l'endocytose des produits de la dégradation ou les étapes initiales de la transcytose et même avoir plus d'un rôle parmi ceux-ci.

Le transport des lysosomes sécrétoires ainsi que la fusion de ceux-ci avec la membrane plasmique impliquent RAB7 qui permet l'insertion de la V-ATPASE et la sécrétion de la CTSK à la zone de fusion de la membrane plissée. (M. T. K. Mulari et al., 2003) Nous avons montré que TBC1D25 est fortement exprimé en périphérie de la membrane plissée suggérant son expression à la zone de fusion. Malgré son expression en périphérie de la membrane plissée, la protéine ne colocalise pas avec RAB7 et V-ATPASE. Nos résultats confirment que RAB7 n'est pas un substrat de TBC1D25 durant la résorption osseuse, ce qui est en accord avec une étude antérieure ayant évalué l'activité catalytique de TBC1D25 sur la rab. (Itoh et al., 2011) De plus, comme les deux protéines ne colocalisent pas, TBC1D25 n'est pas un effecteur de RAB7 lors du trafic des lysosomes sécrétoires ou lors de leur fusion avec la membrane plasmique. En se basant sur le modèle suggérant deux domaines distincts à l'intérieur de la membrane plissée, TBC1D25 ne serait pas impliqué dans les événements de la résorption osseuse à la zone de fusion de la membrane plasmique malgré sa localisation en périphérie de la membrane plissée. (M. T. K. Mulari et al., 2003)

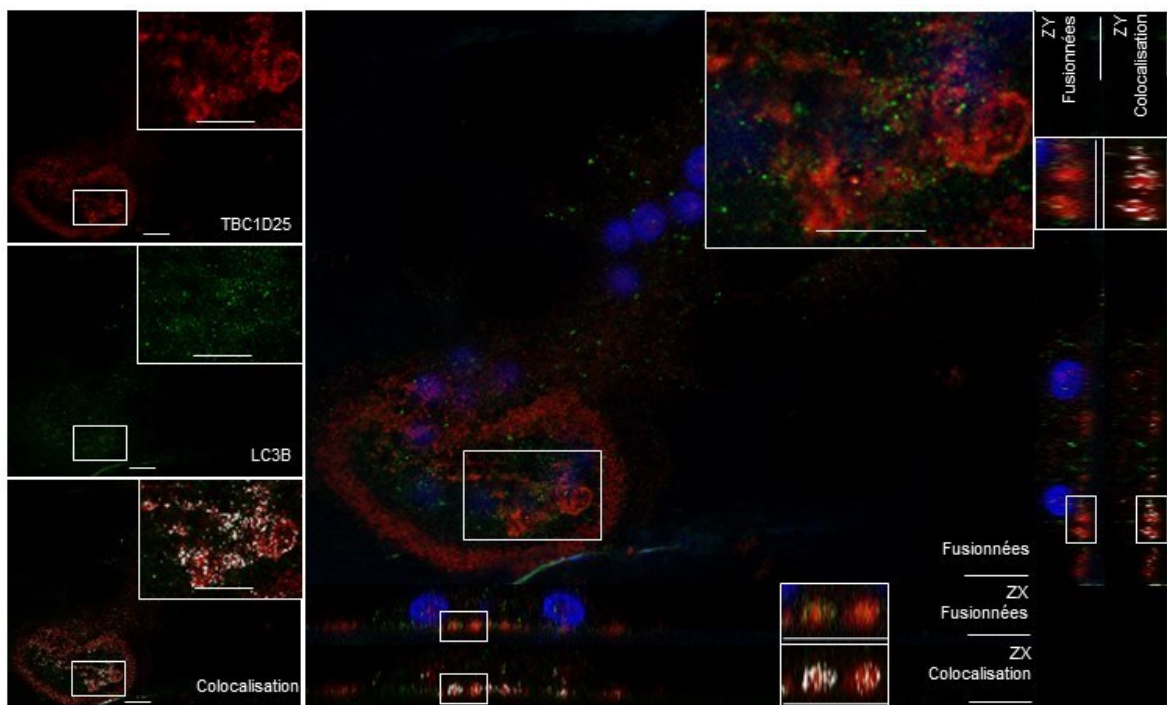


Figure 20: Colocalisation entre TBC1D25 et LC3B dans l'ostéoclaste actif

La colocalisation de TBC1D25 (rouge) et LC3B (vert) a été observée dans les ostéoclastes cultivés sur une matrice osseuse. Un plan Z près de la matrice osseuse ainsi que les reconstructions orthogonales sont présentés, accompagnés de grossissements à la membrane plissée où il y a expression des deux protéines. Ces images ont été obtenues avec les méthodes décrites au chapitre 2 et sont représentatives de trois expériences indépendantes. Échelle = 10 μ m

Toutefois, il a été montré que LC3-II, localisée à la membrane plissée de l'ostéoclaste actif, participe à la localisation des vésicules sécrétrices à l'intérieur de la zone de scellement et permet la sécrétion des enzymes lysosomales nécessaire à la dégradation de la matrice. Dans cette étude, ni LC3-II ni les marqueurs des vésicules sécrétrices, LAMP1 et CTSK, ne sont strictement localisées en périphérie de la membrane plissée. (DeSelm et al., 2011) Basé sur cette étude, le centre de la membrane plissée est aussi impliqué dans le positionnement des vésicules sécrétrices et la sécrétion de leur contenu dans la lacune de résorption osseuse. La localisation de TBC1D25 au centre de la membrane plissée n'exclut donc pas un rôle de TBC1D25 dans ces événements.

Nous avons observé une expression moindre de TBC1D25 au centre de la membrane plissée. Son expression au centre de la membrane plissée semble transitoire alors que cette localisation n'a pas été observée dans tous les ostéoclastes. L'expression passagère de TBC1D25 pourrait être nécessaire à la régulation de la cascade de rabs impliquée dans la résorption osseuse. Vu la localisation de LC3-II à la membrane plissée, TBC1D25 pourrait être recrutée grâce à une interaction directe avec LC3-II à la structure pour inactiver un de ses substrats. D'ailleurs, nos résultats

préliminaires suggèrent une colocalisation entre TBC1D25 et LC3 dans l'ostéoclaste actif lorsque la rabGAP est présente au centre de la membrane plissée. (Figure 20) Dans ce contexte, TBC1D25 pourrait participer aux positionnements des vésicules sécrétrices à l'intérieur de la zone de scellement par la régulation de la lipidation de LC3-II à la membrane plissée dans un mécanisme similaire à celui proposé pour son rôle dans l'autophagie. (DeSelm et al., 2011; Itoh et al., 2011) Plusieurs protéines de l'autophagie sont impliquées dans la régulation de la résorption osseuse dont ATG5. Dans l'ostéoclaste, ATG5 est essentielle à la conjugaison de LC3 avec le PE et sa localisation à la membrane plissée. Dans l'autophagie, la RAB33B activée recrute le complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 grâce à son interaction avec son effecteur ATG16L1. TBC1D25 est recrutée dans un deuxième temps par LC3-II et inactive RAB33B qui permet subséquemment la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. TBC1D25 positionnée au centre de la membrane plissée pourrait donc participer à la localisation des vésicules sécrétrices à l'intérieur de la membrane plissée dans les événements précédents de leur fusion avec la membrane plasmique adjacente à l'os de cette manière. (Figure 21) D'ailleurs, la colocalisation entre TBC1D25 ainsi que LAMP2 et CTSK, marqueur non seulement de la membrane plissée, mais des vésicules sécrétrices, appuie cette hypothèse. Toutefois, la localisation et la fonction de RAB33B dans l'ostéoclaste ne sont pas connues. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire de confirmer nos observations, c'est-à-dire confirmer l'interaction entre TBC1D25 et LC3 au centre de la membrane plissée. De plus, il serait nécessaire de déterminer la localisation de RAB33B dans l'ostéoclaste actif et déterminer si le rab interagit avec TBC1D25 dans ce contexte.

Parmi les autres substrats potentiels de TBC1D25, RAB34 a récemment été étudiée dans l'ostéoclaste murin. (Feng et al., 2022; Itoh et al., 2006) RAB34 est ancrée à la membrane des lysosomes, mais sa localisation à la membrane plissée n'a pas été évaluée. Toutefois, une diminution de la sécrétion de la CTSK a été observée lors de la diminution de son expression qui suggère son implication dans le transport des lysosomes sécrétoires ou la formation de la membrane plissée. (Feng et al., 2022) TBC1D25 pourrait donc inactiver RAB34 pour réguler la cascade permettant le transport apical des vésicules sécrétrices. (Figure 21) De plus, comme mentionné auparavant, l'expression de RAB2A n'est pas connue dans l'ostéoclaste. Toutefois, un de ses partenaires d'interaction lors de la maturation des vésicules destinées à l'exocytose, RAB27A, a été impliquée dans le positionnement des vésicules sécrétrices. De manière similaire aux vésicules de l'exocytose, RAB2A et RAB27A pourraient coopérer lors de la résorption osseuse et donc RAB2A pourrait être un substrat potentiel additionnel pour ce rôle de TBC1D25. (Figure 21) (Matsunaga et al., 2017;

Shimada-Sugawara et al., 2015) Pour conclure sur la régulation de ces substrats par TBC1D25, il serait nécessaire dans un premier temps de définir leur localisation dans l'ostéoclaste humain actif puis d'évaluer leur interaction avec TBC1D25.

Certains substrats connus de TBC1D25 participent à la régulation du transport endomembranaire hautement conservé tels que RAB33B et RAB2. (Galea et al., 2015; Starr et al., 2010) TBC1D25 pourrait donc moduler la résorption osseuse par son implication dans le transport rétrograde plutôt qu'une voie du trafic vésiculaire directement impliquée dans la résorption osseuse. Toutefois, nous n'avons pas effectué la localisation de TBC1D25 avec un marqueur du Golgi tel que GM130 pour pouvoir nous prononcer sur ce rôle. De plus, TBC1D25 est faiblement présente dans les plans Z près des noyaux lors de l'étude de sa distribution dans les ostéoclastes actifs en immunofluorescence suggérant que la protéine serait peu ou pas impliquée dans le transport rétrograde. Vu sa localisation dans une moindre mesure au centre de la membrane plissée, il serait plus probable que TBC1D25 participe aux premiers événements régulant la transcytose permettant le transport des produits de la dégradation vers le domaine sécrétoire fonctionnel. (Salo et al., 1996)

De ce fait, si nous favorisons le modèle proposant la séparation de la membrane plissée en deux sous-domaines, la localisation de TBC1D25 au centre de celle-ci suggère un rôle dans l'endocytose des produits de dégradation ou les étapes initiales de la transcytose. (M. T. K. Mulari et al., 2003) L'inhibition de cette voie du transport vésiculaire diminue aussi la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes. (Borggaard et al., 2020) De plus, il a été montré que la CTSK est réabsorbée lors de l'endocytose des produits de la dégradation et est localisée à l'intérieur des vésicules lors de la transcytose. (Mirkka J Hirvonen et al., 2013; Vääräniemi et al., 2004) La colocalisation entre TBC1D25 et la CTSK pourrait donc suggérer un rôle dans l'endocytose des produits de la dégradation plutôt que dans le transport des vésicules sécrétrices. (Figure 21) Aucune rab n'a été impliquée dans cette voie du trafic vésiculaire lors de la résorption jusqu'à maintenant. Comme très peu d'informations sont connues sur ce trafic vésiculaire, il serait nécessaire dans un premier temps d'identifier les rabs impliquées dans l'endocytose des produits de dégradation et celles impliquées dans la transcytose.

Nos résultats confirment un rôle direct de TBC1D25 dans les événements régulant le transport vésiculaire et la formation de la membrane plissée. L'identification des substrats de TBC1D25 dans l'ostéoclaste actif pourrait certainement permettre de mieux définir son rôle et conclure sur sa participation dans le transport vésiculaire apical ou le transport vésiculaire vers le domaine sécrétoire fonctionnel. Toutefois, vu sa localisation, TBC1D25 pourrait également influencer la

capacité de résorption de l'ostéoclaste par la régulation de l'assemblage et du désassemblage des podosomes et de la formation de la zone de scellement.

4.6.2 L'implication de la localisation de TBC1D25 à la zone de scellement

D'ailleurs, l'expression élevée de TBC1D25 à la zone de scellement suggère un rôle prédominant de la protéine dans sa formation ou dans la régulation de l'assemblage des podosomes. (Figure 21) Vu sa colocalisation avec F-actine, TBC1D25 pourrait participer à la polymérisation de celle-ci. Jusqu'à maintenant, aucune GTPase rab n'a été localisée à la zone de scellement, mais plusieurs GTPases rho sont impliquées dans le réarrangement du cytosquelette qui composent les podosomes. (Ory et al., 2008; Touaitahuata et al., 2014) Il est connu que les différentes sous-familles de GTPases coopèrent entre elles pour mener leur fonction comme il a été observé pour RAB7 et RAC1 en périphérie de la membrane plissée. (Frasa et al., 2012; Sun et al., 2005) TBC1D25 pourrait donc réguler une rab impliquée dans l'assemblage et le désassemblage des podosomes coopérant avec une GTPase rho, tel que CDC42 localisée au centre du podosome. (Soysa et Alles, 2016) D'ailleurs, plusieurs rabs ont été impliqués dans la régulation de l'adhésion cellulaire dans d'autres types cellulaires. (Porter et Barbieri, 2015; Subramani et Alahari, 2010) De plus, LC3 est impliqué dans la régulation de la formation des podosomes via son interaction avec CDC42 qui favorise l'activation de la GTPase. (Chung et al., 2012) TBC1D25 pourrait aussi être recrutée à la zone de scellement par son interaction directe avec LC3. Toutefois, nous avons principalement observé la présence de LC3 à la membrane plissée dans les ostéoclastes actifs en accord avec des études antérieures. (Figure 20) (DeSelm et al., 2011; Ohmae et al., 2017) La régulation du positionnement de TBC1D25 aux différentes structures de l'ostéoclaste actif pourrait faire appel à plusieurs membres de la famille d'ATG8. Contrairement à son positionnement à la membrane plissée, TBC1D25 pourrait être recrutée à la zone de scellement par d'autres membres de cette famille. Vu l'affinité plus élevée pour GABARAP et GABARAPL2, TBC1D25 pourrait être préférentiellement recrutée à la zone de scellement par ces membres. (Itoh et al., 2011) Toutefois, GABARAP et GABARAPL2 n'ont jamais fait l'objet d'études dans l'ostéoclaste. La détermination de leur distribution dans l'ostéoclaste humain serait nécessaire pour déterminer leur possible rôle dans l'ostéoclaste actif et dans la régulation de l'activité de TBC1D25.

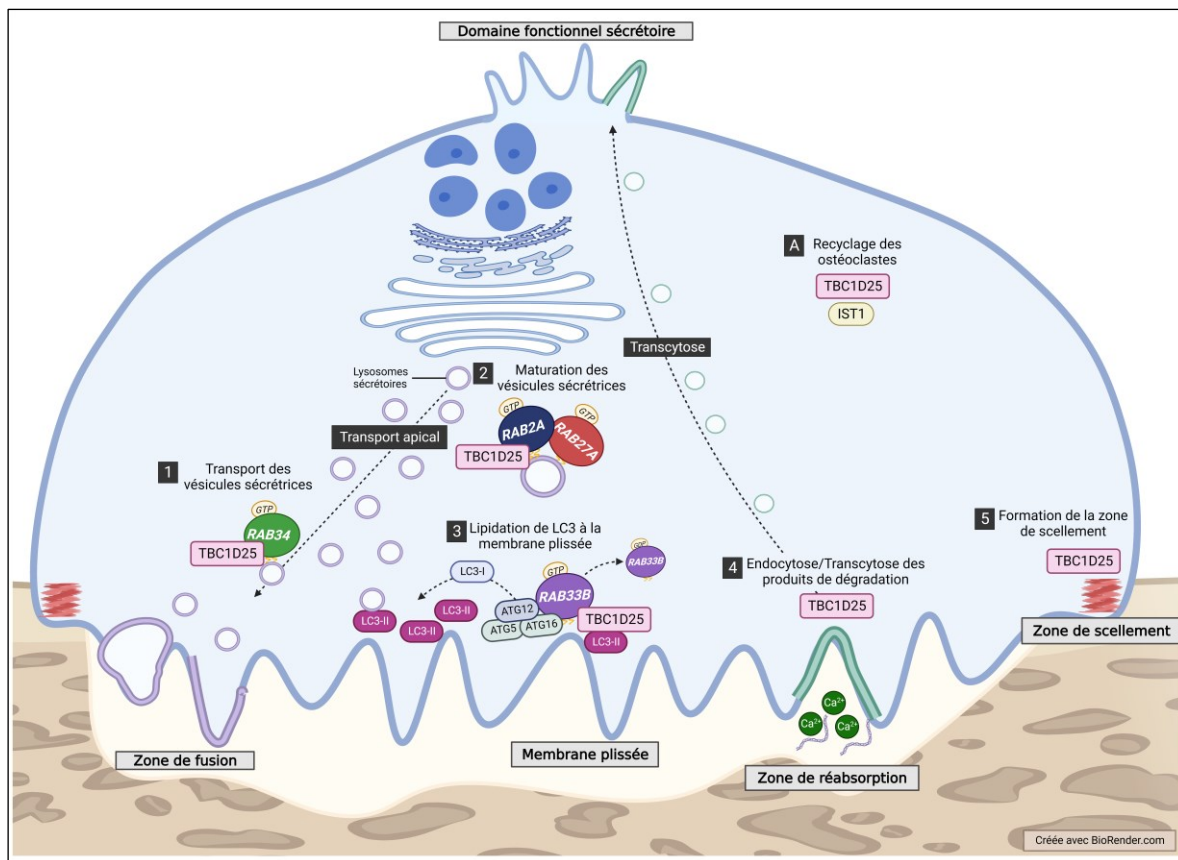


Figure 21: Régulation de l'ostéoclaste mature par TBC1D25

Bien que nos résultats indiquent l'implication de TBC1D25 dans la régulation de la maturation terminale de l'ostéoclaste et la résorption osseuse, les mécanismes associés restent à définir. Compte tenu de sa localisation et des fonctions de ses substrats et ses partenaires d'interaction, TBC1D25 pourrait participer au trafic vésiculaire associé à la résorption osseuse par la régulation de RAB34 (1) ou RAB2A (2), au positionnement des lysosomes sécrétoires à la membrane plissée par la régulation de RAB33B et son interaction avec LC3 (3), au trafic vésiculaire associé à la transcytose (4) et à la formation de la zone de scellement (5) permettant la régulation de l'activité de résorption osseuse de l'ostéoclaste. TBC1D25 pourrait aussi participer au recyclage des ostéoclastes par son interaction avec IST1 (A).

La diminution de l'expression de TBC1D25 dans les ostéoclastes réduit la surface totale de matrice osseuse dégradée. Vu la localisation de TBC1D25 à la zone de scellement, cette diminution pourrait être due à une réduction de la motilité de la cellule. L'assemblage et le désassemblage des podosomes sont nécessaires pour permettre l'alternance de l'ostéoclaste entre sa fonction de résorption et sa motilité. (Georgess et al., 2014) L'altération de la formation de la zone de scellement ou de la régulation de la formation des podosomes réduit effectivement l'aire résorbée par l'ostéoclaste. (McMichael et al., 2010b; Zhang et al., 2020) Bien que nous n'ayons pas observé de perturbation de la zone de scellement lors de la diminution de l'expression de TBC1D25, ce résultat doit être pris en considération avec modération. L'altération de la formation de la zone de

scellement et des podosomes peut se présenter de différentes manières dont un changement du périmètre de la zone de scellement, la formation de multiples zones de scellement ou l'altération de l'épaisseur de la structure causée par l'augmentation ou la diminution de la densité des podosomes. (McMichael et al., 2010b; Schmidt et al., 2011; Zhang et al., 2020) Ces paramètres n'ont pas été évalués dans notre étude. Il serait intéressant de déterminer l'effet précis de la diminution de l'expression de TBC1D25 sur la formation de la zone de scellement puisqu'une réduction de la motilité de la cellule pourrait favoriser la formation de lacunes de résorption osseuse plus profondes, mais moins nombreuses résultant à nos observations d'une diminution de l'aire résorbée.

En résumé, bien que nos résultats suggèrent un rôle direct de TBC1D25 dans la formation des structures caractéristiques de l'ostéoclaste actif, la membrane plissée et la zone de scellement, nous ne sommes pas en mesure de déterminer si la protéine joue un rôle prédominant dans la régulation du transport vésiculaire des lysosomes sécrétoires ou dans la régulation de l'organisation du cytosquelette. Il serait toutefois intéressant d'évaluer les caractéristiques du squelette de la souris déficiente en TBC1D25 pour évaluer si la fonction importante de TBC1D25 dans la résorption osseuse que nous avons identifiée *in vitro* est aussi présente *in vivo*.

4.7 La galectine-8 dans la résorption osseuse

En plus de ses rôles régulant indirectement la résorption osseuse, nos résultats suggèrent l'implication directe de la galectine-8 dans la formation de la membrane plissée et de la zone de scellement. Vu le grand nombre de fonctions intra- et extracellulaires que peut avoir la galectine-8, celle-ci pourrait moduler la résorption osseuse de plusieurs façons. De nombreux partenaires d'interaction de la protéine sont des protéines de surface impliquées dans l'adhésion, l'étalement et la migration de cellules. (Troncoso et al., 2014) De même, certains partenaires d'interaction identifiés dans notre étude sur la galectine-8 pourraient être impliqués dans la formation de la zone de scellement et la migration de l'ostéoclaste. Parmi ceux-ci, la CAMD1 est un régulateur négatif de la résorption osseuse. L'interaction entre la galectine-8 et la protéine d'adhésion pourrait donc moduler son expression de surface. En diminuant son expression de surface, la galectine-8 pourrait inhiber son activité et favoriser l'activation des kinases d'adhésion focale comme observée lors de l'inhibition de l'expression de la CADM1. (Nakamura et al., 2017) L'interaction entre la galectine-8 et CADM1 pourrait donc réguler l'adhésion et la migration de l'ostéoclaste par la régulation de l'assemblage des podosomes. (Kong et al., 2020) La galectine-8 pourrait aussi participer à l'adhésion et la migration de l'ostéoclaste par son interaction avec l'intégrine $\beta 1$. (Helfrich et al., 1996;

Townsend et al., 1999) Comme mentionné auparavant, dans d'autres types cellulaires, la galectine-8 régule l'adhésion et l'étalement cellulaire via son interaction avec l'intégrine $\beta 1$. (Diskin et al., 2012; Levy et al., 2001) La diminution de la résorption osseuse lors de la diminution de l'expression de la galectine-8 pourrait diminuer la présence de l'intégrine $\beta 1$ à la surface de l'ostéoclaste ou altérer sa conformation réduisant son affinité pour la matrice osseuse. De fait, la diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ diminue la résorption osseuse et altère la formation de la zone de scellement. (Schmidt et al., 2011; Townsend et al., 1999) Toutefois, d'autres partenaires d'interaction suggèrent que la protéine pourrait réguler le transport vésiculaire apical par son interaction avec des protéines exprimées aux lysosomes sécrétoires telles que LAMP2, BSG, et CLCN3. (Ng et al., 2023) (Figure 22)

4.7.1 L'isoforme courte de la galectine-8 dans la résorption osseuse

Nos résultats suggèrent un rôle spécifique de l'isoforme courte de la galectine-8 dans la régulation de la résorption osseuse via la régulation du transport vésiculaire apical. D'ailleurs, l'isoforme courte interagit avec CLCN7 qui est essentielle à l'acidification de la lacune de résorption. (Kornak et al., 2001; Ribet et al., 2021) La galectine-8 a été impliquée dans le transport apical via une interaction carbohydrate-dépendante qui suggère sa localisation intravésiculaire lors de cette fonction. (Lim et al., 2017) Comme d'autres galectines, l'isoforme courte de la galectine-8 pourrait participer au transport apical par la formation de microdomaines à l'intérieur des vésicules sécrétrices grâce à son interaction avec CLCN7. (Delacour et al., 2009) Toutefois, l'isoforme courte pourrait aussi réguler le trafic de CLCN7 par une interaction protéine-protéine à l'extérieur de la vésicule. La galectine-8 intracellulaire participe aussi au trafic protéique par l'entremise de son interaction avec la tubuline. (Lo et al., 2021) La tubuline est présente à la membrane plissée des ostéoclastes actifs et est nécessaire au positionnement des lysosomes sécrétoires à cette structure. (Matsumoto et Nakanishi-Matsui, 2019; Mulari et al., 2003) Bien qu'il sera nécessaire de déterminer le mécanisme, l'isoforme courte participerait au positionnement des lysosomes et à la formation de la membrane plissée. Cette action de l'isoforme courte n'est probablement pas spécifique à CLCN7 comme d'autres partenaires de l'isoforme courte de la galectine-8, LAMP1 et SLC17A5, sont localisés aux vésicules sécrétrices. (Figure 22) (Ng et al., 2023) Ceci pourrait suggérer la présence intravésiculaire de l'isoforme courte, permettant son interaction avec des glycanes de haute affinité présents sur plusieurs glycoprotéines du lysosome sécrétoire. (Carlsson et al., 2007a) La caractérisation de ces interactions permettrait de mieux comprendre le rôle de l'isoforme courte de

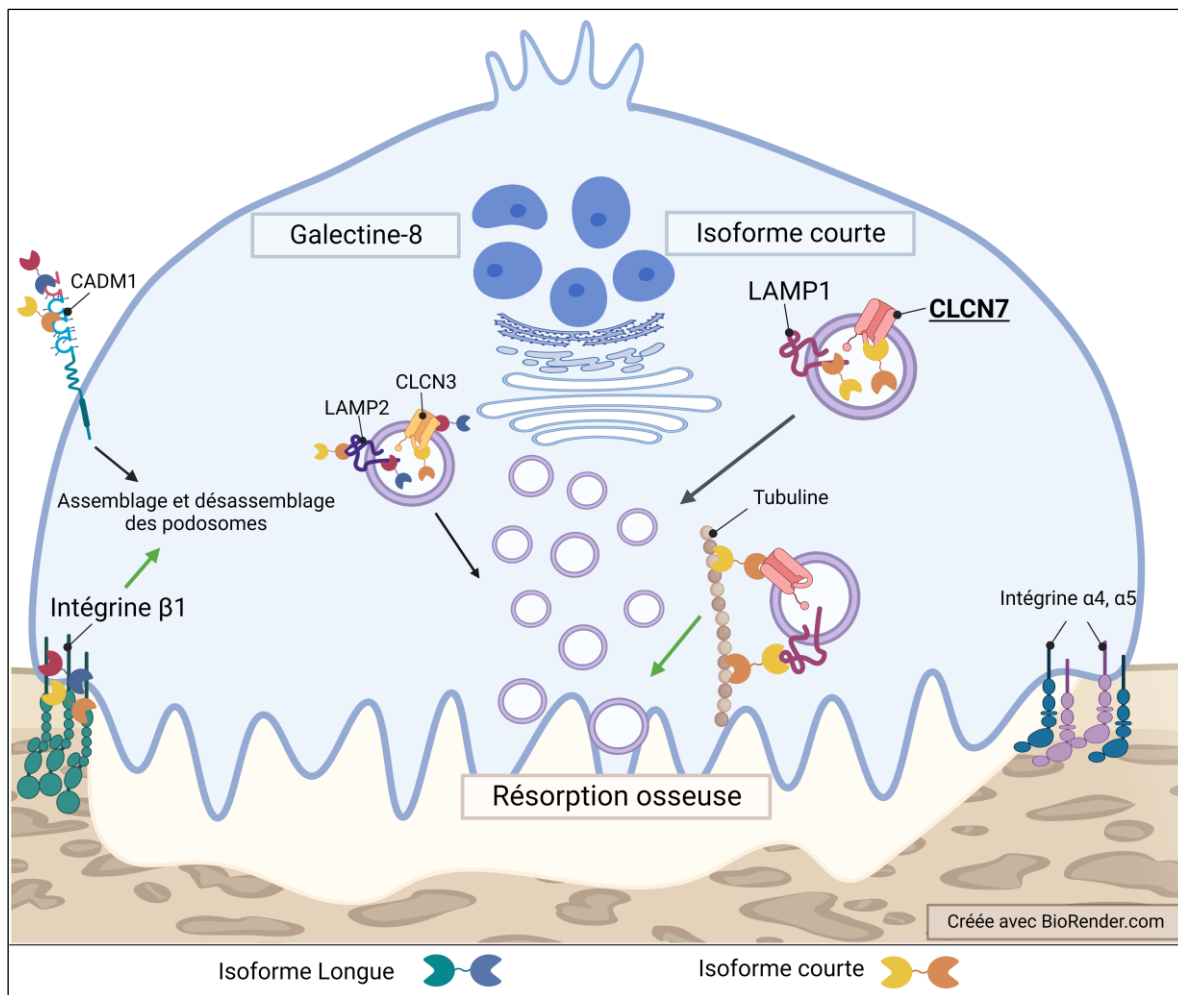


Figure 22: Régulation de la résorption osseuse par la galectine-8 et l'isoforme courte

La galectine-8 est directement impliquée dans la régulation de la résorption osseuse attribuable principalement au rôle de l'isoforme courte dans le transport apical des vésicules sécrétrices. La galectine-8 pourrait cependant avoir un rôle prédominant dans l'assemblage et le désassemblage des podosomes pour la migration de l'ostéoclaste. Le rôle prédominant de l'isoforme courte dans le transport apical pourrait être grâce à son interaction avec CLCN7, essentielle à la résorption osseuse, mais le mécanisme pour son transport à la membrane plissée grâce à cette interaction reste à déterminer.

la galectine-8 dans la résorption osseuse. À l'aide de différents mutants de l'isoforme courte de la galectine-8, il serait possible de déterminer quel CRD de la galectine-8 interagit avec les carbohydrates, la nature de la liaison et les partenaires d'interaction de haute affinité de l'isoforme courte. (Kim et al., 2013; Nishi et al., 2003) De plus, l'évaluation de la colocalisation entre l'isoforme courte et la tubuline dans l'ostéoclaste actif permettrait de déterminer si l'isoforme se situe à l'intérieur ou à l'extérieur des lysosomes sécrétrices pour réguler leur transport apical. Ces

informations pourraient éclaircir le rôle prédominant de l'isoforme courte de la galectine-8 dans l'ostéoclaste actif.

L'interaction préférentielle entre l'isoforme courte et CLCN7 pourrait expliquer son rôle prédominant dans la régulation de la résorption osseuse alors que la CLCN7 est essentielle à l'activité de l'ostéoclaste. (Kornak et al., 2001) Cependant, comme plusieurs partenaires d'interaction soient spécifiques de l'isoforme courte soient communs aux deux isoformes de la galectine-8 sont localisés aux vésicules sécrétrices, l'isoforme longue pourrait aussi y participer dans une moindre mesure. Comme le montre notre analyse de la structure de chacune des isoformes générée par AlphaFold2, qui apparaît instable et altérant la configuration stérique des interactions, la structure de l'isoforme longue pourrait réduire son efficacité à interagir avec les glycanes et diminuer sa participation dans le transport apical des protéines. Il serait intéressant de préciser le rôle de la galectine-8 et de son isoforme courte dans le transport vésiculaire des lysosomes en évaluant la distribution de CLCN7, interacteur spécifique de l'isoforme courte, et CLCN3, interacteur commun des deux isoformes, lors de la réduction de l'expression de la galectine-8 et ses isoformes. Une distribution altérée de CLCN7 lors de la diminution spécifique de l'expression de l'isoforme courte pourrait renforcer l'hypothèse d'une interaction préférentielle entre l'isoforme courte et CLCN7.

Si nous considérons que la galectine-8 médie le transport vésiculaire par sa présence à l'intérieur des vésicules, la localisation intravésiculaire de l'isoforme longue pourrait être réduite en raison de sa conformation. La localisation intracellulaire après l'endocytose de la galectine-8 diffère selon les glycanes disponibles à la surface de la cellule. (Carlsson et al., 2007a) L'encombrement stérique causé par le peptide de liaison pourrait faire en sorte que l'isoforme courte et l'isoforme longue ne lient pas les mêmes aglycones et ne soient pas localisées aux mêmes vésicules. Les isoformes n'auraient donc pas les mêmes fonctions dans le transport vésiculaire. La même logique s'applique si la galectine-8 est en mesure de s'insérer dans les vésicules par une translocation directe de la membrane. La réduction de l'interaction de l'isoforme longue avec certains partenaires due à l'encombrement stérique pourrait limiter son insertion dans les vésicules. (Sparn et al., 2022) Toutefois, lorsque présente en majorité, l'isoforme longue pourrait lier les mêmes partenaires d'interaction que l'isoforme courte et maintenir la résorption osseuse sans être aussi efficace que l'isoforme courte. (Carlsson et al., 2007b; Lo et al., 2021) Donc, la diminution de l'expression de l'isoforme longue ne contribue pas à l'hyperactivité des ostéoclastes pagétiques. Toutefois, nos résultats permettent d'affirmer que l'augmentation de l'expression de l'isoforme courte causée par

l'altération de l'épissage alternatif de *LGALS8* pourrait contribuer au phénotype de l'ostéoclaste pagétique en favorisant l'activité de résorption par l'augmentation de la localisation des vésicules sécrétrices à la membrane plissée. En plus de son implication dans le transport vésiculaire, l'isoforme courte pourrait participer à la régulation de l'adhésion et de la migration de l'ostéoclaste par son interaction avec des protéines d'adhésion parmi ses partenaires d'interaction spécifiques telles que la glycoprotéine trophoblastique (TPBG) et les intégrines $\alpha 4$ et $\alpha 5$.

L'une des forces de notre étude est l'utilisation d'ostéoclastes humains qui permet l'obtention de résultats qui se rapprochent davantage de l'ostéoclaste pagétique. Certaines études ont d'ailleurs montré des différences entre la régulation des ostéoclastes murins et humains. (Chamoux et al., 2010; Pennanen et al., 2021) Nos résultats appuient ces observations. Bien que les fonctions des isoformes, comme celles de la galectine-8, peuvent varier selon le type cellulaire et le contexte physiologique à un autre, les résultats contradictoires concernant les fonctions des isoformes et l'impact de la longueur du peptide de liaison pourraient être en partie liés à l'étude des isoformes de différentes espèces. (Elola, 2014) L'épissage alternatif de la galectine-8 n'est pas conservé entre la souris et l'humain et la variation de la longueur du peptide de liaison est seulement de 9 aa chez la souris et de 42 aa chez l'humain. (Tribulatti et al., 2007) Nos résultats sont en accord avec des études ayant utilisé les isoformes humaines pour évaluer leurs fonctions qui proposent une activité moindre de l'isoforme longue. (Carlsson et al., 2007b; Zhang et al., 2015) Cependant, certaines études ayant utilisé les isoformes de souris suggèrent des rôles identiques pour les deux isoformes. (Tribulatti et al., 2009, 2007) Vu la petite différence de taille entre le peptide de liaison des deux isoformes chez la souris, l'encombrement stérique causé par le peptide de liaison de l'isoforme longue serait moindre chez la souris et les deux isoformes seraient en mesure de lier avec la même capacité les partenaires d'interaction ce qui ne représente pas la régulation des fonctions des isoformes chez l'humain selon notre étude. D'ailleurs, l'isoforme longue est la forme canonique chez la souris soulignant les divergences de l'épissage alternatif de *LGALS8* entre espèces.

Un autre point fort de notre étude est l'évaluation de l'effet direct de la galectine-8 et de ses isoformes sur les ostéoclastes isolés. Les effets de la galectine-8 sur l'os ont déjà été montrés autant chez la souris déficiente en galectine-8 que celle surexprimant la protéine dans des modèles dont l'altération de l'expression de la protéine n'était pas cellule spécifique. (Vinik et al., 2018, 2015) Ces études ont d'ailleurs souligné les nombreux effets que peut avoir la galectine-8 sur les différentes cellules du micro-environnement osseux qui rend l'interprétation des fonctions prédominantes de la galectine-8 sur un type cellulaire spécifique très difficile. En plus de l'ostéoblaste dont l'expression

de RANKL est augmentée en présence de la galectine-8, d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales favorisent aussi indirectement l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse par la production de cytokines telles que TNFA, IL1B et IL6. (J. Shi et al., 2023) Afin de bien définir le rôle de la galectine-8 sur l'ostéoclaste et sur le remodelage osseux, il était donc important de définir ses rôles dans l'ostéoclaste en minimisant l'apport des cellules du micro-environnement. Nous avons montré que l'augmentation de l'activité de l'ostéoclaste observée lors de l'augmentation de l'expression de la galectine-8 dans ces modèles murins n'est pas seulement causée par un rôle indirect de la protéine, mais favorise aussi directement la résorption osseuse.

Pour confirmer nos observations sur le métabolisme osseux *in vivo*, il serait nécessaire d'utiliser des modèles murins transgéniques dont la surexpression ou l'inhibition d'une protéine, dans notre cas la galectine-8, est spécifique aux ostéoclastes comme le permettent les modèles murins transgéniques utilisés par Sheng et collaborateurs ou Csete et collaborateurs. (Csete et al., 2019; Sheng et al., 2009) L'utilisation de modèles murins pour évaluer le rôle de la galectine-8 est possible vu la conservation des CRDs de la protéine entre espèces. Cependant, comme mentionné précédemment, le peptide de liaison n'est pas conservé entre espèces. Il serait donc nécessaire d'humaniser une partie du gène *Lgals8* en insérant la partie du gène humain codant pour le peptide de liaison pour évaluer l'effet de l'épissage alternatif de la galectine-8 *in vivo*. Une seconde souris transgénique dont une partie de *Lgals8* est humanisée en insérant seulement la séquence génique codante du peptide de liaison de l'isoforme courte, c'est-à-dire sans l'exon VIIIb, serait nécessaire pour évaluer le rôle de l'isoforme courte *in vivo*. (Zhu et al., 2019)

4.7.2 Mieux caractériser le rôle des protéines d'intérêt dans la résorption osseuse

Nos deux protéines d'intérêt, TBC1D25 et la galectine-8, sont directement impliquées dans la régulation de la formation de la membrane plissée et de la zone de scellement, mais nous n'avons pas été en mesure de définir les mécanismes exacts impliqués. Des validations expérimentales similaires pourraient être effectuées pour permettre de mieux définir le rôle prédominant de chacune d'elles dans la résorption osseuse après avoir mieux identifié leurs partenaires d'interaction dans ces différentes fonctions.

Il serait premièrement intéressant d'évaluer l'effet de la diminution de leur expression sur la formation des structures caractéristiques de l'ostéoclaste actif en immunofluorescence. Pour évaluer l'effet sur la formation de la membrane plissée, il serait nécessaire d'évaluer la localisation de la CTSK permettant d'identifier un défaut de transport des vésicules ou de la formation de la membrane plissée. Il serait aussi nécessaire d'évaluer la formation et les caractéristiques de la zone

de scellement à l'aide du marquage de F-actine. De plus, il serait intéressant d'évaluer la profondeur des lacunes de résorption osseuse formées dans les différentes conditions à l'aide d'un profilomètre optique pour déterminer si l'activité de résorption osseuse en plus de la motilité de la cellule pourraient être affectées lors de la modulation de l'expression des différentes protéines. (Pascaretti-Grizon et al., 2011) Ceci pourrait permettre de déterminer si comme le proposent nos observations, TBC1D25 et la galectine-8 participent à la régulation du cytosquelette associée à la zone de scellement. De plus, ces analyses permettraient de confirmer le rôle prédominant de l'isoforme courte de la galectine-8 dans la formation de la membrane plissée et possiblement un rôle commun des isoformes de la galectine-8 dans la migration de l'ostéoclaste. Finalement, afin d'évaluer la capacité des ostéoclastes à assembler et désassembler leurs podosomes dans les différentes conditions expérimentales, un essai de reformation de la zone de scellement pourrait être effectué. (Roscher et al., 2016) Cette expérience pourrait permettre de déterminer si les deux protéines participent à la régulation de l'alternance de l'ostéoclaste entre sa position fixe pour la résorption et sa migration. Ces informations supplémentaires pourraient mieux définir leur rôle dans le transport des lysosomes sécrétoires et la formation de la membrane plissée ainsi que leur rôle dans le réarrangement du cytosquelette et la formation de la zone de scellement.

4.8 Implication de l'épissage alternatif dans le phénotype de l'ostéoclaste pagétique

Bien que nous ayons démontré l'implication de l'épissage alternatif de deux protéines dans la régulation de l'ostéoclaste et son activité de résorption osseuse, la contribution de l'épissage alternatif sur le phénotype de l'ostéoclaste pagétique reste difficile à évaluer. Les résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de l'isoforme courte de la galectine-8 favorise la résorption osseuse et participe à l'hyperactivité de l'ostéoclaste pagétique par le trafic de protéines impliquées dans la résorption osseuse. L'expression augmentée de la galectine-8 pourrait aussi favoriser le nombre plus élevé d'ostéoclastes aux sites du remaniement pagétique et la survie des cellules. Toutefois, l'effet de l'épissage alternatif de TBC1D25 semble moins évident. La diminution de l'expression de la protéine ne jouerait pas un rôle prédominant dans l'établissement du phénotype de l'ostéoclaste pagétique contenu des faibles variations concernant la diminution de la résorption osseuse, la diminution du nombre de cellules multinucléées et la diminution de la multinucléation lors de la diminution de son expression. Toutefois, les mécanismes impliqués dans la régulation de ces processus n'ont pas été déterminés. Bien qu'en apparence la diminution de TBC1D25 régule négativement les fonctions de l'ostéoclaste, plus d'informations sur ses substrats sont nécessaires pour conclure sur son véritable rôle. De plus, en collaboration avec d'autres

facteurs, TBC1D25 pourrait expliquer certains aspects de l'ostéoclaste pagétique. Par exemple, si l'altération de l'épissage alternatif de TBC1D25 diminue la motilité de l'ostéoclaste sans l'abolir, TBC1D25 pourrait favoriser la formation de lacune de résorption osseuse plus profonde par l'ostéoclaste pagétique hyperactif.

D'ailleurs, il est important de prendre en considération tous les gènes dont l'épissage alternatif est altéré dans l'ostéoclaste pagétique puisque même si les protéines codées par les six gènes dont l'épissage alternatif a été associé au phénotype de l'ostéoclaste pagétique (*LGALS8*, *USP4*, *CASC4*, *PIDD1*, *RHOT1*, *TBC1D25*) ont des rôles dans des processus cellulaires différents, ceux-ci peuvent tout de même avoir des rôles interreliés ou pourraient avoir une régulation d'amont par un régulateur commun de l'épissage alternatif. Nous avons montré que malgré des interactions moléculaires et des fonctions rapportées différentes, TBC1D25 et la galectine-8 sont directement impliqués dans les événements du transport vésiculaire associés à la résorption osseuse et à la régulation des podosomes. De plus, les deux protéines semblent jouer plusieurs rôles d'importance variable dans l'ostéoclaste et dont certains rôles pourraient participer à l'établissement du phénotype de l'ostéoclaste pagétique alors que d'autres seraient de moindre importance en raison de la contribution majeure d'un autre gène.

De ce fait, les événements de l'épissage alternatif ont été identifiés conjointement et aucune évidence ne suggère que ces événements surviennent indépendamment les uns des autres. Il est donc nécessaire d'évaluer l'effet de l'épissage alternatif de chacun de ces gènes en débutant par déterminer si les gènes jouent effectivement un rôle dans la survie et l'activité de résorption osseuse comme nous l'avons fait dans les deux études portant sur TBC1D25 et la galectine-8 afin de confirmer la pertinence d'évaluer le rôle de leurs isoformes. Les quatre autres gènes identifiés dans l'étude précédente sur l'épissage alternatif dans les ostéoclastes pagétiques, *USP4*, *CASC4*, *PIDD1* et *RHOT1*, n'ont toujours pas de fonction connue dans l'ostéoclaste, mais sont tous associés à des fonctions qui suggèrent un rôle important de leurs protéines correspondantes dans l'ostéoclaste. (Klinck et al., 2014) De plus, l'identification des facteurs qui influencent l'altération de l'épissage alternatif des gènes dans l'ostéoclaste pagétique serait nécessaire à la meilleure compréhension de l'apport de ces événements sur le phénotype de l'ostéoclaste pagétique. L'épissage alternatif est régulé par environ 300 protéines et l'altération de leur expression ou de leur modification post-traductionnelle peut altérer les événements de la maturation de l'ARN. Certaines voies de signalisation régulent les modifications post-traductionnelles favorisant l'activation de protéines impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif tel que AKT1. L'augmentation de l'activation

de AKT1 en plus de favoriser la survie directement par l'activation de la voie de signalisation de MTORC1, pourrait favoriser l'altération de l'épissage alternatif dans l'ostéoclaste pagétique. (McManus et al., 2016; Urbanski et al., 2018) L'épigénétique est un autre facteur qui joue un rôle important dans la régulation de l'épissage alternatif. L'expression de plusieurs protéines impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif est régulée par les miARNs. Le laboratoire de Dre Roux a aussi montré l'implication de la variation de l'expression de miARNs contribuant au phénotype de l'ostéoclaste pagétique. (Nguyen et al., 2021; Stephens et al., 2020) L'altération de l'expression de miARNs peut impacter directement l'expression des protéines régulant l'épissage alternatif et indirectement par l'altération de l'expression de facteurs de transcription ou par la régulation de voies de signalisation affectant ces protéines. (Urbanski et al., 2018) Seul le changement de l'expression ou de la régulation d'une protéine de l'épissage alternatif est nécessaire pour moduler l'épissage de nombreux gènes comme il a été montré dans le cancer. (Anczuków et al., 2015; Urbanski et al., 2018) La recherche d'un facteur de régulation commun menant à l'altération de l'épissage alternatif des six gènes de l'ostéoclaste pagétique permettrait donc une meilleure compréhension de l'altération de l'épissage alternatif sur le phénotype de l'ostéoclaste pagétique. Dans un premier temps, l'analyse différentielle de l'expression génique des facteurs de l'épissage alternatif dans les ostéoclastes pagétiques et dans les ostéoclastes sains permettrait de cibler les facteurs potentiellement impliqués dans l'épissage alternatif altéré de *TBC1D25*, *LGALS8*, *CASC4*, *PIDD1*, *USP4* et *RHOT1*. Dans un deuxième temps, il serait possible de réduire le nombre de facteurs potentiellement en cause en analysant la présence de séquences ciblées par les facteurs d'épissage alternatif dans les six gènes d'intérêt. Finalement, l'évaluation du profil des isoformes des six gènes lors de la réduction de l'expression des facteurs de l'épissage alternatif ciblés permettrait de trouver un facteur d'épissage alternatif commun en amont de *TBC1D25*, *LGALS8*, *USP4*, *CASC4*, *RHOT1* et *PIDD1* causant les événements de l'épissage alternatif contribuant au phénotype de l'ostéoclaste pagétique. (Brosseau et al., 2014b; Du et al., 2021) Il reste donc beaucoup de travail pour mieux comprendre la contribution de l'altération de l'épissage alternatif sur le phénotype de l'ostéoclaste pagétique. Un facteur commun d'épissage de plusieurs gènes ostéoclastiques pourrait devenir une cible thérapeutique dans les pathologies avec hyperrésorption osseuse pour cibler plusieurs facettes dérégulées de l'ostéoclaste comme dans la maladie de Paget.

Même avec ces informations, la maladie de Paget est définitivement multifactorielle et la contribution de l'épissage alternatif ne peut être déterminée indépendamment des multiples facteurs qui influencent la différenciation, la survie et l'activité de l'ostéoclaste pagétique. Tout de

même, l'ostéoclaste pagétique est un modèle intéressant pour découvrir de nouvelles protéines impliquées dans la biologie de l'ostéoclaste et ultimement élaborer de nouveaux traitements pour les maladies osseuses causées par l'hyperactivité des ostéoclastes. Nos études ont permis de confirmer l'importance de protéines nouvellement associées à la biologie de l'ostéoclaste grâce à une étude antérieure de l'ostéoclaste pagétique. Nos études ne permettent toutefois pas de proposer l'une de ses protéines comme cible thérapeutique pour le moment puisqu'il manque plusieurs informations sur leur rôle respectif. Il sera nécessaire d'établir leur mécanisme d'action respectif avant de déterminer si ce sont des candidats potentiels pour l'élaboration de traitement. Toutefois, dans l'éventualité où l'une d'entre elles est une cible potentielle, plusieurs possibilités sont disponibles ou à l'étude pour moduler leur expression ou leur activité à des fins de traitement. (Brosseau et al., 2014a; Prieto-Dominguez et al., 2019; Vladoiu et al., 2014)

CONCLUSION

En conclusion, nos travaux soulignent l'implication de l'épissage alternatif dans la régulation des fonctions de l'ostéoclaste par la mise en évidence du rôle de deux gènes et leurs protéines correspondantes dans la régulation de l'ostéoclaste humain.

Premièrement, nos résultats montrent le rôle de TBC1D25, la première rabGAP impliquée dans la biologie de l'ostéoclaste. Nos résultats suggèrent un rôle pour TBC1D25 dans la régulation de la multinucléation de la cellule qui affecte indirectement son activité. De plus, la distribution de la rabGAP dans l'ostéoclaste actif suggère qu'elle est directement impliquée dans la résorption osseuse et pourrait réguler l'activité de rabs à la zone de scellement et à la membrane plissée. Cependant, les fonctions précises de TBC1D25 dans la régulation de la formation de ces deux structures restent à définir par l'identification de ses partenaires d'interaction et de ses substrats dans l'ostéoclaste humains. L'étude de l'interaction entre TBC1D25 et quelques-uns des partenaires d'interaction identifiés permettra de mieux comprendre l'importance de TBC1D25 dans la régulation du transport vésiculaire de l'ostéoclaste humain.

Deuxièmement, nos résultats montrent un rôle direct de la galectine-8 dans la régulation de l'ostéoclaste humain. La galectine-8 semble avoir de multiples fonctions affectant indirectement la résorption osseuse. Par l'activation de signalisations, elle favoriserait la survie de l'ostéoclaste en plus de réguler leur multinucléation. Par l'entremise de l'activité de son isoforme courte, la galectine-8 régule directement la résorption osseuse. L'isoforme courte est impliquée dans le transport apical de vésicules sécrétrices par son interaction avec CLCN7 et LAMP1. Toutefois, le mécanisme exact impliquant l'isoforme courte dans le transport apical reste à déterminer, tout comme pour les autres rôles de la galectine-8. Les multiples partenaires d'interaction identifiés dans notre étude donnent cependant plusieurs perspectives de recherche pour définir les mécanismes impliqués dans les rôles variés de la galectine-8.

Bien que leur rôle exact reste à déterminer, nos études ont identifié deux nouvelles protéines impliquées dans la biologie de l'ostéoclaste humain qui donne de nouvelles perspectives sur la régulation de l'ostéoclaste humain.

REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier ma directrice de recherche, Dre Sophie Roux, de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma maîtrise et mon doctorat dans son laboratoire. Ce qui devait être un court séjour de trois mois a finalement été un long parcours de neuf ans qui a passé si vite. Merci de m'avoir partagé votre savoir et votre passion, d'avoir été à l'écoute et patiente, de m'avoir donné la liberté d'explorer mes hypothèses, de m'avoir donné la chance de participer à des congrès nationaux et internationaux et beaucoup plus.

J'aimerais aussi remercier Pre Claire Dubois, Pr Steve Jean et Pr Pierre Moffatt qui ont accepté deux fois plutôt qu'une d'évaluer mes travaux durant mon parcours au doctorat. Je suis très reconnaissante que vous ayez accepté de prendre de nouveau de votre précieux temps pour évaluer cette thèse.

J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à l'avancement de mes projets de recherche pendant tout mon parcours aux études graduées. J'aimerais spécialement remercier Papa Yaya et Elizabeth qui ont toujours été prêts à offrir leur aide pour explorer mes nombreuses idées. J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire du Pr Parent : Jade, Chantal, Louis, Laurie, Samuel et beaucoup d'autres, qui m'ont offert leur savoir et leur matériel pour mener à terme mes projets de recherche.

Au-delà de la science, certaines personnes du laboratoire ont fait la différence dans mon quotidien aux études graduées. Merci à Papa Yaya, Victor, Sophie et Flore qui ont chacun à leur manière ensoleillé les jours où la science ne voulait pas coopérer. Merci à mon laboratoire adoptif, le laboratoire du Pr Parent, de m'avoir accueilli parmi eux pour des dîners et des soirées toujours très divertissants. J'aimerais spécialement remercier Elizabeth et Audrey avec qui j'ai pu célébrer mes succès, mais aussi passer à travers les moments plus difficiles grâce à leur écoute et leur soutien.

Les études graduées m'ont permis de rencontrer des gens extraordinaires qui sont devenus des amis. J'aimerais remercier Jade, Stéphanie et Michaël pour leur support, mais surtout nos nombreuses soirées inoubliables. Les soupers au Persépolis qui ont toujours fini trop tard, la bière du vendredi, la pizza gratuite au Mondial, les matchs au Centre Bell sont quelques uns des événements marquants de mes études graduées grâce à vous. Jade, nos soirées hockey ou OD qui finissaient en soirée à potiner ou à prendre la résolution d'avoir une vie plus équilibrée me manquent. Tu as été marquante autant au niveau professionnel que personnel ces dernières années. J'aimerais aussi remercier Sophie pour tout ce qu'elle a fait pour me soutenir dans les bons moments comme les moments difficiles. Je suis extrêmement reconnaissante de ton écoute et de ton aide. J'espère que mon parcours aux études graduées n'était que le début de ces merveilleuses amitiés.

Je me dois de remercier mes superviseurs à Statistique Canada qui ont été compréhensifs à mes demandes dans les dix dernières années pour que je puisse faire de mes études ma priorité. Concilier ces deux univers n'a pas toujours été facile, mais avec ces gens à l'écoute, j'ai réussi. J'aimerais aussi remercier un collègue et ami, Gabriel, qui est un support moral depuis plusieurs

années autant au cours des longues journées à parler à des boîtes vocales que lors des différentes embûches que j'ai rencontrées aux études graduées.

Malgré mes efforts, j'ai malheureusement eu de la difficulté à trouver l'équilibre entre les études graduées et ma vie personnelle à plusieurs moments au cours de ce long parcours. J'aimerais remercier tous les gens de mon entourage qui malgré mes absences à pleins d'événements importants ont pris le temps de m'encourager et de m'accueillir à bras ouverts quand j'avais la chance de trouver un moment pour eux.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille qui malgré leur incompréhension du monde de la science et des études graduées m'a toujours soutenue. Merci à mes parents, Nancy et Denis, d'avoir cru en moi plus souvent que moi-même et d'avoir allégé mon quotidien pour que je puisse me dévouer à la science. Merci à mon frère, Dominic, et ma sœur, Jennifer, de toujours avoir été présents pour moi. Mes interminables journées de travail n'auraient pas été les mêmes sans vos appels pour parler de tout et de rien, mais surtout merci pour ces moments où j'ai pu oublier les études graduées et simplement profiter de la vie en votre compagnie. Ces quatre personnes sont des sources d'inspiration au niveau de leur persévérance, leur éthique de travail et leur détermination à être chaque jour des meilleurs personnes autant dans leur vie personnelle que professionnelle qui m'a permise d'accomplir ce doctorat.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abdelmaseeh, P., Tiu, A.C., Rozyyev, S., Asico, L.D., Jose, P.A., Villar, V.A.M., 2021. Isolation of Lipid Rafts by the Detergent-Based and Non-detergent-Based Methods for Localization of GPCRs with Immunoblotting and Laser Scanning Confocal Microscopy. *Methods Mol. Biol.* 2268, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1221-7_1
- Abu-Amer, Y., Teitelbaum, S.L., Chappel, J.C., Schlesinger, P., Ross, F.P., 1999. Expression and Regulation of RAB3 Proteins in Osteoclasts and Their Precursors. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1855–1860. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.11.1855>
- AbuSamra, D.B., Martínez-Carrasco, R., Argüeso, P., 2022. Galectins Differentially Regulate the Surface Glycosylation of Human Monocytes. *Biomolecules* 12, 1168. <https://doi.org/10.3390/biom12091168>
- AbuSamra, D.B., Panjwani, N., Argüeso, P., 2021. Induction of CXCL10-Mediated Cell Migration by Different Types of Galectins. *Cells* 10, 274. <https://doi.org/10.3390/cells10020274>
- Agence de la santé publique du Canada, 2022. Rapport de surveillance sur les chutes chez les aînées au Canada. Agence de la santé publique du Canada.
- Agence de la santé publique du Canada, 2020. L'ostéoporose et les fractures connexes au Canada.
- Agence de la santé publique du Canada, A. de la santé publique du, 2014. Chutes chez les aînés au Canada : Deuxième rapport [WWW Document]. URL <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/promotion-sante/vieillesse-aines/publications/publications-grand-public/chutes-chez-aines-canada-deuxieme-rapport.html> (accessed 6.27.23).
- Ahmed, H., Banerjee, P.P., Vasta, G.R., 2007. Differential expression of galectins in normal, benign and malignant prostate epithelial cells: Silencing of galectin-3 expression in prostate cancer by its promoter methylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.114>
- Alam, M.S., 2018. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr. Protoc. Immunol.* 123, e58. <https://doi.org/10.1002/cpim.58>
- Alaya, R., Alaya, Z., Nang, M., Bouajina, E., 2018. Maladie osseuse de Paget : actualités diagnostiques et thérapeutiques. *Rev. Médecine Interne* 39, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2017.05.010>
- Albagha, O.M.E., Wani, S.E., Visconti, M.R., Alonso, N., Goodman, K., Brandi, M.L., Cundy, T., Chung, P.Y.J., Dargie, R., Devogelaer, J.-P., Falchetti, A., Fraser, W.D., Gennari, L., Gianfrancesco, F., Hooper, M.J., Van Hul, W., Isaia, G., Nicholson, G.C., Nuti, R., Papapoulos, S., Montes, J. del P., Ratajczak, T., Rea, S.L., Rendina, D., Gonzalez-Sarmiento, R., Di Stefano, M., Ward, L.C., Walsh, J.P., Ralston, S.H., 2011. Genome-wide association identifies three new susceptibility loci for Paget's disease of bone. *Nat. Genet.* 43, 685–689. <https://doi.org/10.1038/ng.845>

- Almannai, M., Marafi, D., El-Hattab, A.W., 2022. WIPI proteins: Biological functions and related syndromes. *Front. Mol. Neurosci.* 15, 1011918. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1011918>
- Amarasekara, D.S., Kim, S., Rho, J., 2021. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2851. <https://doi.org/10.3390/ijms22062851>
- Amarasekara, D.S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., Rho, J., 2018. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw.* 18, e8. <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e8>
- Amaya, C., Fader, C.M., Colombo, M.I., 2015. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. *FEBS Lett.* 589, 3343–3353. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.021>
- An, G., Acharya, C., Feng, X., Wen, K., Zhong, M., Zhang, L., Munshi, N.C., Qiu, L., Tai, Y.-T., Anderson, K.C., 2016. Osteoclasts promote immune suppressive microenvironment in multiple myeloma: therapeutic implication. *Blood* 128, 1590–1603. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-707547>
- Anczuków, O., Akerman, M., Cléry, A., Wu, J., Shen, C., Shirole, N.H., Raimer, A., Sun, S., Jensen, M.A., Hua, Y., Allain, F.H.-T., Krainer, A.R., 2015. SRSF1-Regulated Alternative Splicing in Breast Cancer. *Mol. Cell* 60, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.005>
- Araki, M., Kontani, K., 2021. Regulation of lysosomal positioning via TMEM55B phosphorylation. *J. Biochem. (Tokyo)* 169, 507–509. <https://doi.org/10.1093/jb/mvab013>
- Arbel-Goren, R., Levy, Y., Ronen, D., Zick, Y., 2005. Cyclin-dependent Kinase Inhibitors and JNK Act as Molecular Switches, Regulating the Choice between Growth Arrest and Apoptosis Induced by Galectin-8. *J. Biol. Chem.* 280, 19105–19114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502060200>
- Arif, M., Makaram, N.S., Macpherson, G.J., Ralston, S.H., 2023. Outcomes following Total Hip and Knee Arthroplasty in Patients Who Have Paget's Disease of Bone: A Systematic Review. *J. Arthroplasty.* <https://doi.org/10.1016/j.arth.2023.01.004>
- Arthur, C.M., Baruffi, M.D., Cummings, R.D., Stowell, S.R., 2015. Evolving Mechanistic Insights into Galectin Functions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1207, 1–35. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1396-1_1
- Asagiri, M., Takayanagi, H., 2007. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.09.023>
- Banaganapalli, B., Fallatah, I., Alsubhi, F., Shetty, P.J., Awan, Z., Elango, R., Shaik, N.A., 2023. Paget's disease: a review of the epidemiology, etiology, genetics, and treatment. *Front. Genet.* 14, 1131182. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1131182>
- Bänfer, S., Jacob, R., 2020. Galectins in Intra- and Extracellular Vesicles. *Biomolecules* 10, 1232. <https://doi.org/10.3390/biom10091232>
- Baralle, F.E., Giudice, J., 2017. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 437–451. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.27>

- Baron, R., Vignery, A., 1981. Behavior of osteoclasts during a rapid change in their number induced by high doses of parathyroid hormone or calcitonin in intact rats. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* 2, 339–346. [https://doi.org/10.1016/0221-8747\(81\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0221-8747(81)90020-5)
- Barr, F., Lambright, D.G., 2010. Rab GEFs and GAPs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.04.007>
- Bell, S.L., Lopez, K.L., Cox, J.S., Patrick, K.L., Watson, R.O., 2021. Galectin-8 Senses Phagosomal Damage and Recruits Selective Autophagy Adapter TAX1BP1 To Control Mycobacterium tuberculosis Infection in Macrophages. *mBio* 12, e01871-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01871-20>
- Bertram, L., Hiltunen, M., Parkinson, M., Ingelsson, M., Lange, C., Ramasamy, K., Mullin, K., Menon, R., Sampson, A.J., Hsiao, M.Y., Elliott, K.J., Velicelebi, G., Moscarillo, T., Hyman, B.T., Wagner, S.L., Becker, K.D., Blacker, D., Tanzi, R.E., 2005. Family-Based Association between Alzheimer's Disease and Variants in UBQLN1. *N. Engl. J. Med.* 352, 884–894. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa042765>
- Bhuin, T., Roy, J.K., 2014. Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Exp. Cell Res.* 328, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.027>
- Bidon, N., Brichory, F., Bourguet, P., Le Pennec, J.-P., Dazord, L., 2001a. Galectin-8: a complex sub-family of galectins. *Int. J. Mol. Med.* 8, 245–250. <https://doi.org/10.3892/ijmm.8.3.245>
- Bidon, N., Brichory, F., Hanash, S., Bourguet, P., Dazord, L., Le Pennec, J.-P., 2001b. Two messenger RNAs and five isoforms for Po66-CBP, a galectin-8 homolog in a human lung carcinoma cell line. *Gene* 274, 253–262. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00598-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00598-4)
- Bidon-Wagner, N., Le Pennec, J.-P., 2002. Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconj. J.* 19, 557–563. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014086.38343.98>
- Bo, T., Yan, F., Guo, J., Lin, X., Zhang, H., Guan, Q., Wang, H., Fang, L., Gao, L., Zhao, J., Xu, C., 2016. Characterization of a Relatively Malignant Form of Osteopetrosis Caused by a Novel Mutation in the PLEKHM1 Gene. *J. Bone Miner. Res.* 31, 1979–1987. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2885>
- Bohari, M.H., Yu, X., Zick, Y., Blanchard, H., 2016. Structure-based rationale for differential recognition of lacto- and neolacto- series glycosphingolipids by the N-terminal domain of human galectin-8. *Sci. Rep.* 6, 39556. <https://doi.org/10.1038/srep39556>
- Borchers, A.-C., Langemeyer, L., Ungermann, C., 2021. Who's in control? Principles of Rab GTPase activation in endolysosomal membrane trafficking and beyond. *J. Cell Biol.* 220, e202105120. <https://doi.org/10.1083/jcb.202105120>
- Borggaard, X.G., Pirapaharan, D.C., Delaissé, J.-M., Sjøe, K., 2020. Osteoclasts' Ability to Generate Trenches Rather Than Pits Depends on High Levels of Active Cathepsin K and Efficient Clearance of Resorption Products. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5924. <https://doi.org/10.3390/ijms21165924>
- Boyce, B.F., 2013. Advances in the Regulation of Osteoclasts and Osteoclast Functions. *J. Dent. Res.* 92, 860–867. <https://doi.org/10.1177/0022034513500306>

Boyle, K.B., Randow, F., 2013. The role of 'eat-me' signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.010>

Boyle, K.B., Ravenhill, B.J., Randow, F., 2019. CALCOCO2/NDP52 initiates selective autophagy through recruitment of ULK and TBK1 kinase complexes. *Autophagy* 15, 1655. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1628548>

Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342.

Brand, C., Oliveira, F.L., Ricon, L., Fermino, M.L., Boldrini, L.C., Hsu, D.K., Liu, F.T., Chammas, R., Borojevic, R., Farina, M., El-Cheikh, M.C., 2011. The bone marrow compartment is modified in the absence of galectin-3. *Cell Tissue Res.* 346, 427–437. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1276-5>

Brandwood, C.P., Hoyland, J.A., Hillarby, M.C., Berry, J.L., Davies, M., Selby, P.L., Mee, A.P., 2003. Apoptotic gene expression in Paget's disease: a possible role for Bcl-2. *J. Pathol.* 201, 504–512. <https://doi.org/10.1002/path.1463>

Brighouse, A., Dacks, J.B., Field, M.C., 2010. Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3449–3465. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0436-1>

Brinchmann, M.F., Patel, D.M., Iversen, M.H., 2018. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018, 9186940. <https://doi.org/10.1155/2018/9186940>

Brosseau, J.-P., Lucier, J.-F., Lamarche, A.-A., Shkreta, L., Gendron, D., Lapointe, E., Thibault, P., Paquet, É., Perreault, J.-P., Abou Elela, S., Chabot, B., 2014a. Redirecting splicing with bifunctional oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 42, e40–e40. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1287>

Brosseau, J.-P., Lucier, J.-F., Nwilati, H., Thibault, P., Garneau, D., Gendron, D., Durand, M., Couture, S., Lapointe, E., Prinos, P., Klinck, R., Perreault, J.-P., Chabot, B., Abou-Ellela, S., 2014b. Tumor microenvironment-associated modifications of alternative splicing. *RNA* 20, 189–201. <https://doi.org/10.1261/rna.042168.113>

Burr, D.B., 2019. Changes in bone matrix properties with aging. *Bone* 120, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.010>

Caballe, A., Wenzel, D.M., Agromayor, M., Alam, S.L., Skalicky, J.J., Kloc, M., Carlton, J.G., Labrador, L., Sundquist, W.I., Martin-Serrano, J., n.d. ULK3 regulates cytokinetic abscission by phosphorylating ESCRT-III proteins. *eLife* 4, e06547. <https://doi.org/10.7554/eLife.06547>

Cagnoni, A.J., Troncoso, M.F., Rabinovich, G.A., Mariño, K.V., Elola, M.T., 2020. Full-length galectin-8 and separate carbohydrate recognition domains: the whole is greater than the sum of its parts? *Biochem. Soc. Trans.* 48, 1255–1268. <https://doi.org/10.1042/BST20200311>

Camby, I., Belot, N., Rorive, S., Lefranc, F., Maurage, C.-A., Lahm, H., Kaltner, H., Hadari, Y.R., Ruchoux, M., Brotchi, J., Yehiel Zick, Salmon, Isabelle, Gabius, Hans-Joachim, Kiss, Robert, 2011.

Galectins are differentially expressed in supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas, and significantly modulate tumor astrocyte migration. *Brain Pathol.* 12–26.

Cappariello, A., Maurizi, A., Veeriah, V., Teti, A., 2014. Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast. *Arch. Biochem. Biophys.* 561, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.08.009>

Capulli, M., Paone, R., Rucci, N., 2014. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys., Bone: A dynamic and integrating tissue* 561, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>

Cárcamo, C., Pardo, E., Oyanadel, C., Bravo-Zehnder, M., Bull, P., Cáceres, M., Martínez, J., Massardo, L., Jacobelli, S., González, A., Soza, A., 2006. Galectin-8 binds specific $\beta 1$ integrins and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Exp. Cell Res.* 312, 374–386. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.025>

Carlsson, M.C., Balog, C.I.A., Kilsgård, O., Hellmark, T., Bakoush, O., Segelmark, M., Fernö, M., Olsson, H., Malmström, J., Wuhrer, M., Leffler, H., 2012. Different fractions of human serum glycoproteins bind galectin-1 or galectin-8, and their ratio may provide a refined biomarker for pathophysiological conditions in cancer and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj., Glycoproteomics* 1820, 1366–1372. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.01.007>

Carlsson, S., Carlsson, M.C., Leffler, H., 2007a. Intracellular sorting of galectin-8 based on carbohydrate fine specificity. *Glycobiology* 17, 906–912. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm059>

Carlsson, S., Öberg, C.T., Carlsson, M.C., Sundin, A., Nilsson, U.J., Smith, D., Cummings, R.D., Almkvist, J., Karlsson, A., Leffler, H., 2007b. Affinity of galectin-8 and its carbohydrate recognition domains for ligands in solution and at the cell surface. *Glycobiology* 17, 663–676. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm026>

Cattaneo, V., Tribulatti, M.V., Campetella, O., 2011. Galectin-8 tandem-repeat structure is essential for T-cell proliferation but not for co-stimulation. *Biochem. J.* 434, 153–160. <https://doi.org/10.1042/BJ20101691>

Cattaneo, V., Tribulatti, M.V., Carabelli, J., Carestia, A., Schattner, M., Campetella, O., 2014. Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology* 24, 966–973. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu060>

Chamoux, E., Bisson, M., Payet, M.D., Roux, S., 2010. TRPV-5 Mediates a Receptor Activator of NF- κ B (RANK) Ligand-induced Increase in Cytosolic Ca²⁺ in Human Osteoclasts and Down-regulates Bone Resorption. *J. Biol. Chem.* 285, 25354–25362. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.075234>

Chamoux, E., Couture, J., Bisson, M., Morissette, J., Brown, J.P., Roux, S., 2009. The p62 P392L Mutation Linked to Paget's Disease Induces Activation of Human Osteoclasts. *Mol. Endocrinol.* 23, 1668–1680. <https://doi.org/10.1210/me.2009-0066>

Chamoux, E., McManus, S., Laberge, G., Bisson, M., Roux, S., 2013. Involvement of kinase PKC-zeta in the p62/p62P392L-driven activation of NF- κ B in human osteoclasts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1832, 475–484. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.008>

Chan, Y.-C., Lin, H.-Y., Tu, Z., Kuo, Y.-H., Hsu, S.-T.D., Lin, C.-H., 2018. Dissecting the Structure–Activity Relationship of Galectin–Ligand Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 392. <https://doi.org/10.3390/ijms19020392>

Charles, J.F., Coury, F., Sulyanto, R., Sitara, D., Wu, J., Brady, N., Tsang, K., Sigrist, K., Tollefsen, D.M., He, L., Storm, D., Aliprantis, A.O., 2012a. The collection of NFATc1-dependent transcripts in the osteoclast includes numerous genes non-essential to physiologic bone resorption. *Bone* 51, 902–912. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.08.113>

Charles, J.F., Coury, F., Sulyanto, R., Sitara, D., Wu, J., Brady, N., Tsang, K., Sigrist, K., Tollefsen, D.M., He, L., Storm, D., Aliprantis, A.O., 2012b. The collection of NFATc1-dependent transcripts in the osteoclast includes numerous genes non-essential to physiologic bone resorption. *Bone* 51, 902–912. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.08.113>

Chen, M., Manley, J.L., 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 741–754. <https://doi.org/10.1038/nrm2777>

Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Velletri, T., Zhang, X., Xu, C., Zhang, L., Yang, H., Hou, J., Wang, Y., Shi, Y., 2016. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* 23, 1128–1139. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.168>

Chen, W.-S., Cao, Z., Sugaya, S., Lopez, M.J., Sendra, V.G., Laver, N., Leffler, H., Nilsson, U.J., Fu, J., Song, J., Xia, L., Hamrah, P., Panjwani, N., 2016. Pathological lymphangiogenesis is modulated by galectin-8-dependent crosstalk between podoplanin and integrin-associated VEGFR-3. *Nat. Commun.* 7, 11302. <https://doi.org/10.1038/ncomms11302>

Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E.M., Xie, C., 2018. Osteoblast-Osteoclast Interactions. *Connect. Tissue Res.* 59, 99–107. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>

Chen, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Yu, J., Tang, L., 2022. Galectin-1 deletion in mice causes bone loss via impaired osteogenic differentiation potential of BMSCs. *FASEB J.* 36, e22516. <https://doi.org/10.1096/fj.202200397R>

Cherfils, J., Zeghouf, M., 2013. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* 93, 269–309. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012>

Chou, F.-C., Chen, H.-Y., Kuo, C.-C., Sytwu, H.-K., 2018. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 430. <https://doi.org/10.3390/ijms19020430>

Chung, Y.-H., Yoon, S.-Y., Choi, B., Sohn, D.H., Yoon, K.-H., Kim, W.-J., Kim, D.-H., Chang, E.-J., 2012. Microtubule-associated protein light chain 3 regulates Cdc42-dependent actin ring formation in osteoclast. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 989–997. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.007>

Colley, K.J., Varki, A., Haltiwanger, R.S., Kinoshita, T., 2022. Cellular Organization of Glycosylation, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Mohnen, D., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Condon, N.D., Heddleston, J.M., Chew, T.-L., Luo, L., McPherson, P.S., Ioannou, M.S., Hodgson, L., Stow, J.L., Wall, A.A., 2018. Macropinosome formation by tent pole ruffling in macrophages. *J. Cell Biol.* 217, 3873–3885. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804137>

Coxon, F.P., Helfrich, M.H., Larijani, B., Muzylak, M., Dunford, J.E., Marshall, D., McKinnon, A.D., Nesbitt, S.A., Horton, M.A., Seabra, M.C., Ebetino, F.H., Rogers, M.J., 2001. Identification of a Novel Phosphonocarboxylate Inhibitor of Rab Geranylgeranyl Transferase That Specifically Prevents Rab Prenylation in Osteoclasts and Macrophages *. *J. Biol. Chem.* 276, 48213–48222. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106473200>

Coxon, F.P., Taylor, A., 2008. Vesicular trafficking in osteoclasts. *Semin. Cell Dev. Biol., Bone Remodelling* 19, 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.08.004>

Csete, D., Simon, E., Alatshan, A., Aradi, P., Dobó-Nagy, C., Jakus, Z., Benkő, S., Győri, D.S., Mócsai, A., 2019. Hematopoietic or Osteoclast-Specific Deletion of Syk Leads to Increased Bone Mass in Experimental Mice. *Front. Immunol.* 10, 937. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00937>

Cueni, L.N., Detmar, M., 2009. Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp. Cell Res.* 315, 1715–1723. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.02.021>

Cummings, R.D., Liu, F.-T., Rabinovich, G.A., Stowell, S.R., Vasta, G.R., 2022. Galectins, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Mohnen, D., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Cundy, T., 2018. Paget's disease of bone. *Metab. - Clin. Exp.* 80, 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.06.010>

Cunningham, F., Allen, J.E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M.R., Armean, I.M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A.G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., Donaldson, S., El Houdaigui, B., El Naboulsi, T., Fatima, R., Giron, C.G., Genez, T., Martinez, J.G., Guijarro-Clarke, C., Gymer, A., Hardy, M., Hollis, Z., Hourlier, T., Hunt, T., Juettemann, T., Kaikala, V., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D., Marugán, J.C., Mohanan, S., Mushtaq, A., Naven, M., Ogeh, D.N., Parker, A., Parton, A., Perry, M., Piližota, I., Prosovetskaia, I., Sakhthivel, M.P., Salam, A.I.A., Schmitt, B.M., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Pérez-Silva, J.G., Stark, W., Steed, E., Sutinen, K., Sukumaran, R., Sumathipala, D., Suner, M.-M., Szpak, M., Thormann, A., Tricomi, F.F., Urbina-Gómez, D., Veidenberg, A., Walsh, T.A., Walts, B., Willhoft, N., Winterbottom, A., Wass, E., Chakiachvili, M., Flint, B., Frankish, A., Giorgetti, S., Haggerty, L., Hunt, S.E., Iisley, G.R., Loveland, J.E., Martin, F.J., Moore, B., Mudge, J.M., Muffato, M., Perry, E., Ruffier, M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S.J., Dyer, S., Harrison, P.W., Howe, K.L., Yates, A.D., Zerbino, D.R., Flicek, P., 2022. *Ensembl 2022*. *Nucleic Acids Res.* 50, D988–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>

Dai, Q., Xie, F., Han, Y., Ma, X., Zhou, S., Jiang, L., Zou, W., Wang, J., 2017. Inactivation of Regulatory-associated Protein of mTOR (Raptor)/Mammalian Target of Rapamycin Complex 1

(mTORC1) Signaling in Osteoclasts Increases Bone Mass by Inhibiting Osteoclast Differentiation in Mice. *J. Biol. Chem.* 292, 196–204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764761>

D'Arcy, M.S., 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43, 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>

Daroszewska, A., van 't Hof, R.J., Rojas, J.A., Layfield, R., Landao-Basonga, E., Rose, L., Rose, K., Ralston, S.H., 2011. A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSMT1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2734–2744. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr172>

Del Olmo, T., Lauzier, A., Normandin, C., Larcher, R., Lecours, M., Jean, D., Lessard, L., Steinberg, F., Boisvert, F.-M., Jean, S., 2019. APEX2-mediated RAB proximity labeling identifies a role for RAB21 in clathrin-independent cargo sorting. *EMBO Rep.* 20, e47192. <https://doi.org/10.15252/embr.201847192>

Delacour, D., Koch, A., Jacob, R., 2009. The Role of Galectins in Protein Trafficking. *Traffic* 10, 1405–1413. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00960.x>

Delaisse, J.-M., Andersen, T.L., Kristensen, H.B., Jensen, P.R., Andreasen, C.M., Sørensen, K., 2020. Rethinking the bone remodeling cycle mechanism and the origin of bone loss. *Bone* 141, 115628. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115628>

Delgado, V.M.C., Nugnes, L.G., Colombo, L.L., Troncoso, M.F., Fernández, M.M., Malchiodi, E.L., Frahm, I., Croci, D.O., Compagno, D., Rabinovich, G.A., Wolfenstein-Todel, C., Elola, M.T., 2011. Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the “tandem-repeat” lectin galectin-8. *FASEB J.* 25, 242–254. <https://doi.org/10.1096/fj.09-144907>

Delgado-Calle, J., Bellido, T., 2022. The osteocyte as a signaling cell. *Physiol. Rev.* 102, 379–410. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2020>

Dell'Atti, C., Cassar-Pullicino, V.N., Lalam, R.K., Tins, B.J., Tyrrell, P.N.M., 2007. The spine in Paget's disease. *Skeletal Radiol.* 36, 609–626. <https://doi.org/10.1007/s00256-006-0270-6>

DeSelm, C.J., Miller, B.C., Zou, W., Beatty, W.L., van Meel, E., Takahata, Y., Klumperman, J., Tooze, S.A., Teitelbaum, S.L., Virgin, H.W., 2011. Autophagy Proteins Regulate the Secretory Component of Osteoclastic Bone Resorption. *Dev. Cell* 21, 966–974. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.016>

Ding, X., Jiang, X., Tian, R., Zhao, P., Li, L., Wang, X., Chen, S., Zhu, Y., Mei, M., Bao, S., Liu, W., Tang, Z., Sun, Q., 2019. RAB2 regulates the formation of autophagosome and autolysosome in mammalian cells. *Autophagy* 15, 1774–1786. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596478>

Dings, R.P.M., Miller, M.C., Griffin, R.J., Mayo, K.H., 2018. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 905. <https://doi.org/10.3390/ijms19030905>

Diskin, S., Cao, Z., Leffler, H., Panjwani, N., 2009. The role of integrin glycosylation in galectin-8-mediated trabecular meshwork cell adhesion and spreading. *Glycobiology* 19, 29–37. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn100>

- Diskin, S., Chen, W.-S., Cao, Z., Gyawali, S., Gong, H., Soza, A., González, A., Panjwani, N., 2012. Galectin-8 Promotes Cytoskeletal Rearrangement in Trabecular Meshwork Cells through Activation of Rho Signaling. *PLoS ONE* 7, e44400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044400>
- Dong, C., Wu, G., 2007. Regulation of anterograde transport of adrenergic and angiotensin II receptors by Rab2 and Rab6 GTPases. *Cell. Signal.* 19, 2388–2399. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.07.017>
- Du, J.-X., Zhu, G.-Q., Cai, J.-L., Wang, B., Luo, Y.-H., Chen, C., Cai, C.-Z., Zhang, S.-J., Zhou, J., Fan, J., Zhu, W., Dai, Z., 2021. Splicing factors: Insights into their regulatory network in alternative splicing in cancer. *Cancer Lett.* 501, 83–104. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.11.043>
- Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V., Vandenabeele, P., 2009. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect., Forum on mechanisms and roles of cell death during microbial infections* 11, 1050–1062. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.08.013>
- Durdan, M.M., Azaria, R.D., Weivoda, M.M., 2022. Novel Insights into the Coupling of Osteoclasts and Resorption to Bone Formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 123, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.10.008>
- Duval, S., Abu-Thuraia, A., Elkhohi, I.E., Chen, R., Seebun, D., Mayne, J., Côté, J.-F., Figeys, D., Seidah, N.G., 2020. Shedding of cancer susceptibility candidate 4 by the convertases PC7/furin unravels a novel secretory protein implicated in cancer progression. *Cell Death Dis.* 11, 665. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02893-0>
- Elola, M.T., 2014. Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histol. Histopathol.* 1093–1105. <https://doi.org/10.14670/HH-29.1093>
- Elola, M.T., Blidner, A.G., Ferragut, F., Bracalente, C., Rabinovich, G.A., 2015. Assembly, organization and regulation of cell-surface receptors by lectin–glycan complexes. *Biochem. J.* 469, 1–16. <https://doi.org/10.1042/BJ20150461>
- Elola, M.T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M.F., Vasta, G.R., Rabinovich, G.A., 2007. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1679–1700. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7044-8>
- Ersek, A., Xu, K., Antonopoulos, A., Butters, T.D., Santo, A.E., Vattakuzhi, Y., Williams, L.M., Goudevenou, K., Danks, L., Freidin, A., Spanoudakis, E., Parry, S., Papaioannou, M., Hatjiharissi, E., Chaidos, A., Alonzi, D.S., Twigg, G., Hu, M., Dwek, R.A., Haslam, S.M., Roberts, I., Dell, A., Rahemtulla, A., Horwood, N.J., Karadimitris, A., 2015. Glycosphingolipid synthesis inhibition limits osteoclast activation and myeloma bone disease. *J. Clin. Invest.* 125, 2279–2292. <https://doi.org/10.1172/JCI59987>
- Eshkar Sebban, L., Ronen, D., Levartovsky, D., Elkayam, O., Caspi, D., Aamar, S., Amital, H., Rubinow, A., Golan, Ira, Naor, D., Zick, Y., Golan, Itshak, 2007. The Involvement of CD44 and Its Novel Ligand Galectin-8 in Apoptotic Regulation of Autoimmune Inflammation1. *J. Immunol.* 179, 1225–1235. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1225>

Esmail, S., Manolson, M.F., 2021. Advances in understanding N-glycosylation structure, function, and regulation in health and disease. *Eur. J. Cell Biol.* 100, 151186. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2021.151186>

Faccio, R., Takeshita, S., Colaianni, G., Chappel, J., Zallone, A., Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., 2007. M-CSF Regulates the Cytoskeleton via Recruitment of a Multimeric Signaling Complex to c-Fms Tyr-559/697/721*. *J. Biol. Chem.* 282, 18991–18999. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610937200>

Fatiga, F.F., Wang, L., Hsu, T., Capuno, J.I., Fu, C., 2021. Miro1 functions as an inhibitory regulator of MFN at elevated mitochondrial Ca²⁺ levels. *J. Cell. Biochem.* 122, 1848–1862. <https://doi.org/10.1002/jcb.30138>

Feldmann, A., Bekbulat, F., Huesmann, H., Ulbrich, S., Tatzelt, J., Behl, C., Kern, A., 2017. The RAB GTPase RAB18 modulates macroautophagy and proteostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 738–743. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.112>

Feng, Y., Tran, M.T., Lu, Y., Htike, K., Okusha, Y., Sogawa, C., Eguchi, T., Kadowaki, T., Sakai, E., Tsukuba, T., Okamoto, K., 2022. Rab34 plays a critical role as a bidirectional regulator of osteoclastogenesis. *Cell Biochem. Funct.* 40, 263–277. <https://doi.org/10.1002/cbf.3691>

Fernández, M.M., Ferragut, F., Cárdenas Delgado, V.M., Bracalente, C., Bravo, A.I., Cagnoni, A.J., Nuñez, M., Morosi, L.G., Quinta, H.R., Espelt, M.V., Troncoso, M.F., Wolfenstein-Todel, C., Mariño, K.V., Malchiodi, E.L., Rabinovich, G.A., Elola, M.T., 2016. Glycosylation-dependent binding of galectin-8 to activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) promotes its surface segregation on breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1860, 2255–2268. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.04.019>

Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, Es, M.J., Cerri, P.S., 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res. Int.* 2015, e421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>

Fong, D., Bisson, M., Laberge, G., McManus, S., Grenier, G., Faucheux, N., Roux, S., 2013. Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro. *Cell. Signal.* 25, 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.12.003>

Franz-Odendaal, T.A., Hall, B.K., Witten, P.E., 2006. Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn.* 235, 176–190. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20603>

Frasa, M.A.M., Koessmeier, K.T., Ahmadian, M.R., Braga, V.M.M., 2012. Illuminating the functional and structural repertoire of human TBC/RABGAPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 67–73. <https://doi.org/10.1038/nrm3267>

Friedel, M., André, S., Goldschmidt, H., Gabius, H.-J., Schwartz-Albiez, R., 2016. Galectin-8 enhances adhesion of multiple myeloma cells to vascular endothelium and is an adverse prognostic factor. *Glycobiology* 26, 1048–1058. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww066>

Friedrichs, W.E., Reddy, S.V., Bruder, J.M., Cundy, T., Cornish, J., Singer, F.R., Roodman, G.D., 2002. Sequence Analysis of Measles Virus Nucleocapsid Transcripts in Patients with Paget's Disease. *J. Bone Miner. Res.* 17, 145–151. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.145>

- Fujiwara, T., Ye, S., Castro-Gomes, T., Winchell, C.G., Andrews, N.W., Voth, D.E., Varughese, K.I., Mackintosh, S.G., Feng, Y., Pavlos, N., Nakamura, T., Manolagas, S.C., Zhao, H., 2016. PLEKHM1/DEF8/RAB7 complex regulates lysosome positioning and bone homeostasis. *JCI Insight* 1. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.86330>
- Fukuda, M., 2013. Rab27 Effectors, Pleiotropic Regulators in Secretory Pathways. *Traffic* 14, 949–963. <https://doi.org/10.1111/tra.12083>
- Fukuda, M., 2011. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci. Rep.* 31, 159–168. <https://doi.org/10.1042/BSR20100112>
- Gabius, H.-J., Cudic, M., Diercks, T., Kaltner, H., Kopitz, J., Mayo, K.H., Murphy, P.V., Oscarson, S., Roy, R., Schedlbauer, A., Toegel, S., Romero, A., 2022. What is the Sugar Code? *ChemBioChem* 23, e202100327. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100327>
- Gagneux, P., Hennet, T., Varki, A., 2022. Biological Functions of Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Mohnen, D., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Galea, G., Bexiga, M.G., Panarella, A., O’Neill, E.D., Simpson, J.C., 2015. A high-content screening microscopy approach to dissect the role of Rab proteins in Golgi-to-ER retrograde trafficking. *J Cell Sci* 128, 2339–2349. <https://doi.org/10.1242/jcs.167973>
- Gallagher, L.E., Chan, E.Y.W., 2013. Early signalling events of autophagy. *Essays Biochem.* 55, 1–15. <https://doi.org/10.1042/bse0550001>
- Gavriljuk, K., Gazdag, E.-M., Itzen, A., Kötting, C., Goody, R.S., Gerwert, K., 2012. Catalytic mechanism of a mammalian Rab·RabGAP complex in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 21348–21353. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214431110>
- Gendron, E., Bouchard, F., Singbo, N., Brown, J.P., Michou, L., 2023. Decline in clinical severity of Paget’s disease of bone: Comparison between a contemporary cohort and a historical cohort. *Bone* 170, 116721. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2023.116721>
- Gennari, L., Rendina, D., Merlotti, D., Cavati, G., Mingiano, C., Cosso, R., Materozzi, M., Pirrotta, F., Abate, V., Calabrese, M., Falchetti, A., 2022. Update on the pathogenesis and genetics of Paget’s disease of bone. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 932065. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.932065>
- Georgess, D., Machuca-Gayet, I., Blangy, A., Jurdic, P., 2014. Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adhes. Migr.* 8, 192–204. <https://doi.org/10.4161/cam.27840>
- Gibieža, P., Prekeris, R., 2017. Rab GTPases and cell division. *Small GTPases* 9, 107–115. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1313182>
- Gingery, A., Bradley, E., Shaw, A., Oursler, M.J., 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase coordinately activates the MEK/ERK and AKT/NFκB pathways to maintain osteoclast survival. *J. Cell. Biochem.* 89, 165–179. <https://doi.org/10.1002/jcb.10503>

- Giovanni, S.D., Biase, A.D., Yakovlev, A., Finn, T., Beers, J., Hoffman, E.P., Faden, A.I., 2005. In Vivo and in Vitro Characterization of Novel Neuronal Plasticity Factors Identified following Spinal Cord Injury. *J. Biol. Chem.* 280, 2084–2091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411975200>
- Glantschnig, H., Fisher, J.E., Wesolowski, G., Rodan, G.A., Reszka, A.A., 2003a. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.* 10, 1165–1177. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401285>
- Glantschnig, H., Fisher, J.E., Wesolowski, G., Rodan, G.A., Reszka, A.A., 2003b. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.* 10, 1165–1177. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401285>
- Goldenberg, N.M., Grinstein, S., Silverman, M., 2007. Golgi-bound Rab34 Is a Novel Member of the Secretory Pathway. *Mol. Biol. Cell* 18, 4762–4771. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-11-0991>
- Goldenberg, N.M., Silverman, M., 2009. Rab34 and its effector munc13-2 constitute a new pathway modulating protein secretion in the cellular response to hyperglycemia. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 297, C1053–C1058. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00286.2009>
- Gopalkrishnan, R.V., Roberts, T., Tuli, S., Kang, D., Christiansen, K.A., Fisher, P.B., 2000. Molecular characterization of prostate carcinoma tumor antigen-1, PCTA-1, a human Galectin-8 related gene. *Oncogene* 19, 4405–4416. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203767>
- Gruber, R., 2015. Molecular and cellular basis of bone resorption. *Wien. Med. Wochenschr.* 165, 48–53. <https://doi.org/10.1007/s10354-014-0310-0>
- Gu, J., Min, W., Zhao, Y., Zhang, X., Yuan, Y., Liu, X., Bian, J., Tong, X., Liu, Z., 2021a. The Role of Galectin-3 in 1 α ,25(OH)2D3-Regulated Osteoclast Formation from White Leghorn Chickens In Vitro. *Vet. Sci.* 8, 234. <https://doi.org/10.3390/vetsci8100234>
- Gu, J., Zhang, X., Zhang, C., Li, Y., Bian, J., Liu, X., Yuan, Y., Zou, H., Tong, X., Liu, Z., 2021b. Galectin-3 Contributes to the Inhibitory Effect of 1 α ,25-(OH)2D3 on Osteoclastogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13334. <https://doi.org/10.3390/ijms222413334>
- Guay-Bélanger, S., Cormier, J.-G., Michou, L., 2015. La maladie osseuse de Paget, une condition évanescence ? *Rev. Rhum.* 82, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2014.10.006>
- Guo, S., Liu, Y., Gao, L., Xiao, F., Shen, J., Xing, S., Yang, F., Zhang, W., Shi, Q., Li, Y., Zhao, L., 2020. TBC1D25 Regulates Cardiac Remodeling Through TAK1 Signaling Pathway. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 1335–1348. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41130>
- Hadari, Y.R., Arbel-Goren, R., Levy, Y., Amsterdam, A., Alon, R., Zakut, R., Zick, Y., 2000. Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J. Cell Sci.* 113, 2385–2397. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.13.2385>
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., Ohsumi, Y., 2007. The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy*. *J. Biol. Chem.* 282, 37298–37302. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700195200>

Häuser, F., Gökce, S., Werner, G., Danckwardt, S., Sollfrank, S., Neukirch, C., Beyer, V., Hennermann, J.B., Lackner, K.J., Mengel, E., Rossmann, H., 2020. A non-invasive diagnostic assay for rapid detection and characterization of aberrant mRNA-splicing by nonsense mediated decay inhibition. *Mol. Genet. Metab.* 130, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.03.002>

Helfrich, M.H., Hobson, R.P., Grabowski, P.S., Zurbriggen, A., Cosby, S.L., Dickson, G.R., Fraser, W.D., Ooi, C.G., Selby, P.L., Crisp, A.J., Wallace, R.G.H., Kahn, S., Ralston, S.H., 2000. A Negative Search for a Paramyxoviral Etiology of Paget's Disease of Bone: Molecular, Immunological, and Ultrastructural Studies in U.K. Patients. *J. Bone Miner. Res.* 15, 2315–2329. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.12.2315>

Helfrich, M.H., Hocking, L.J., 2008. Genetics and aetiology of Pagetic disorders of bone. *Arch. Biochem. Biophys.*, Highlight Issue: Bone Remodeling: Facts and Perspectives 473, 172–182. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.045>

Helfrich, M.H., Nesbitt, S.A., Lakkakorpi, P.T., Barnes, M.J., Bodary, S.C., Shankar, G., Mason, W.T., Mendrick, D.L., Väänänen, H.K., Horton, M.A., 1996. $\beta 1$ integrins and osteoclast function: Involvement in collagen recognition and bone resorption. *Bone* 19, 317–328. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(96\)00223-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00223-2)

Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E.G., Yagi, F., Kasai, K., 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj., Animal Lectins* 1572, 232–254. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00311-2)

Hiraiwa, M., Ozaki, K., Yamada, T., Iezaki, T., Park, G., Fukasawa, K., Horie, T., Kamada, H., Tokumura, K., Motono, M., Kaneda, K., Hinoi, E., 2019. mTORC1 Activation in Osteoclasts Prevents Bone Loss in a Mouse Model of Osteoporosis. *Front. Pharmacol.* 10, 684. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00684>

Hirano, S., Uemura, T., Annoh, H., Fujita, N., Waguri, S., Itoh, T., Fukuda, M., 2016. Differing susceptibility to autophagic degradation of two LC3-binding proteins: SQSTM1/p62 and TBC1D25/OATL1. *Autophagy* 12, 312–326. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1124223>

Hirvonen, Mirkka J., Büki, K.G., Sun, Y., Mulari, M.T.K., Härkönen, P.L., Väänänen, K.H., 2013. Novel interaction of Rab13 and Rab8 with endospansins. *FEBS Open Bio* 3, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.01.004>

Hirvonen, Mirkka J., Fagerlund, K., Lakkakorpi, P., Väänänen, H.K., Mulari, M.T.K., 2013. Novel perspectives on the transcytotic route in osteoclasts. *BoneKey Rep.* 2, 306. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.40>

Hirvonen, M.J., Mulari, M.T.K., Büki, K.G., Vihko, P., Härkönen, P.L., Väänänen, H.K., 2012. Rab13 Is Upregulated During Osteoclast Differentiation and Associates with Small Vesicles Revealing Polarized Distribution in Resorbing Cells. *J. Histochem. Cytochem.* 60, 537–549. <https://doi.org/10.1369/0022155412448069>

Homma, Y., Hiragi, S., Fukuda, M., 2021. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *Febs J.* 288, 36–55. <https://doi.org/10.1111/febs.15453>

- Houde, N., Chamoux, E., Bisson, M., Roux, S., 2009. Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) Induces Human Osteoclast Apoptosis by Up-regulating Bim. *J. Biol. Chem.* 284, 23397–23404. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019372>
- Hsu, M.-K., Lin, H.-Y., Chen, F.-C., 2017. NMD Classifier: A reliable and systematic classification tool for nonsense-mediated decay events. *PLOS ONE* 12, e0174798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174798>
- Hughes, R.C., 1999. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1473, 172–185. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00177-4)
- Hussein, O., Tiedemann, K., Murshed, M., Komarova, S.V., 2012. Rapamycin inhibits osteolysis and improves survival in a model of experimental bone metastases. *Cancer Lett.* 314, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.09.026>
- Hutagalung, A.H., Novick, P.J., 2011. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol. Rev.* 91, 119–149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>
- Iacobini, C., Fantauzzi, C.B., Bedini, R., Pecci, R., Bartolazzi, A., Amadio, B., Pesce, C., Pugliese, G., Menini, S., 2018. Galectin-3 is essential for proper bone cell differentiation and activity, bone remodeling and biomechanical competence in mice. *Metab. - Clin. Exp.* 83, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.02.001>
- Ideo, H., Matsuzaka, T., Nonaka, T., Seko, A., Yamashita, K., 2011. Galectin-8-N-domain Recognition Mechanism for Sialylated and Sulfated Glycans. *J. Biol. Chem.* 286, 11346–11355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.195925>
- Ideo, H., Seko, A., Ishizuka, I., Yamashita, K., 2003. The N-terminal carbohydrate recognition domain of galectin-8 recognizes specific glycosphingolipids with high affinity. *Glycobiology* 13, 713–723. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg094>
- Indo, Y., Takeshita, S., Ishii, K.-A., Hoshii, T., Aburatani, H., Hirao, A., Ikeda, K., 2013. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. *J. Bone Miner. Res.* 28, 2392–2399. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1976>
- Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., Fukuda, M., 2008. Golgi-resident Small GTPase Rab33B Interacts with Atg16L and Modulates Autophagosome Formation. *Mol. Biol. Cell* 19, 2916–2925. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1231>
- Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., Fukuda, M., 2011. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J. Cell Biol.* 192, 839–853. <https://doi.org/10.1083/jcb.201008107>
- Itoh, T., Satoh, M., Kanno, E., Fukuda, M., 2006. Screening for target Rabs of TBC (Treb2/Bub2/Cdc16) domain-containing proteins based on their Rab-binding activity. *Genes Cells* 11, 1023–1037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00997.x>
- Itzstein, C., Coxon, F.P., Rogers, M.J., 2011. The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases* 2, 117–130. <https://doi.org/10.4161/sgtp.2.3.16453>

Jansen, I.D.C., Vermeer, J.A.F., Bloemen, V., Stap, J., Everts, V., 2012. Osteoclast Fusion and Fission. *Calcif. Tissue Int.* 90, 515–522. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9600-y>

Janssens, S., Tinel, A., 2012. The PIDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. *Cell Death Differ.* 19, 13–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.162>

Jean, S., Cox, S., Nassari, S., Kiger, A.A., 2015. Starvation-induced MTMR13 and RAB21 activity regulates VAMP8 to promote autophagosome–lysosome fusion. *EMBO Rep.* 16, 297–311. <https://doi.org/10.15252/embr.201439464>

Jia, J., Abudu, Y.P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S.W., Peters, R., Mudd, M.H., Allers, L., Salemi, M., Phinney, B., Johansen, T., Deretic, V., 2018. Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Mol. Cell* 70, 120–135.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.009>

Johannes, L., Jacob, R., Leffler, H., 2018. Galectins at a glance. *J. Cell Sci.* 131, jcs208884. <https://doi.org/10.1242/jcs.208884>

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., Kim, D.-H., 2009. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1249>

Jurdic, P., Saltel, F., Chabadel, A., Destaing, O., 2006. Podosome and sealing zone: Specificity of the osteoclast model. *Eur. J. Cell Biol.* 85, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.09.008>

Kaltner, H., Solís, D., André, S., Lensch, M., Manning, J.C., Mürnseer, M., Sáiz, J.L., Gabius, H.-J., 2009. Unique Chicken Tandem-Repeat-Type Galectin: Implications of Alternative Splicing and a Distinct Expression Profile Compared to Those of the Three Proto-Type Proteins. *Biochemistry* 48, 4403–4416. <https://doi.org/10.1021/bi900083q>

Kalvari, I., Tsompanis, S., Mulakkal, N.C., Osgood, R., Johansen, T., Nezis, I.P., Promponas, V.J., 2014. iLIR. *Autophagy* 10, 913–925. <https://doi.org/10.4161/auto.28260>

Kamili, N.A., Arthur, C.M., Gerner-Smidt, C., Tafesse, E., Blenda, A., Dias-Baruffi, M., Stowell, S.R., 2016. Key regulators of galectin–glycan interactions. *PROTEOMICS* 16, 3111–3125. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600116>

Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H., Matsui, T., Ohbayashi, N., Fukuda, M., 2010. Comprehensive Screening for Novel Rab-Binding Proteins by GST Pull-Down Assay Using 60 Different Mammalian Rabs. *Traffic* 11, 491–507. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01038.x>

Kasmapour, B., Cai, L., Gutierrez, M.G., 2013. Spatial distribution of phagolysosomes is independent of the regulation of lysosome position by Rab34. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2057–2065. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.07.003>

Katsimbri, P., 2017. The biology of normal bone remodelling. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)* 26, e12740. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>

Kim, A.S., Girgis, C.M., McDonald, M.M., 2022. Osteoclast Recycling and the Rebound Phenomenon Following Denosumab Discontinuation. *Curr. Osteoporos. Rep.* 20, 505–515. <https://doi.org/10.1007/s11914-022-00756-5>

Kim, B.-W., Beom Hong, S., Hoe Kim, J., Hoon Kwon, D., Kyu Song, H., 2013. Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat. Commun.* 4, 1613. <https://doi.org/10.1038/ncomms2606>

Kim, D.-H., Behlke, M.A., Rose, S.D., Chang, M.-S., Choi, S., Rossi, J.J., 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat. Biotechnol.* 23, 222–226. <https://doi.org/10.1038/nbt1051>

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., Guan, K.-L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>

Kim, J.H., Kim, N., 2016. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med. J.* 52, 12–17. <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.12>

Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M.B., Shim, J.-H., 2020. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells* 9, 2073. <https://doi.org/10.3390/cells9092073>

Klinck, R., Laberge, G., Bisson, M., McManus, S., Michou, L., Brown, J.P., Roux, S., 2014. Alternative splicing in osteoclasts and Paget's disease of bone. *BMC Med. Genet.* 15, 98. <https://doi.org/10.1186/s12881-014-0098-1>

Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M.H., Abudu, Y.P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I.E., Adeli, K., Adolph, T.E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B.B., Agnello, M., Agostinis, P., Agrewala, J.N., Agrotis, A., Aguilar, P.V., Ahmad, S.T., Ahmed, Z.M., Ahumada-Castro, U., Aits, S., Aizawa, S., Akkoc, Y., Akoumianaki, T., Akpınar, H.A., Al-Abd, A.M., Al-Akra, L., Al-Gharaibeh, A., Alaoui-Jamali, M.A., Alberti, S., Alcocer-Gómez, E., Alessandri, C., Ali, M., Alim Al-Bari, M.A., Aliwaini, S., Alizadeh, J., Almacellas, E., Almasan, A., Alonso, A., Alonso, G.D., Altan-Bonnet, N., Altieri, D.C., Álvarez, É.M.C., Alves, S., Alves da Costa, C., Alzaharna, M.M., Amadio, M., Amantini, C., Amaral, C., Ambrosio, S., Amer, A.O., Ammanathan, V., An, Z., Andersen, S.U., Andrabi, S.A., Andrade-Silva, M., Andres, A.M., Angelini, S., Ann, D., Anozie, U.C., Ansari, M.Y., Antas, P., Antebi, A., Antón, Z., Anwar, T., Apetoh, L., Apostolova, N., Araki, T., Araki, Y., Arasaki, K., Araújo, W.L., Araya, J., Arden, C., Arévalo, M.-A., Arguelles, S., Arias, E., Arikath, J., Arimoto, H., Ariosa, A.R., Armstrong-James, D., Arnauné-Pelloquin, L., Aroca, A., Arroyo, D.S., Arsov, I., Artero, R., Asaro, D.M.L., Aschner, M., Ashrafizadeh, M., Ashur-Fabian, O., Atanasov, A.G., Au, A.K., Auberger, P., Auner, H.W., Aurelian, L., Autelli, R., Avagliano, L., Ávalos, Y., Aveic, S., Aveleira, C.A., Avin-Wittenberg, T., Aydin, Y., Ayton, S., Ayyadevara, S., Azzopardi, M., Baba, M., Backer, J.M., Backues, S.K., Bae, D.-H., Bae, O.-N., Bae, S.H., Baehrecke, E.H., Baek, A., Baek, S.-H., Baek, S.H., Bagetta, G., Bagniewska-Zadworna, A., Bai, H., Bai, J., Bai, X., Bai, Y., Bairagi, N., Baksi, S., Balbi, T., Baldari, C.T., Balduini, W., Ballabio, A., Ballester, M., Balazadeh, S., Balzan, R., Bandopadhyay, R., Banerjee, Sreeparna, Banerjee, Sulagna, Bánrétí, Á., Bao, Y., Baptista, M.S., Baracca, A., Barbati, C., Bargiela, A., Barilà, D., Barlow, P.G., Barmada, S.J., Barreiro, E., Barreto, G.E., Bartek, J., Bartel, B., Bartolome, A., Barve, G.R., Basagoudanavar, S.H., Bassham, D.C., Bast, R.C., Basu, A., Batoko, H., Batten, I., Baulieu, E.E., Baumgarner, B.L., Bayry, J., Beale, R., Beau, I., Beaumatin, F., Bechara, L.R.G., Beck, G.R., Beers, M.F., Begun, J., Behrends, C., Behrens, G.M.N., Bei, R., Bejarano, E., Bel, S., Behl, C., Belaid, A., Belgareh-Touzé, N., Bellarosa, C., Belleudi, F., Belló Pérez, M., Bello-Morales,

R., Beltran, J.S. de O., Beltran, S., Benbrook, D.M., Bendorius, M., Benitez, B.A., Benito-Cuesta, I., Bensalem, J., Berchtold, M.W., Berezowska, S., Bergamaschi, D., Bergami, M., Bergmann, A., Berliocchi, L., Berlioz-Torrent, C., Bernard, A., Berthouex, L., Besirli, C.G., Besteiro, S., Betin, V.M., Beyaert, R., Bezbradica, J.S., Bhaskar, K., Bhatia-Kissova, I., Bhattacharya, R., Bhattacharya, S., Bhattacharyya, S., Bhuiyan, Md.S., Bhutia, S.K., Bi, L., Bi, X., Biden, T.J., Bijian, K., Billes, V.A., Binart, N., Bincoletto, C., Birgisdottir, A.B., Bjorkoy, G., Blanco, G., Blas-Garcia, A., Blasiak, J., Blomgran, R., Blomgren, K., Blum, J.S., Boada-Romero, E., Boban, M., Boesze-Battaglia, K., Boeuf, P., Boland, B., Bomont, P., Bonaldo, P., Bonam, S.R., Bonfili, L., Bonifacino, J.S., Boone, B.A., Bootman, M.D., Bordi, M., Borner, C., Bornhauser, B.C., Borthakur, G., Bosch, J., Bose, S., Botana, L.M., Botas, J., Boulanger, C.M., Boulton, M.E., Bourdenx, M., Bourgeois, B., Bourke, N.M., Bousquet, G., Boya, P., Bozhkov, P.V., Bozi, L.H.M., Bozkurt, T.O., Brackney, D.E., Brandts, C.H., Braun, R.J., Braus, G.H., Bravo-Sagua, R., Bravo-San Pedro, J.M., Brest, P., Bringer, M.-A., Briones-Herrera, A., Broaddus, V.C., Brodersen, P., Brodsky, J.L., Brody, S.L., Bronson, P.G., Bronstein, J.M., Brown, C.N., Brown, R.E., Brum, P.C., Brumell, J.H., Brunetti-Pierri, N., Bruno, D., Bryson-Richardson, R.J., Bucci, C., Buchrieser, C., Bueno, M., Buitrago-Molina, L.E., Buraschi, S., Buch, S., Buchan, J.R., Buckingham, E.M., Budak, H., Budini, M., Bultynck, G., Burada, F., Burgoyne, J.R., Burón, M.I., Bustos, V., Büttner, S., Butturini, E., Byrd, A., Cabas, I., Cabrera-Benitez, S., Cadwell, K., Cai, J., Cai, L., Cai, Q., Cairó, M., Calbet, J.A., Caldwell, G.A., Caldwell, K.A., Call, J.A., Calvani, R., Calvo, A.C., Calvo-Rubio Barrera, M., Camara, N.O., Camonis, J.H., Camougrand, N., Campanella, M., Campbell, E.M., Campbell-Valois, F.-X., Campello, S., Campesi, I., Campos, J.C., Camuzard, O., Cancino, J., Candido de Almeida, D., Canesi, L., Caniggia, I., Canonico, B., Cantí, C., Cao, B., Caraglia, M., Caramés, B., Carchman, E.H., Cardenal-Muñoz, E., Cardenas, C., Cardenas, L., Cardoso, S.M., Carew, J.S., Carle, G.F., Carleton, G., Carloni, S., Carmona-Gutierrez, D., Carneiro, L.A., Carnevali, O., Carosi, J.M., Carra, S., Carrier, A., Carrier, L., Carroll, B., Carter, A.B., Carvalho, A.N., Casanova, M., Casas, C., Casas, J., Cassioli, C., Castillo, E.F., Castillo, K., Castillo-Lluva, S., Castoldi, F., Castori, M., Castro, A.F., Castro-Caldas, M., Castro-Hernandez, J., Castro-Obregon, S., Catz, S.D., Cavadas, C., Cavaliere, F., Cavallini, G., Cavinato, M., Cayuela, M.L., Cebollada Rica, P., Cecarini, V., Cecconi, F., Cechowska-Pasko, M., Cenci, S., Ceperuelo-Mallafré, V., Cerqueira, J.J., Cerutti, J.M., Cervia, D., Cetintas, V.B., Cetrullo, S., Chae, H.-J., Chagin, A.S., Chai, C.-Y., Chakrabarti, G., Chakrabarti, O., Chakraborty, Tapas, Chakraborty, Trinad, Chami, M., Chamilos, G., Chan, D.W., Chan, E.Y.W., Chan, E.D., Chan, H.Y.E., Chan, H.H., Chan, H., Chan, M.T.V., Chan, Y.S., Chandra, P.K., Chang, C.-P., Chang, C., Chang, H.-C., Chang, K., Chao, J., Chapman, T., Charlet-Berguerand, N., Chatterjee, S., Chaube, S.K., Chaudhary, A., Chauhan, S., Chaum, E., Checler, F., Cheetham, M.E., Chen, C.-S., Chen, G.-C., Chen, J.-F., Chen, L.L., Chen, Leilei, Chen, Lin, Chen, M., Chen, M.-K., Chen, N., Chen, Q., Chen, R.-H., Chen, S., Chen, Wei, Chen, Weiqiang, Chen, X.-M., Chen, X.-W., Chen, X., Chen, Yan, Chen, Y.-G., Chen, Yingyu, Chen, Yongqiang, Chen, Y.-J., Chen, Y.-Q., Chen, Z.S., Chen, Zhi, Chen, Z.-H., Chen, Z.J., Chen, Zhixiang, Cheng, H., Cheng, J., Cheng, S.-Y., Cheng, W., Cheng, X., Cheng, X.-T., Cheng, Y., Cheng, Z., Chen, Zhong, Cheong, H., Cheong, J.K., Chernyak, B.V., Cherry, S., Cheung, C.F.R., Cheung, C.H.A., Cheung, K.-H., Chevet, E., Chi, R.J., Chiang, A.K.S., Chiaradonna, F., Chiarelli, R., Chiariello, M., Chica, N., Chiocci, S., Chiong, M., Chiou, S.-H., Chiramel, A.I., Chiurchiù, V., Cho, D.-H., Choe, S.-K., Choi, A.M.K., Choi, M.E., Choudhury, K.R., Chow, N.S., Chu, C.T., Chua, J.P., Chua, J.J.E., Chung, H., Chung, K.P., Chung, S., Chung, S.-H., Chung, Y.-L., Cianfanelli, V., Ciechomska, I.A., Cifuentes, M., Cinque, L., Cirak, S., Cirone, M., Clague, M.J., Clarke, R., Clementi, E., Coccia, E.M., Codogno, P., Cohen, E., Cohen, M.M., Colasanti, T., Colasuonno, F., Colbert, R.A., Colell, A., Čolić, M., Coll, N.S., Collins, M.O., Colombo, M.I., Colón-Ramos, D.A., Combaret, L., Comincini, S., Cominetti, M.R., Consiglio, A., Conte, A., Conti, F., Contu, V.R., Cookson, M.R., Coombs, K.M., Coppens, I., Corasaniti, M.T., Corkery, D.P., Cordes, N., Cortese, K., Costa, M. do C., Costantino, S., Costelli, P., Coto-Montes, A., Crack, P.J., Crespo, J.L., Criollo, A., Crippa, V., Cristofani, R., Csizmadia, T., Cuadrado, A., Cui, B., Cui, J., Cui, Yixian, Cui, Yong, Culetto, E., Cumino, A.C., Cybulsky, A.V., Czaja, M.J., Czuczwar, S.J., D'Adamo, S., D'Amelio, M., D'Arcangelo, D., D'Lugos,

A.C., D'Orazi, G., da Silva, J.A., Dafsari, H.S., Dagda, R.K., Dagdas, Y., Daglia, M., Dai, X., Dai, Yun, Dai, Yuyuan, Dal Col, J., Dalhaimer, P., Dalla Valle, L., Dallenga, T., Dalmasso, G., Damme, M., Dando, I., Dantuma, N.P., Darling, A.L., Das, H., Dasarathy, S., Dasari, S.K., Dash, S., Daumke, O., Dauphinee, A.N., Davies, J.S., Dávila, V.A., Davis, R.J., Davis, T., Dayalan Naidu, S., De Amicis, F., De Bosscher, K., De Felice, F., De Franceschi, L., De Leonibus, C., de Mattos Barbosa, M.G., De Meyer, G.R.Y., De Milito, A., De Nunzio, C., De Palma, C., De Santi, M., De Virgilio, C., De Zio, D., Debnath, J., DeBosch, B.J., Decuypere, J.-P., Deehan, M.A., Deflorian, G., DeGregori, J., Dehay, B., Del Rio, G., Delaney, J.R., Delbridge, L.M.D., Delorme-Axford, E., Delpino, M.V., Demarchi, F., Dembitz, V., Demers, N.D., Deng, H., Deng, Z., Dengjel, J., Dent, P., Denton, D., DePamphilis, M.L., Der, C.J., Deretic, V., Descoteaux, A., Devis, L., Devkota, S., Devuyst, O., Dewson, G., Dharmasivam, M., Dhiman, R., di Bernardo, D., Di Cristina, M., Di Domenico, F., Di Fazio, P., Di Fonzo, A., Di Guardo, G., Di Guglielmo, G.M., Di Leo, L., Di Malta, C., Di Nardo, A., Di Rienzo, M., Di Sano, F., Diallinas, G., Diao, J., Diaz-Araya, G., Díaz-Laviada, I., Dickinson, J.M., Diederich, M., Dieudé, M., Dikic, I., Ding, S., Ding, W.-X., Dini, L., Dinić, J., Dinic, M., Dinkova-Kostova, A.T., Dionne, M.S., Distler, J.H.W., Diwan, A., Dixon, I.M.C., Djavaheri-Mergny, M., Dobrinski, I., Dobrovinskaya, O., Dobrowolski, R., Dobson, R.C.J., Đokić, J., Dokmeci Emre, S., Donadelli, M., Dong, B., Dong, X., Dong, Z., Dorn II, G.W., Dotsch, V., Dou, H., Dou, J., Dowaidar, M., Dridi, S., Drucker, L., Du, A., Du, C., Du, G., Du, H.-N., Du, L.-L., du Toit, A., Duan, S.-B., Duan, X., Duarte, S.P., Dubrovska, A., Dunlop, E.A., Dupont, N., Durán, R.V., Dwarakanath, B.S., Dyshlovoy, S.A., Ebrahimi-Fakhari, D., Eckhart, L., Edelstein, C.L., Efferth, T., Eftekharpour, E., Eichinger, L., Eid, N., Eisenberg, T., Eissa, N.T., Eissa, S., Ejarque, M., El Andaloussi, A., El-Hage, N., El-Naggar, S., Eleuteri, A.M., El-Shafey, E.S., Elgendy, M., Eliopoulos, A.G., Elizalde, M.M., Elks, P.M., Elsasser, H.-P., Elsherbiny, E.S., Emerling, B.M., Emre, N.C.T., Eng, C.H., Engedal, N., Engelbrecht, A.-M., Engelsen, A.S.T., Enserink, J.M., Escalante, R., Esclatine, A., Escobar-Henriques, M., Eskelinen, E.-L., Espert, L., Eusebio, M.-O., Fabrias, G., Fabrizi, C., Facchiano, A., Facchiano, F., Fadeel, B., Fader, C., Faesen, A.C., Fairlie, W.D., Falcó, A., Falkenburger, B.H., Fan, D., Fan, J., Fan, Y., Fang, E.F., Fang, Yanshan, Fang, Yognqi, Fanto, M., Farfel-Becker, T., Faure, M., Fazeli, G., Fedele, A.O., Feldman, A.M., Feng, D., Feng, J., Feng, L., Feng, Yibin, Feng, Yuchen, Feng, W., Fenz Araujo, T., Ferguson, T.A., Fernández, Á.F., Fernandez-Checa, J.C., Fernández-Veledo, S., Fernie, A.R., Ferrante, A.W., Ferraresi, A., Ferrari, M.F., Ferreira, J.C.B., Ferro-Novick, S., Figueras, A., Filadi, R., Filigheddu, N., Filippi-Chiela, E., Filomeni, G., Fimia, G.M., Fineschi, V., Finetti, F., Finkbeiner, S., Fisher, E.A., Fisher, P.B., Flamigni, F., Fliesler, S.J., Flo, T.H., Florance, I., Florey, O., Florio, T., Fodor, E., Follo, C., Fon, E.A., Forlino, A., Fornai, F., Fortini, P., Fracassi, A., Fraldi, A., Franco, B., Franco, R., Franconi, F., Frankel, L.B., Friedman, S.L., Fröhlich, L.F., Frühbeck, G., Fuentes, J.M., Fujiki, Y., Fujita, N., Fujiwara, Y., Fukuda, M., Fulda, S., Furic, L., Furuya, N., Fusco, C., Gack, M.U., Gaffke, L., Galadari, S., Galasso, A., Galindo, M.F., Gallolu Kankanamalage, S., Galluzzi, L., Galy, V., Gammoh, N., Gan, B., Ganley, I.G., Gao, F., Gao, H., Gao, M., Gao, P., Gao, S.-J., Gao, W., Gao, X., Garcera, A., Garcia, M.N., Garcia, V.E., García-Del Portillo, F., Garcia-Escudero, V., Garcia-Garcia, A., Garcia-Macia, M., García-Moreno, D., Garcia-Ruiz, C., García-Sanz, P., Garg, A.D., Gargini, R., Garofalo, T., Garry, R.F., Gassen, N.C., Gatica, D., Ge, L., Ge, W., Geiss-Friedlander, R., Gelfi, C., Genschik, P., Gentle, I.E., Gerbino, V., Gerhardt, C., Germain, K., Germain, M., Gewirtz, D.A., Ghasemipour Afshar, E., Ghavami, S., Ghigo, A., Ghosh, M., Giamas, G., Giampietri, C., Giatromanolaki, A., Gibson, G.E., Gibson, S.B., Ginet, V., Giniger, E., Giorgi, C., Girao, H., Girardin, S.E., Giridharan, M., Giuliano, S., Giulivi, C., Giuriato, S., Giustiniani, J., Glusckko, A., Goder, V., Goginashvili, A., Golab, J., Goldstone, D.C., Golebiewska, A., Gomes, L.R., Gomez, R., Gómez-Sánchez, R., Gomez-Puerto, M.C., Gomez-Sintes, R., Gong, Q., Goni, F.M., González-Gallego, J., Gonzalez-Hernandez, T., Gonzalez-Polo, R.A., Gonzalez-Reyes, J.A., González-Rodríguez, P., Goping, I.S., Gorbatyuk, M.S., Gorbunov, N.V., Görgülü, K., Gorojod, R.M., Gorski, S.M., Goruppi, S., Gotor, C., Gottlieb, R.A., Gozes, I., Gozuacik, D., Graef, M., Gräler, M.H., Granatiero, V., Grasso, D., Gray, J.P., Green, D.R., Greenhough, A., Gregory, S.L., Griffin, E.F., Grinstaff, M.W., Gros, F., Grose, C., Gross, A.S., Gruber, F., Grumati, P., Grune, T., Gu, X., Guan, J.-L.,

Guardia, C.M., Guda, K., Guerra, F., Guerri, C., Guha, P., Guillén, C., Gujar, S., Gukovskaya, A., Gukovsky, I., Gunst, J., Günther, A., Guntur, A.R., Guo, Chuanyong, Guo, Chun, Guo, H., Guo, L.-W., Guo, M., Gupta, P., Gupta, S.K., Gupta, S., Gupta, V.B., Gupta, V., Gustafsson, A.B., Gutterman, D.D., H.B., R., Haapasalo, A., Haber, J.E., Hać, A., Hadano, S., Hafrén, A.J., Haidar, M., Hall, B.S., Halldén, G., Hamacher-Brady, A., Hamann, A., Hamasaki, M., Han, W., Hansen, M., Hanson, P.I., Hao, Z., Harada, M., Harhaji-Trajkovic, L., Hariharan, N., Haroon, N., Harris, J., Hasegawa, T., Hasima Nagoor, N., Haspel, J.A., Haucke, V., Hawkins, W.D., Hay, B.A., Haynes, C.M., Hayrabedian, S.B., Hays, T.S., He, C., He, Q., He, R.-R., He, Y.-W., He, Y.-Y., Heakal, Y., Heberle, A.M., Hejtmancik, J.F., Helgason, G.V., Henkel, V., Herb, M., Hergovich, A., Herman-Antosiewicz, A., Hernández, A., Hernandez, C., Hernandez-Diaz, S., Hernandez-Gea, V., Herpin, A., Herreros, J., Hervás, J.H., Hesselson, D., Hetz, C., Heussler, V.T., Higuchi, Y., Hilfiker, S., Hill, J.A., Hlavacek, W.S., Ho, E.A., Ho, I.H.T., Ho, P.W.-L., Ho, S.-L., Ho, W.Y., Hobbs, G.A., Hochstrasser, M., Hoet, P.H.M., Hofius, D., Hofman, P., Höhn, A., Holmberg, C.I., Hombrebueno, J.R., Yi-Ren Hong, C.-W.H., Hooper, L.V., Hoppe, T., Horos, R., Hoshida, Y., Hsin, I.-L., Hsu, H.-Y., Hu, B., Hu, D., Hu, L.-F., Hu, M.C., Hu, R., Hu, W., Hu, Y.-C., Hu, Z.-W., Hua, F., Hua, J., Hua, Y., Huan, C., Huang, Canhua, Huang, Chuanshu, Huang, Chuanxin, Huang, Chunling, Huang, H., Huang, K., Huang, M.L.H., Huang, R., Huang, S., Huang, T., Huang, X., Huang, Y.J., Huber, T.B., Hubert, V., Hubner, C.A., Hughes, S.M., Hughes, W.E., Humbert, M., Hummer, G., Hurley, J.H., Hussain, Sabah, Hussain, Salik, Hussey, P.J., Hutabarat, M., Hwang, H.-Y., Hwang, S., Ieni, A., Ikeda, F., Imagawa, Y., Imai, Y., Imbriano, C., Imoto, M., Inman, D.M., Inoki, K., Iovanna, J., Iozzo, R.V., Ippolito, G., Irazoqui, J.E., Iribarren, P., Ishaq, M., Ishikawa, M., Ishimwe, N., Isidoro, C., Ismail, N., Issazadeh-Navikas, S., Itakura, E., Ito, D., Ivankovic, D., Ivanova, S., Iyer, A.K.V., Izquierdo, J.M., Izumi, M., Jäättelä, M., Jabir, M.S., Jackson, W.T., Jacobo-Herrera, N., Jacomin, A.-C., Jacquin, E., Jadiya, P., Jaeschke, H., Jagannath, C., Jakobi, A.J., Jakobsson, J., Janji, B., Jansen-Dürr, P., Jansson, P.J., Jantsch, J., Januszewski, S., Jasse, A., Jean, S., Jeltsch-David, H., Jendelova, P., Jenny, A., Jensen, T.E., Jessen, N., Jewell, J.L., Ji, J., Jia, L., Jia, R., Jiang, L., Jiang, Q., Jiang, R., Jiang, T., Jiang, X., Jiang, Y., Jimenez-Sanchez, M., Jin, E.-J., Jin, F., Jin, H., Jin, Li, Jin, Luqi, Jin, M., Jin, S., Jo, E.-K., Joffre, C., Johansen, T., Johnson, G.V.W., Johnston, S.A., Jokitalo, E., Jolly, M.K., Joosten, L.A.B., Jordan, J., Joseph, B., Ju, D., Ju, J.-S., Ju, J., Juárez, E., Judith, D., Juhász, G., Jun, Y., Jung, C.H., Jung, S.-C., Jung, Y.K., Jungbluth, H., Jungverdorben, J., Just, S., Kaarniranta, K., Kaasik, A., Kabuta, T., Kaganovich, D., Kahana, A., Kain, R., Kajimura, S., Kalamvoki, M., Kalia, M., Kalinowski, D.S., Kaludercic, N., Kalvari, I., Kaminska, J., Kaminsky, V.O., Kanamori, H., Kanasaki, K., Kang, C., Kang, R., Kang, S.S., Kaniyappan, S., Kanki, T., Kanneganti, T.-D., Kanthasamy, A.G., Kanthasamy, A., Kantorow, M., Kapuy, O., Karamouzis, M.V., Karim, Md.R., Karmakar, P., Katare, R.G., Kato, M., Kaufmann, S.H.E., Kauppinen, A., Kaushal, G.P., Kaushik, S., Kawasaki, K., Kazan, K., Ke, P.-Y., Keating, D.J., Keber, U., Kehrl, J.H., Keller, K.E., Keller, C.W., Kemper, J.K., Kenific, C.M., Kepp, O., Kermorgant, S., Kern, A., Ketteler, R., Keulers, T.G., Khalfin, B., Khalil, H., Khambu, B., Khan, S.Y., Khandelwal, V.K.M., Khandia, R., Kho, W., Khobreakar, N.V., Khuansuwan, S., Khundadze, M., Killackey, S.A., Kim, D., Kim, D.R., Kim, D.-H., Kim, D.-E., Kim, E.Y., Kim, E.-K., Kim, H.-R., Kim, H.-S., Hyung-Ryong Kim, Kim, Jeong Hun, Kim, J.K., Kim, J.-H., Kim, J., Kim, Ju Hwan, Kim, K.I., Kim, P.K., Kim, S.-J., Kimball, S.R., Kimchi, A., Kimmelman, A.C., Kimura, T., King, M.A., Kinghorn, K.J., Kinsey, C.G., Kirkin, V., Kirshenbaum, L.A., Kiselev, S.L., Kishi, S., Kitamoto, K., Kitaoka, Y., Kitazato, K., Kitsis, R.N., Kittler, J.T., Kjaerulff, O., Klein, P.S., Klopstock, T., Klucken, J., Knævelsrud, H., Knorr, R.L., Ko, B.C.B., Ko, F., Ko, J.-L., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Koch, I., Koch, J.C., Koenig, U., Kögel, D., Koh, Y.H., Koike, M., Kohlwein, S.D., Kocaturk, N.M., Komatsu, M., König, J., Kono, T., Kopp, B.T., Korcsmaros, T., Korkmaz, G., Korolchuk, V.I., Korsnes, M.S., Koskela, A., Kota, J., Kotake, Y., Kotler, M.L., Kou, Y., Koukourakis, M.I., Koustas, E., Kovacs, A.L., Kovács, T., Koya, D., Kozako, T., Kraft, C., Krainc, D., Krämer, H., Krasnodembskaya, A.D., Kretz-Remy, C., Kroemer, G., Ktistakis, N.T., Kuchitsu, K., Kuenen, S., Kuerschner, L., Kukar, T., Kumar, Ajay, Kumar, Ashok, Kumar, Deepak, Kumar, Dhiraj, Kumar, S., Kume, S., Kumsta, C., Kundu, C.N., Kundu, M., Kunnumakkara, A.B., Kurgan, L.,

Kutateladze, T.G., Kutlu, O., Kwak, S., Kwon, H.J., Kwon, T.K., Kwon, Y.T., Kyrmizi, I., La Spada, A., Labonté, P., Ladoire, S., Laface, I., Lafont, F., Lagace, D.C., Lahiri, V., Lai, Z., Laird, A.S., Lakkaraju, A., Lamark, T., Lan, S.-H., Landajuella, A., Lane, D.J.R., Lane, J.D., Lang, C.H., Lange, C., Langel, Ü., Langer, R., Lapaquette, P., Laporte, J., LaRusso, N.F., Lastres-Becker, I., Lau, W.C.Y., Laurie, G.W., Lavandero, S., Law, B.Y.K., Law, H.K., Layfield, R., Le, W., Le Stunff, H., Leary, A.Y., Lebrun, J.-J., Leck, L.Y.W., Leduc-Gaudet, J.-P., Lee, C., Lee, C.-P., Lee, D.-H., Lee, E.B., Lee, E.F., Lee, G.M., Lee, H.-J., Lee, H.K., Lee, J.M., Lee, J.S., Lee, J.-A., Lee, J.-Y., Lee, J.H., Lee, M., Lee, M.G., Lee, M.J., Lee, M.-S., Lee, Sang Yoon, Lee, S.-J., Lee, Stella Y., Lee, S.B., Lee, W.H., Lee, Y.-R., Lee, Yong-ho, Lee, Youngil, Lefebvre, C., Legouis, R., Lei, Y.L., Lei, Y., Leikin, S., Leitinger, G., Lemus, L., Leng, S., Lenoir, O., Lenz, G., Lenz, H.J., Lenzi, P., León, Y., Leopoldino, A.M., Leschczyk, C., Leskelä, S., Letellier, E., Leung, C.-T., Leung, P.S., Leventhal, J.S., Levine, B., Lewis, P.A., Ley, K., Li, B., Li, D.-Q., Li, Jianming, Li, Jing, Li, Jiong, Li, K., Li, L., Li, Mei, Li, Min, Li, Min, Li, Ming, Li, Mingchuan, Li, P.-L., Li, M.-Q., Li, Q., Li, S., Li, T., Li, Wei, Li, Wenming, Li, X., Li, Y.-P., Li, Y., Li, Zhiqiang, Li, Zhiyong, Li, Zhiyuan, Lian, J., Liang, C., Liang, Q., Liang, W., Liang, Yongheng, Liang, YongTian, Liao, G., Liao, L., Liao, M., Liao, Y.-F., Librizzi, M., Lie, P.P.Y., Lilly, M.A., Lim, H.J., Lima, T.R.R., Limana, F., Lin, C., Lin, C.-W., Lin, D.-S., Lin, F.-C., Lin, J.D., Lin, K.M., Lin, K.-H., Lin, L.-T., Lin, P.-H., Lin, Q., Lin, S., Lin, S.-J., Lin, W., Lin, X., Lin, Y.-X., Lin, Y.-S., Linden, R., Lindner, P., Ling, S.-C., Lingor, P., Linnemann, A.K., Liou, Y.-C., Lipinski, M.M., Lipovšek, S., Lira, V.A., Lisiak, N., Liton, P.B., Liu, C., Liu, C.-H., Liu, C.-F., Liu, C.H., Liu, F., Liu, Hao, Liu, H.-S., Liu, Hua-feng, Liu, Huifang, Liu, Jia, Liu, Jing, Liu, Julia, Liu, Leyuan, Liu, Longhua, Liu, M., Liu, Q., Liu, Wei, Liu, Wende, Liu, X.-H., Liu, Xiaodong, Liu, Xingguo, Liu, Xu, Liu, Xuedong, Liu, Yanfen, Liu, Yang, Liu, Yang, Liu, Yueyang, Liu, Yule, Livingston, J.A., Lizard, G., Lizcano, J.M., Ljubojevic-Holzer, S., LLeonart, M.E., Llobet-Navàs, D., Llorente, A., Lo, C.H., Lobato-Márquez, D., Long, Q., Long, Y.C., Loos, B., Loos, J.A., López, M.G., López-Doménech, G., López-Guerrero, J.A., López-Jiménez, A.T., López-Pérez, Ó., López-Valero, I., Lorenowicz, M.J., Lorente, M., Lorincz, P., Lossi, L., Lotersztajn, S., Lovat, P.E., Lovell, J.F., Lovy, A., Lów, P., Lu, G., Lu, H., Lu, J.-H., Lu, J.-J., Lu, M., Lu, S., Luciani, A., Lucocq, J.M., Ludovico, P., Luftig, M.A., Luhr, M., Luis-Ravelo, D., Lum, J.J., Luna-Dulcey, L., Lund, A.H., Lund, V.K., Lünemann, J.D., Lüningschrör, P., Luo, H., Luo, R., Luo, S., Luo, Z., Luparello, C., Lüscher, B., Luu, L., Lyakhovich, A., Lyamzaev, K.G., Lystad, A.H., Lytvynchuk, L., Ma, A.C., Ma, C., Ma, M., Ma, N.-F., Ma, Q.-H., Ma, X., Ma, Y., Ma, Z., MacDougald, O.A., Macian, F., MacIntosh, G.C., MacKeigan, J.P., Macleod, K.F., Maday, S., Madeo, F., Madesh, M., Madl, T., Madrigal-Matute, J., Maeda, A., Maejima, Y., Magarinos, M., Mahavadi, P., Maiani, E., Maiese, K., Maiti, P., Maiuri, M.C., Majello, B., Major, M.B., Makareeva, E., Malik, F., Mallilankaraman, K., Malorni, W., Maloyan, A., Mammadova, N., Man, G.C.W., Manai, F., Mancias, J.D., Mandelkow, E.-M., Mandell, M.A., Manfredi, A.A., Manjili, M.H., Manjithaya, R., Manque, P., Manshian, B.B., Manzano, R., Manzoni, C., Mao, K., Marchese, C., Marchetti, S., Marconi, A.M., Marcucci, F., Mardente, S., Mareninova, O.A., Margeta, M., Mari, M., Marinelli, S., Marinelli, O., Mariño, G., Mariotto, S., Marshall, R.S., Marten, M.R., Martens, S., Martin, A.P.J., Martin, K.R., Martin, Sara, Martin, Shaun, Martín-Segura, A., Martín-Acebes, M.A., Martin-Burriel, I., Martin-Rincon, M., Martin-Sanz, P., Martina, J.A., Martinet, W., Martinez, Aitor, Martinez, Ana, Martinez, J., Martinez Velazquez, M., Martinez-Lopez, N., Martinez-Vicente, M., Martins, D.O., Martins, J.O., Martins, W.K., Martins-Marques, T., Marzetti, E., Masaldan, S., Masclaux-Daubresse, C., Mashek, D.G., Massa, V., Massieu, L., Masson, G.R., Masuelli, L., Masyuk, A.I., Masyuk, T.V., Matarrese, P., Matheu, A., Matoba, S., Matsuzaki, S., Mattar, P., Matte, A., Mattoscio, D., Mauriz, J.L., Mauthe, M., Mauvezin, C., Maverakis, E., Maycotte, P., Mayer, J., Mazzoccoli, G., Mazzoni, C., Mazzulli, J.R., McCarty, N., McDonald, C., McGill, M.R., McKenna, S.L., McLaughlin, B., McLoughlin, F., McNiven, M.A., McWilliams, T.G., Mechta-Grigoriou, F., Medeiros, T.C., Medina, D.L., Megeney, L.A., Megyeri, K., Mehrpour, M., Mehta, J.L., Meijer, A.J., Meijer, A.H., Mejlvang, J., Meléndez, A., Melk, A., Memisoglu, G., Mendes, A.F., Meng, D., Meng, F., Meng, T., Menna-Barreto, R., Menon, M.B., Mercer, C., Mercier, A.E., Mergny, J.-L., Merighi, A., Merkle, S.D., Merla, G., Meske, V., Mestre, A.C., Metur, S.P., Meyer, C., Meyer, H., Mi, W., Miolet-Perez, J., Miao,

J., Micale, L., Miki, Y., Milan, E., Milczarek, M., Miller, D.L., Miller, S.I., Miller, S., Millward, S.W., Milosevic, I., Minina, E.A., Mirzaei, H., Mirzaei, H.R., Mirzaei, M., Mishra, A., Mishra, N., Mishra, P.K., Misirkic Marjanovic, M., Misasi, R., Misra, A., Misso, G., Mitchell, C., Mitou, G., Miura, T., Miyamoto, S., Miyazaki, Makoto, Miyazaki, Mitsunori, Miyazaki, T., Miyazawa, K., Mizushima, N., Mogensen, T.H., Mograbi, B., Mohammadinejad, R., Mohamad, Y., Mohanty, A., Mohapatra, S., Möhlmann, T., Mohammed, A., Moles, A., Moley, K.H., Molinari, M., Mollace, V., Møller, A.B., Mollereau, B., Mollinedo, F., Montagna, C., Monteiro, M.J., Montella, A., Montes, L.R., Montico, B., Mony, V.K., Monzio Compagnoni, G., Moore, M.N., Moosavi, M.A., Mora, A.L., Mora, M., Morales-Alamo, D., Moratalla, R., Moreira, P.I., Morelli, E., Moreno, S., Moreno-Blas, D., Moresi, V., Morga, B., Morgan, A.H., Morin, F., Morishita, H., Moritz, O.L., Moriyama, M., Moriyasu, Y., Morleo, M., Morselli, E., Moruno-Manchon, J.F., Moscat, J., Mostowy, S., Motori, E., Moura, A.F., Moustaid-Moussa, N., Mrakovcic, M., Muciño-Hernández, G., Mukherjee, A., Mukhopadhyay, S., Mulcahy Levy, J.M., Mulero, V., Muller, S., Münch, C., Munjal, A., Munoz-Canoves, P., Muñoz-Galdeano, T., Münz, C., Murakawa, T., Muratori, C., Murphy, B.M., Murphy, J.P., Murthy, A., Myöhänen, T.T., Mysorekar, I.U., Mytych, J., Nabavi, S.M., Nabissi, M., Nagy, P., Nah, J., Nahimana, A., Nakagawa, I., Nakamura, K., Nakatogawa, H., Nandi, S.S., Nanjundan, M., Nanni, M., Napolitano, G., Nardacci, R., Narita, M., Nassif, M., Nathan, I., Natsumeda, M., Naude, R.J., Naumann, C., Naveiras, O., Navid, F., Nawrocki, S.T., Nazarko, T.Y., Nazio, F., Negoita, F., Neill, T., Neisch, A.L., Neri, L.M., Netea, M.G., Neubert, P., Neufeld, T.P., Neumann, D., Neutzner, A., Newton, P.T., Ney, P.A., Nezis, I.P., Ng, C.C.W., Ng, T.B., Nguyen, H.T.T., Nguyen, L.T., Ni, H.-M., Ní Cheallaigh, C., Ni, Z., Nicolao, M.C., Nicoli, F., Nieto-Diaz, M., Nilsson, P., Ning, S., Niranjana, R., Nishimune, H., Niso-Santano, M., Nixon, R.A., Nobili, A., Nobrega, C., Noda, T., Nogueira-Recalde, U., Nolan, T.M., Nombela, I., Novak, I., Novoa, B., Nozawa, T., Nukina, N., Nussbaum-Krammer, C., Nylandsted, J., O'Donovan, T.R., O'Leary, S.M., O'Rourke, E.J., O'Sullivan, M.P., O'Sullivan, T.E., Oddo, S., Oehme, I., Ogawa, M., Ogier-Denis, E., Ogmundsdottir, M.H., Ogretmen, B., Oh, G.T., Oh, S.-H., Oh, Y.J., Ohama, T., Ohashi, Y., Ohmuraya, M., Oikonomou, V., Ojha, R., Okamoto, K., Okazawa, H., Oku, M., Oliván, S., Oliveira, J.M.A., Ollmann, M., Olzmann, J.A., Omari, S., Omary, M.B., Önal, G., Ondrej, M., Ong, S.-B., Ong, S.-G., Onnis, A., Orellana, J.A., Orellana-Muñoz, S., Ortega-Villaizan, M.D.M., Ortiz-Gonzalez, X.R., Ortona, E., Osiewacz, H.D., Osman, A.-H.K., Osta, R., Otegui, M.S., Otsu, K., Ott, C., Ottobri, L., Ou, J.J., Outeiro, T.F., Oynebraten, I., Ozturk, M., Pagès, G., Pahari, S., Pajares, M., Pajvani, U.B., Pal, R., Paladino, S., Pallet, N., Palmieri, M., Palmisano, G., Palumbo, C., Pampaloni, F., Pan, L., Pan, Q., Pan, W., Pan, X., Panasyuk, G., Pandey, R., Pandey, U.B., Pandya, V., Paneni, F., Pang, S.Y., Panzarini, E., Papademetrio, D.L., Papaleo, E., Papinski, D., Papp, D., Park, E.C., Park, H.T., Park, J.-M., Park, J.-I., Park, J.T., Park, J., Park, S.C., Park, S.-Y., Parola, A.H., Parys, J.B., Pasquier, A., Pasquier, B., Passos, J.F., Pastore, N., Patel, H.H., Patschan, D., Patingre, S., Pedraza-Alva, G., Pedraza-Chaverri, J., Pedrozo, Z., Pei, G., Pei, J., Peled-Zehavi, H., Pellegrini, J.M., Pelletier, J., Peñalva, M.A., Peng, D., Peng, Y., Penna, F., Pennuto, M., Pentimalli, F., Pereira, C.M., Pereira, G.J.S., Pereira, L.C., Pereira de Almeida, L., Perera, N.D., Pérez-Lara, Á., Perez-Oliva, A.B., Pérez-Pérez, M.E., Periyasamy, P., Perl, A., Perrotta, C., Perrotta, I., Pestell, R.G., Petersen, M., Petrache, I., Petrovski, G., Pfirrmann, T., Pfister, A.S., Philips, J.A., Pi, H., Picca, A., Pickrell, A.M., Picot, S., Pierantoni, G.M., Pierdominici, M., Pierre, P., Pierrefite-Carle, V., Pierzynowska, K., Pietrocola, F., Pietruczuk, M., Pignata, C., Pimentel-Muiños, F.X., Pinar, M., Pinheiro, R.O., Pinkas-Kramarski, R., Pinton, P., Piracs, K., Piya, S., Pizzo, P., Plantinga, T.S., Platta, H.W., Plaza-Zabala, A., Plomann, M., Plotnikov, E.Y., Plun-Favreau, H., Pluta, R., Pocock, R., Pöggeler, S., Pohl, C., Poirot, M., Poletti, A., Ponpuak, M., Popelka, H., Popova, B., Porta, H., Porte Alcon, S., Portilla-Fernandez, E., Post, M., Potts, M.B., Poulton, J., Powers, T., Prahlad, V., Prajsnar, T.K., Praticò, D., Prencipe, R., Priault, M., Proikas-Cezanne, T., Promponas, V.J., Proud, C.G., Puertollano, R., Puglielli, L., Pulinilkunnil, T., Puri, D., Puri, R., Puyal, J., Qi, X., Qi, Y., Qian, W., Qiang, L., Qiu, Y., Quadrilatero, J., Quarleri, J., Raben, N., Rabinowich, H., Ragona, D., Ragusa, M.J., Rahimi, N., Rahmati, M., Raia, V., Raimundo, N., Rajasekaran, N.-S., Ramachandra Rao, S., Rami, A., Ramírez-Pardo, I., Ramsden, D.B., Randow,

F., Rangarajan, P.N., Ranieri, D., Rao, H., Rao, L., Rao, R., Rathore, S., Ratnayaka, J.A., Ratovitski, E.A., Ravanan, P., Ravegnini, G., Ray, S.K., Razani, B., Rebecca, V., Reggiori, F., Régnier-Vigouroux, A., Reichert, A.S., Reigada, D., Reiling, J.H., Rein, T., Reipert, S., Rekha, R.S., Ren, H., Ren, J., Ren, W., Renault, T., Renga, G., Reue, K., Rewitz, K., Ribeiro de Andrade Ramos, B., Riazuddin, S.A., Ribeiro-Rodrigues, T.M., Ricci, J.-E., Ricci, R., Riccio, V., Richardson, D.R., Rikihisa, Y., Risbud, M.V., Risueño, R.M., Ritis, K., Rizza, S., Rizzuto, R., Roberts, H.C., Roberts, L.D., Robinson, K.J., Roccheri, M.C., Rocchi, S., Rodney, G.G., Rodrigues, T., Rodrigues Silva, V.R., Rodriguez, A., Rodriguez-Barrueco, R., Rodriguez-Henche, N., Rodriguez-Rocha, H., Roelofs, J., Rogers, R.S., Rogov, V.V., Rojo, A.I., Rolka, K., Romanello, V., Romani, L., Romano, A., Romano, P.S., Romeo-Guitart, D., Romero, L.C., Romero, M., Roney, J.C., Rongo, C., Roperto, S., Rosenfeldt, M.T., Rosenstiel, P., Rosenwald, A.G., Roth, K.A., Roth, L., Roth, S., Rouschop, K.M.A., Rousset, B.D., Roux, S., Rovere-Querini, P., Roy, A., Rozieres, A., Ruano, D., Rubinsztein, D.C., Rubtsova, M.P., Ruckdeschel, K., Ruckenstuhl, C., Rudolf, E., Rudolf, R., Ruggieri, A., Ruparelia, A.A., Rusmini, P., Russell, R.R., Russo, G.L., Russo, M., Russo, R., Ryabaya, O.O., Ryan, K.M., Ryu, K.-Y., Sabater-Arcis, M., Sachdev, U., Sacher, M., Sachse, C., Sadhu, A., Sadoshima, J., Safren, N., Saftig, P., Sagona, A.P., Sahay, G., Sahebkar, A., Sahin, M., Sahin, O., Sahni, S., Saito, N., Saito, S., Saito, T., Sakai, R., Sakai, Y., Sakamaki, J.-I., Saksela, K., Salazar, G., Salazar-Degracia, A., Salekdeh, G.H., Saluja, A.K., Sampaio-Marques, B., Sanchez, M.C., Sanchez-Alcazar, J.A., Sanchez-Vera, V., Sancho-Shimizu, V., Sanderson, J.T., Sandri, M., Santaguida, S., Santambrogio, L., Santana, M.M., Santoni, G., Sanz, A., Sanz, P., Saran, S., Sardiello, M., Sargeant, T.J., Sarin, A., Sarkar, C., Sarkar, Sovan, Sarrias, M.-R., Sarkar, Surajit, Sarmah, D.T., Sarparanta, J., Sathyanarayan, A., Sathyanarayanan, R., Scaglione, K.M., Scatozza, F., Schaefer, L., Schafer, Z.T., Schaible, U.E., Schapira, A.H.V., Scharl, M., Schatzl, H.M., Schein, C.H., Scheper, W., Scheuring, D., Schiaffino, M.V., Schiappacassi, M., Schindl, R., Schlattner, U., Schmidt, O., Schmitt, R., Schmidt, S.D., Schmitz, I., Schmukler, E., Schneider, A., Schneider, B.E., Schober, R., Schoijet, A.C., Schott, M.B., Schramm, M., Schröder, B., Schuh, K., Schüller, C., Schulze, R.J., Schürmanns, L., Schwamborn, J.C., Schwarten, M., Scialo, F., Sciarretta, S., Scott, M.J., Scotto, K.W., Scovassi, A.I., Scrima, A., Scrivo, A., Sebastian, D., Sebti, S., Sedej, S., Segatori, L., Segev, N., Seglen, P.O., Seiliez, I., Seki, E., Selleck, S.B., Sellke, F.W., Selsby, J.T., Sendtner, M., Senturk, S., Seranova, E., Sergi, C., Serra-Moreno, R., Sesaki, H., Settembre, C., Setty, S.R.G., Sgarbi, G., Sha, O., Shacka, J.J., Shah, J.A., Shang, D., Shao, C., Shao, F., Sharbati, S., Sharkey, L.M., Sharma, D., Sharma, G., Sharma, K., Sharma, P., Sharma, S., Shen, H.-M., Shen, H., Shen, J., Shen, M., Shen, W., Shen, Z., Sheng, R., Sheng, Z., Sheng, Z.-H., Shi, J., Shi, X., Shi, Y.-H., Shiba-Fukushima, K., Shieh, J.-J., Shimada, Y., Shimizu, S., Shimosawa, M., Shintani, T., Shoemaker, C.J., Shojaei, S., Shoji, I., Shrivage, B.V., Shridhar, V., Shu, C.-W., Shu, H.-B., Shui, K., Shukla, A.K., Shutt, T.E., Sica, V., Siddiqui, A., Sierra, A., Sierra-Torre, V., Signorelli, S., Sil, P., Silva, B.J. de A., Silva, J.D., Silva-Pavez, E., Silvente-Poirot, S., Simmonds, R.E., Simon, A.K., Simon, H.-U., Simons, M., Singh, A., Singh, L.P., Singh, R., Singh, S.V., Singh, S.K., Singh, S.B., Singh, S., Singh, S.P., Sinha, D., Sinha, R.A., Sinha, S., Sirko, A., Sirohi, K., Sivridis, E.L., Skendros, P., Skirycz, A., Slaninová, I., Smaili, S.S., Smertenko, A., Smith, M.D., Soenen, S.J., Sohn, E.J., Sok, S.P.M., Solaini, G., Soldati, T., Soleimanpour, S.A., Soler, R.M., Solovchenko, A., Somarelli, J.A., Sonawane, A., Song, F., Song, H.K., Song, J.-X., Song, K., Song, Z., Soria, L.R., Sorice, M., Soukas, A.A., Soukup, S.-F., Sousa, D., Sousa, N., Spagnuolo, P.A., Spector, S.A., Srinivas Bharath, M.M., St. Clair, D., Stagni, V., Staiano, L., Stalneck, C.A., Stankov, M.V., Stathopoulos, P.B., Stefan, K., Stefan, S.M., Stefanis, L., Steffan, J.S., Steinkasserer, A., Stenmark, H., Sternecker, J., Stevens, C., Stoka, V., Storch, S., Stork, B., Strappazon, F., Strohecker, A.M., Stupack, D.G., Su, H., Su, L.-Y., Su, L., Suarez-Fontes, A.M., Subauste, C.S., Subbian, S., Subirada, P.V., Sudhandiran, G., Sue, C.M., Sui, X., Summers, C., Sun, G., Sun, J., Sun, K., Sun, M., Sun, Q., Sun, Y., Sun, Z., Sunahara, K.K.S., Sundberg, E., Susztak, K., Sutovsky, P., Suzuki, H., Sweeney, G., Symons, J.D., Sze, S.C.W., Szewczyk, N.J., Tabęcka-Łonczynska, A., Tabolacci, C., Tacke, F., Taegtmeier, H., Tafani, M., Tagaya, M., Tai, H., Tait, S.W.G., Takahashi, Y., Takats, S., Talwar, P., Tam, C., Tam, S.Y., Tampellini, D., Tamura, A., Tan, C.T., Tan,

E.-K., Tan, Y.-Q., Tanaka, Masaki, Tanaka, Motomasa, Tang, D., Tang, J., Tang, T.-S., Tanida, I., Tao, Z., Taouis, M., Tatenhorst, L., Tavernarakis, N., Taylor, A., Taylor, G.A., Taylor, J.M., Tchétina, E., Tee, A.R., Tegeder, I., Teis, D., Teixeira, N., Teixeira-Clerc, F., Tekirdag, K.A., Tencomnao, T., Tenreiro, S., Tepikin, A.V., Testillano, P.S., Tettamanti, G., Tharaux, P.-L., Thedieck, K., Thekkinghat, A.A., Thellung, S., Thinwa, J.W., Thirumalaikumar, V.P., Thomas, S.M., Thomes, P.G., Thorburn, A., Thukral, L., Thum, T., Thumm, M., Tian, L., Tichy, A., Till, A., Timmerman, V., Titorenko, V.I., Todi, S.V., Todorova, K., Toivonen, J.M., Tomaipitınca, L., Tomar, D., Tomas-Zapico, C., Tomić, S., Tong, B.C.-K., Tong, C., Tong, X., Tooze, S.A., Torgersen, M.L., Torii, S., Torres-López, L., Torriglia, A., Towers, C.G., Towns, R., Toyokuni, S., Trajkovic, V., Tramontano, D., Tran, Q.-G., Travassos, L.H., Trelford, C.B., Tremel, S., Trougakos, I.P., Tsao, B.P., Tschan, M.P., Tse, H.-F., Tse, T.F., Tsugawa, H., Tsvetkov, A.S., Tumbarello, D.A., Tumtas, Y., Tuñón, M.J., Turcotte, S., Turk, B., Turk, V., Turner, B.J., Tuxworth, R.I., Tyler, J.K., Tyutereva, E.V., Uchiyama, Y., Ugun-Klusek, A., Uhlig, H.H., Ułamek-Kozioł, M., Ulasov, I.V., Umekawa, M., Ungermann, C., Unno, R., Urbe, S., Uribe-Carretero, E., Üstün, S., Uversky, V.N., Vaccari, T., Vaccaro, M.I., Vahsen, B.F., Vakifahmetoglu-Norberg, H., Valdor, R., Valente, M.J., Valko, A., Vallee, R.B., Valverde, A.M., Van den Berghe, G., van der Veen, S., Van Kaer, L., van Loosdregt, J., van Wijk, S.J.L., Vandenbergh, W., Vanhorebeek, I., Vannier-Santos, M.A., Vannini, N., Vanrell, M.C., Vantaggiato, C., Varano, G., Varela-Nieto, I., Varga, M., Vasconcelos, M.H., Vats, S., Vavvas, D.G., Vega-Naredo, I., Vega-Rubinde-Celis, S., Velasco, G., Velázquez, A.P., Vellai, T., Vellenga, E., Velotti, F., Verdier, M., Verginis, P., Vergne, I., Verkade, P., Verma, M., Verstrecken, P., Vervliet, T., Vervoorts, J., Vessoni, A.T., Victor, V.M., Vidal, M., Vidoni, C., Vieira, O.V., Vierstra, R.D., Viganó, S., Vihinen, H., Vijayan, V., Vila, M., Vilar, M., Villalba, J.M., Villalobo, A., Villarejo-Zori, B., Villarroya, F., Villarroya, J., Vincent, O., Vindis, C., Viret, C., Viscomi, M.T., Visnjic, D., Vitale, I., Vocadlo, D.J., Voitsekhovskaja, O.V., Volonté, C., Volta, M., Vomero, M., Von Haefen, C., Vooijs, M.A., Voos, W., Vucicevic, L., Wade-Martins, R., Waguri, S., Waite, K.A., Wakatsuki, S., Walker, D.W., Walker, M.J., Walker, S.A., Walter, J., Wandosell, F.G., Wang, B., Wang, Chao-Yung, Wang, Chen, Wang, Chenran, Wang, Chenwei, Wang, Cun-Yu, Wang, D., Wang, Fangyang, Wang, Feng, Wang, Fengming, Wang, G., Wang, Han, Wang, Hao, Wang, Hexiang, Wang, H.-G., Wang, Jianrong, Wang, Jigang, Wang, Jiou, Wang, Jundong, Wang, K., Wang, Lianrong, Wang, Liming, Wang, M.H., Wang, M., Wang, N., Wang, Pengwei, Wang, Peipei, Wang, Ping, Wang, Ping, Wang, Q.J., Wang, Q., Wang, Q.K., Wang, Q.A., Wang, W.-T., Wang, W., Wang, Xinnan, Wang, Xuejun, Wang, Yan, Wang, Yanchang, Wang, Yanzhuang, Wang, Y.-Y., Wang, Yihua, Wang, Yipeng, Wang, Yu, Wang, Yuqi, Wang, Zhe, Wang, Zhenyu, Wang, Zhouguang, Warnes, G., Warnsmann, V., Watada, H., Watanabe, E., Watchon, M., Wawrzyńska, A., Weaver, T.E., Wegrzyn, G., Wehman, A.M., Wei, H., Wei, L., Wei, T., Wei, Y., Weiergräber, O.H., Weihl, C.C., Weindl, G., Weiskirchen, R., Wells, A., Wen, R.H., Wen, X., Werner, A., Weykopf, B., Wheatley, S.P., Whitton, J.L., Whitworth, A.J., Wiktorska, K., Wildenberg, M.E., Wileman, T., Wilkinson, S., Willbold, D., Williams, B., Williams, R.S.B., Williams, R.L., Williamson, P.R., Wilson, R.A., Winner, B., Winsor, N.J., Witkin, S.S., Wodrich, H., Woehlbier, U., Wollert, T., Wong, E., Wong, J.H., Wong, R.W., Wong, V.K.W., Wong, W.W.-L., Wu, A.-G., Wu, C., Wu, Jian, Wu, Junfang, Wu, K.K., Wu, M., Wu, Shan-Ying, Wu, Shengzhou, Wu, Shu-Yan, Wu, Shufang, Wu, W.K.K., Wu, Xiaohong, Wu, Xiaoqing, Wu, Y.-W., Wu, Y., Xavier, R.J., Xia, H., Xia, L., Xia, Z., Xiang, G., Xiang, J., Xiang, M., Xiang, W., Xiao, B., Xiao, G., Xiao, Hengyi, Xiao, Hong-tao, Xiao, J., Xiao, L., Xiao, S., Xiao, Y., Xie, B., Xie, C.-M., Xie, M., Xie, Y., Xie, Zhiping, Xie, Zhonglin, Xilouri, M., Xu, C., Xu, E., Xu, H., Xu, Jing, Xu, JinRong, Xu, L., Xu, W.W., Xu, X., Xue, Y., Yakhine-Diop, S.M.S., Yamaguchi, M., Yamaguchi, O., Yamamoto, A., Yamashina, S., Yan, S., Yan, S.-J., Yan, Z., Yanagi, Y., Yang, C., Yang, D.-S., Yang, Huan, Yang, H.-T., Yang, Hui, Yang, J.-M., Yang, Jing, Yang, Jingyu, Yang, Ling, Yang, Liu, Yang, M., Yang, P.-M., Yang, Q., Yang, Seungwon, Yang, Shu, Yang, S.-F., Yang, W., Yang, W.Y., Yang, Xiaoyong, Yang, Xuesong, Yang, Yi, Yang, Ying, Yao, H., Yao, S., Yao, X., Yao, Y.-G., Yao, Y.-M., Yasui, T., Yazdankhah, M., Yen, P.M., Yi, C., Yin, X.-M., Yin, Y., Yin, Zhangyuan, Yin, Ziyi, Ying, M., Ying, Z., Yip, C.K., Yiu, S.P.T., Yoo, Y.H., Yoshida, K., Yoshii, S.R., Yoshimori, T., Yousefi, B., Yu,

B., Yu, H., Yu, J., Yu, J., Yu, L., Yu, M.-L., Yu, S.-W., Yu, V.C., Yu, W.H., Yu, Zhengping, Yu, Zhou, Yuan, J., Yuan, L.-Q., Yuan, S., Yuan, S.-S.F., Yuan, Y., Yuan, Z., Yue, J., Yue, Z., Yun, J., Yung, R.L., Zacks, D.N., Zaffagnini, G., Zambelli, V.O., Zanella, I., Zang, Q.S., Zanivan, S., Zappavigna, S., Zaragoza, P., Zarbalis, K.S., Zarebkohan, A., Zarrouk, A., Zeitlin, S.O., Zeng, Jialiu, Zeng, Ju-deng, Žerovnik, E., Zhan, L., Zhang, B., Zhang, D.D., Zhang, Hanlin, Zhang, Hong, Zhang, Hong, Zhang, Honghe, Zhang, Huafeng, Zhang, Huaye, Zhang, Hui, Zhang, H.-L., Zhang, Jianbin, Zhang, Jianhua, Zhang, J.-P., Zhang, K.Y.B., Zhang, L.W., Zhang, Lin, Zhang, Lisheng, Zhang, Lu, Zhang, Luoying, Zhang, M., Zhang, P., Zhang, S., Zhang, W., Zhang, Xiangnan, Zhang, X.-W., Zhang, Xiaolei, Zhang, Xiaoyan, Zhang, Xin, Zhang, Xinxin, Zhang, X.D., Zhang, Yang, Zhang, Yanjin, Zhang, Yi, Zhang, Y.-D., Zhang, Yingmei, Zhang, Y.-Y., Zhang, Yuchen, Zhang, Zhe, Zhang, Zhengguang, Zhang, Zhibing, Zhang, Zhihai, Zhang, Zhiyong, Zhang, Zili, Zhao, H., Zhao, L., Zhao, S., Zhao, T., Zhao, X.-F., Zhao, Ying, Zhao, Yongchao, Zhao, Yongliang, Zhao, Yuting, Zheng, G., Zheng, K., Zheng, L., Zheng, S., Zheng, X.-L., Zheng, Y., Zheng, Z.-G., Zhivotovsky, B., Zhong, Q., Zhou, A., Zhou, B., Zhou, C., Zhou, G., Zhou, Hao, Zhou, Hong, Zhou, Hongbo, Zhou, Jie, Zhou, Jing, Zhou, Jing, Zhou, Jiyong, Zhou, K., Zhou, R., Zhou, X.-J., Zhou, Yanshuang, Zhou, Yinghong, Zhou, Yubin, Zhou, Z.-Y., Zhou, Z., Zhu, B., Zhu, C., Zhu, G.-Q., Zhu, Haining, Zhu, Hongxin, Zhu, Hua, Zhu, W.-G., Zhu, Yanping, Zhu, Yushan, Zhuang, H., Zhuang, X., Zientara-Rytter, K., Zimmermann, C.M., Ziviani, E., Zoladek, T., Zong, W.-X., Zorov, D.B., Zorzano, A., Zou, W., Zou, Zhen, Zou, Zhengzhi, Zuryn, S., Zwerschke, W., Brand-Saberi, B., Dong, X.C., Kenchappa, C.S., Li, Zuguo, Lin, Y., Oshima, S., Rong, Y., Sluimer, J.C., Stallings, C.L., Tong, C.-K., 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17, 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>

Kodama, J., Kaito, T., 2020. Osteoclast Multinucleation: Review of Current Literature. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5685. <https://doi.org/10.3390/ijms21165685>

Kong, L., Wang, B., Yang, X., He, B., Hao, D., Yan, L., 2020. Integrin-associated molecules and signalling cross talking in osteoclast cytoskeleton regulation. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 3271–3281. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15052>

Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., Jentsch, T.J., 2001. Loss of the ClC-7 Chloride Channel Leads to Osteopetrosis in Mice and Man. *Cell* 104, 205–215. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00206-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00206-9)

Kukita, A., Chenu, C., McManus, L.M., Mundy, G.R., Roodman, G.D., 1990. Atypical multinucleated cells form in long-term marrow cultures from patients with Paget's disease. *J. Clin. Invest.* 85, 1280–1286.

Kumar Das, A., Ghosh, N., Mandal, A., Sil, P.C., 2023. Glycobiology of cellular expiry: Decrypting the role of glycan-lectin regulatory complex and therapeutic strategies focusing on cancer. *Biochem. Pharmacol.* 207, 115367. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115367>

Kurihara, N., Hiruma, Y., Yamana, K., Michou, L., Rousseau, C., Morissette, J., Galson, D.L., Teramachi, J., Zhou, H., Dempster, D.W., Windle, J.J., Brown, J.P., Roodman, G.D., 2011. Contributions of the Measles Virus Nucleocapsid Gene and the SQSTM1/p62P392L Mutation to Paget's Disease. *Cell Metab.* 13, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.12.002>

Kurihara, N., Hiruma, Y., Zhou, H., Subler, M.A., Dempster, D.W., Singer, F.R., Reddy, S.V., Gruber, H.E., Windle, J.J., Roodman, G.D., 2007. Mutation of the sequestosome 1 (p62) gene increases osteoclastogenesis but does not induce Paget disease. *J. Clin. Invest.* 117, 133–142. <https://doi.org/10.1172/JCI28267>

- Laitala-Leinonen, T., 2005. Unsatisfactory gene transfer into bone-resorbing osteoclasts with liposomal transfection systems. *J. Negat. Results Biomed.* 4, 5. <https://doi.org/10.1186/1477-5751-4-5>
- Lamothe, B., Lai, Y., Xie, M., Schneider, M.D., Darnay, B.G., 2013. TAK1 Is Essential for Osteoclast Differentiation and Is an Important Modulator of Cell Death by Apoptosis and Necroptosis. *Mol. Cell. Biol.* 33, 582–595. <https://doi.org/10.1128/MCB.01225-12>
- Laplane, M., Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>
- Latorre, E., Harries, Lorna.W., 2017. Splicing regulatory factors, ageing and age-related disease. *Ageing Res. Rev.* 36, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.04.004>
- Laurin, N., Brown, J.P., Morissette, J., Raymond, V., 2002. Recurrent Mutation of the Gene Encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget Disease of Bone. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1582–1588. <https://doi.org/10.1086/340731>
- Lee, B., Oh, Y., Jo, S., Kim, T.-H., Ji, J.D., 2019. A dual role of TGF- β in human osteoclast differentiation mediated by Smad1 versus Smad3 signaling. *Immunol. Lett.* 206, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.12.003>
- Lee, K., Seo, I., Choi, M.H., Jeong, D., 2018. Roles of Mitogen-Activated Protein Kinases in Osteoclast Biology. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 3004. <https://doi.org/10.3390/ijms19103004>
- Lee, Z.H., Kim, H.-H., 2003. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 211–214. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00695-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00695-8)
- Lete, M.G., Franconetti, A., Delgado, S., Jiménez-Barbero, J., Ardá, A., 2022. Oligosaccharide Presentation Modulates the Molecular Recognition of Glycolipids by Galectins on Membrane Surfaces. *Pharmaceuticals* 15, 145. <https://doi.org/10.3390/ph15020145>
- Levy, Y., Arbel-Goren, R., Hadari, Y.R., Eshhar, S., Ronen, D., Elhanany, E., Geiger, B., Zick, Y., 2001. Galectin-8 Functions as a Matricellular Modulator of Cell Adhesion *. *J. Biol. Chem.* 276, 31285–31295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100340200>
- Levy, Y., Auslender, S., Eisenstein, M., Vidavski, R.R., Ronen, D., Bershadsky, A.D., Zick, Y., 2006. It depends on the hinge: a structure-functional analysis of galectin-8, a tandem-repeat type lectin. *Glycobiology* 16, 463–476. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj097>
- Li, F.-Y., Weng, I.-C., Lin, C.-H., Kao, M.-C., Wu, M.-S., Chen, H.-Y., Liu, F.-T., 2019. Helicobacter pylori induces intracellular galectin-8 aggregation around damaged lysosomes within gastric epithelial cells in a host O-glycan-dependent manner. *Glycobiology* 29, 151–162. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy095>
- Li, J., Guo, B., Zhang, W., Yue, S., Huang, S., Gao, S., Ma, J., Cipollo, J.F., Yang, S., 2022. Recent advances in demystifying O-glycosylation in health and disease. *PROTEOMICS* 22, 2200156. <https://doi.org/10.1002/pmic.202200156>

- Li, S., Wandel, M.P., Li, F., Liu, Z., He, C., Wu, J., Shi, Y., Randow, F., 2013. Sterical hindrance promotes selectivity of the autophagy cargo receptor NDP52 for the danger receptor galectin-8 in anti-bacterial autophagy. *Sci. Signal.* 6, ra9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003730>
- Li, W., Sancho, A., Chung, W.-L., Vinik, Y., Groll, J., Zick, Y., Medalia, O., Bershadsky, A.D., Geiger, B., 2021. Differential cellular responses to adhesive interactions with galectin-8- and fibronectin-coated substrates. *J. Cell Sci.* 134, jcs252221. <https://doi.org/10.1242/jcs.252221>
- Li, Y.-J., Kukita, A., Teramachi, J., Nagata, K., Wu, Z., Akamine, A., Kukita, T., 2009. A possible suppressive role of galectin-3 in upregulated osteoclastogenesis accompanying adjuvant-induced arthritis in rats. *Lab. Invest.* 89, 26–37. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.111>
- Lim, H., Yu, C.-Y., Jou, T.-S., 2017. Galectin-8 regulates targeting of Gp135/podocalyxin and lumen formation at the apical surface of renal epithelial cells. *FASEB J.* 31, 4927–4917. <https://doi.org/10.1096/fj.201601386R>
- Liu, F.-T., Patterson, R.J., Wang, J.L., 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj., Animal Lectins* 1572, 263–273. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00313-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00313-6)
- Liu, W., Xu, C., Zhao, H., Xia, P., Song, R., Gu, J., Liu, X., Bian, J., Yuan, Y., Liu, Z., 2015. Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway. *PLoS ONE* 10, e0142519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142519>
- Lo, Y.-H., Li, C.-S., Chen, H.-L., Chiang, C.-Y., Huang, C.-C., Tu, T.-J., Lo, T.-H., Choy, D.F., Arron, J.R., Chen, H.-Y., Liu, F.-T., 2021. Galectin-8 Is Upregulated in Keratinocytes by IL-17A and Promotes Proliferation by Regulating Mitosis in Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 141, 503-511.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.07.021>
- Lombardi, A.F., Aihara, A.Y., Fernandes, A. da R.C., Cardoso, F.N., 2022. Imaging of Paget's Disease of Bone. *Radiol. Clin. North Am., Musculoskeletal Imaging of the Older Population* 60, 561–573. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2022.02.005>
- Long, C.L., Humphrey, M.B., 2012. Osteoimmunology: the expanding role of immunoreceptors in osteoclasts and bone remodeling. *BoneKEY Rep.* 1, 59. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2012.59>
- Long, F., 2011. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 27–38. <https://doi.org/10.1038/nrm3254>
- López-Doménech, G., Howden, J.H., Covill-Cooke, C., Morfill, C., Patel, J.V., Bürli, R., Crowther, D., Birsa, N., Brandon, N.J., Kittler, J.T., 2021. Loss of neuronal Miro1 disrupts mitophagy and induces hyperactivation of the integrated stress response. *EMBO J.* 40, e100715. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100715>
- Lőrincz, P., Tóth, S., Benkő, P., Lakatos, Z., Boda, A., Glatz, G., Zobel, M., Bisi, S., Hegedűs, K., Takáts, S., Scita, G., Juhász, G., 2017. Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *J. Cell Biol.* 216, 1937–1947. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611027>

Luo, M.-L., Gong, C., Chen, C.-H., Hu, H., Huang, P., Zheng, M., Yao, Y., Wei, S., Wulf, G., Lieberman, J., Zhou, X.Z., Song, E., Lu, K.P., 2015. The Rab2A GTPase Promotes Breast Cancer Stem Cells and Tumorigenesis via Erk Signaling Activation. *Cell Rep.* 11, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.002>

Malghem, J., Vande Berg, B., Lecouvet, F., Maldague, B., 2005. Maladie de Paget. *EMC - Radiol.* 2, 288–310. <https://doi.org/10.1016/j.emcrad.2005.05.003>

Marzesco, A.-M., Dunia, I., Pandjaitan, R., Recouvreur, M., Dauzonne, D., Benedetti, E.L., Louvard, D., Zahraoui, A., 2002. The Small GTPase Rab13 Regulates Assembly of Functional Tight Junctions in Epithelial Cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 1819–1831. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-02-0029>

Matsumoto, N., Nakanishi-Matsui, M., 2019. Proton pumping V-ATPase inhibitor bafilomycin A1 affects Rab7 lysosomal localization and abolishes anterograde trafficking of osteoclast secretory lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 510, 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.118>

Matsumoto, N., Sekiya, M., Tohyama, K., Ishiyama-Matsuura, E., Sun-Wada, G.-H., Wada, Y., Futai, M., Nakanishi-Matsui, M., 2018. Essential Role of the $\alpha 3$ Isoform of V-ATPase in Secretory Lysosome Trafficking via Rab7 Recruitment. *Sci. Rep.* 8, 6701. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24918-7>

Matsumoto, R., Matsumoto, H., Seki, M., Hata, M., Asano, Y., Kanegasaki, S., Stevens, R.L., Hirashima, M., 1998. Human Ecalectin, a Variant of Human Galectin-9, Is a Novel Eosinophil Chemoattractant Produced by T Lymphocytes *. *J. Biol. Chem.* 273, 16976–16984. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.27.16976>

Matsunaga, K., Taoka, M., Isobe, T., Izumi, T., 2017. Rab2a and Rab27a cooperatively regulate the transition from granule maturation to exocytosis through the dual effector Noc2. *J. Cell Sci.* 130, 541–550. <https://doi.org/10.1242/jcs.195479>

Matsuo, K., Irie, N., 2008. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch. Biochem. Biophys.*, Highlight Issue: Bone Remodeling: Facts and Perspectives 473, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.027>

Matsuo, K., Otaki, N., 2012. Bone cell interactions through Eph/ephrin. *Cell Adhes. Migr.* 6, 148–156. <https://doi.org/10.4161/cam.20888>

McDonald, M.M., Khoo, W.H., Ng, P.Y., Xiao, Y., Zamerli, J., Thatcher, P., Kyaw, W., Pathmanandavel, K., Grootveld, A.K., Moran, I., Butt, D., Nguyen, A., Warren, S., Biro, M., Butterfield, N.C., Guilfoyle, S.E., Komla-Ebri, D., Dack, M.R.G., Dewhurst, H.F., Logan, J.G., Li, Y., Mohanty, S.T., Byrne, N., Terry, R.L., Simic, M.K., Chai, R., Quinn, J.M.W., Youlten, S.E., Pettitt, J.A., Abi-Hanna, D., Jain, R., Weninger, W., Lundberg, M., Sun, S., Ebetino, F.H., Timpson, P., Lee, W.M., Baldock, P.A., Rogers, M.J., Brink, R., Williams, G.R., Bassett, J.H.D., Kemp, J.P., Pavlos, N.J., Croucher, P.I., Phan, T.G., 2021. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell* 184, 1330–1347.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.002>

McEwan, D.G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F.P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M.H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., Dikic, I., 2015. PLEKHM1 Regulates Autophagosome-

Lysosome Fusion through HOPS Complex and LC3/GABARAP Proteins. *Mol. Cell* 57, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.006>

McManus, S., Bisson, M., Chamberland, R., Roy, M., Nazari, S., Roux, S., 2016. Autophagy and 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 (PDK1)-Related Kinome in Pagetic Osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 31, 1334–1343. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2806>

McManus, S., Chamoux, E., Bisson, M., Roux, S., 2012. Modulation of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors in a human osteoclast model in vitro. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 17, 121–131. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0662-5>

McManus, S., Roux, S., 2012. The adaptor protein p62/SQSTM1 in osteoclast signaling pathways. *J. Mol. Signal.* 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-7-1>

McMichael, B.K., Cheney, R.E., Lee, B.S., 2010a. Myosin X Regulates Sealing Zone Patterning in Osteoclasts through Linkage of Podosomes and Microtubules. *J. Biol. Chem.* 285, 9506–9515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017269>

McMichael, B.K., Cheney, R.E., Lee, B.S., 2010b. Myosin X Regulates Sealing Zone Patterning in Osteoclasts through Linkage of Podosomes and Microtubules. *J. Biol. Chem.* 285, 9506–9515. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.017269>

Meinohl, C., Barnard, S.J., Fritz-Wolf, K., Unger, M., Porr, A., Heipel, M., Wirth, S., Madlung, J., Nordheim, A., Menke, A., Becker, K., Giehl, K., 2019. Galectin-8 binds to the Farnesylated C-terminus of K-Ras4B and Modifies Ras/ERK Signaling and Migration in Pancreatic and Lung Carcinoma Cells. *Cancers* 12, 30. <https://doi.org/10.3390/cancers12010030>

Menea, C., Reddy, S.V., Kurihara, N., Maeda, H., Anderson, D., Cundy, T., Cornish, J., Singer, F.R., Bruder, J.M., Roodman, G.D., 2000. Enhanced RANK ligand expression and responsivity of bone marrow cells in Paget's disease of bone. *J. Clin. Invest.* 105, 1833–1838.

Michou, L., Chamoux, E., Couture, J., Morissette, J., Brown, J.P., Roux, S., 2010. Gene expression profile in osteoclasts from patients with Paget's disease of bone. *Bone* 46, 598–603. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.11.012>

Millar, A.L., Pavios, N.J., Xu, J., Zheng, M.H., 2002. Rab3D: a regulator of exocytosis in non-neuronal cells. *Histol. Histopathol.* 17, 929–936. <https://doi.org/10.14670/HH-17.929>

Miyagawa, K., Tenshin, H., Mulcrone, P.L., Delgado-Calle, J., Subler, M.A., Windle, J.J., Chirgwin, J.M., Roodman, G.D., Kurihara, N., 2023. Osteoclast-derived IGF1 induces RANKL production in osteocytes and contributes to Pagetic lesion formation. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.159838>

Montaseri, A., Giampietri, C., Rossi, M., Riccioli, A., Fattore, A.D., Filippini, A., 2020. The Role of Autophagy in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Function. *Biomolecules* 10, 1398. <https://doi.org/10.3390/biom10101398>

Morgan, N.E., Cutrona, M.B., Simpson, J.C., 2019. Multitasking Rab Proteins in Autophagy and Membrane Trafficking: A Focus on Rab33b. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3916. <https://doi.org/10.3390/ijms20163916>

- Moriyama, K., Kukita, A., Li, Y.-J., Uehara, N., Zhang, J.-Q., Takahashi, I., Kukita, T., 2014. Regulation of osteoclastogenesis through Tim-3: possible involvement of the Tim-3/galectin-9 system in the modulation of inflammatory bone destruction. *Lab. Invest.* 94, 1200–1211. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.107>
- Moscat, J., Diaz-Meco, M.T., Wooten, M.W., 2007. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* 32, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.12.002>
- Mukhopadhyay, S., Panda, P.K., Sinha, N., Das, D.N., Bhutia, S.K., 2014. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 555–566. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0967-2>
- Mulari, M., Vääräniemi, J., Väänänen, H.K., 2003. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microsc. Res. Tech.* 61, 496–503. <https://doi.org/10.1002/jemt.10371>
- Mulari, M.T.K., Zhao, H., Lakkakorpi, P.T., Väänänen, H.K., 2003. Osteoclast Ruffled Border Has Distinct Subdomains for Secretion and Degraded Matrix Uptake. *Traffic* 4, 113–125. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.40206.x>
- Muller, J., Duray, E., Lejeune, M., Dubois, S., Plougouven, E., Léonard, A., Storti, P., Giuliani, N., Cohen-Solal, M., Hempel, U., Thijssen, V.L., Beguin, Y., Heusschen, R., Caers, J., 2019. Loss of Stromal Galectin-1 Enhances Multiple Myeloma Development: Emphasis on a Role in Osteoclasts. *Cancers* 11, 261. <https://doi.org/10.3390/cancers11020261>
- Mun, S.H., Park, P.S.U., Park-Min, K.-H., 2020. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp. Mol. Med.* 52, 1239–1254. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0484-z>
- Nabi, I.R., Shankar, J., Dennis, J.W., 2015. The galectin lattice at a glance. *J. Cell Sci.* 128, 2213–2219. <https://doi.org/10.1242/jcs.151159>
- Nagy, N., 2002. Galectin-8 expression decreases in cancer compared with normal and dysplastic human colon tissue and acts significantly on human colon cancer cell migration as a suppressor. *Gut* 50, 392–401. <https://doi.org/10.1136/gut.50.3.392>
- Nakajima, K., Kho, D.H., Yanagawa, T., Harazono, Y., Hogan, V., Chen, W., Ali-Fehmi, R., Mehra, R., Raz, A., 2016. Galectin-3 Cleavage Alters Bone Remodeling: Different Outcomes in Breast and Prostate Cancer Skeletal Metastasis. *Cancer Res.* 76, 1391–1402. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1793>
- Nakamura, S., Koyama, T., Izawa, N., Nomura, S., Fujita, T., Omata, Y., Minami, T., Matsumoto, M., Nakamura, M., Fujita-Jimbo, E., Momoi, T., Miyamoto, T., Aburatani, H., Tanaka, S., 2017. Negative feedback loop of bone resorption by NFATc1-dependent induction of Cadm1. *PLOS ONE* 12, e0175632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175632>
- Naot, D., Bava, U., Matthews, B., Callon, K.E., Gamble, G.D., Black, M., Song, S., Pitto, R.P., Cundy, T., Cornish, J., Reid, I.R., 2007. Differential Gene Expression in Cultured Osteoblasts and Bone Marrow Stromal Cells From Patients With Paget's Disease of Bone. *J. Bone Miner. Res.* 22, 298–309. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061108>

Neale, S.D., Schulze, E., Smith, R., Athanasou, N.A., 2002. The influence of serum cytokines and growth factors on osteoclast formation in Paget's disease. *QJM Int. J. Med.* 95, 233–240. <https://doi.org/10.1093/qjmed/95.4.233>

Ng, P.Y., Ribet, A.B.P., Guo, Q., Mullin, B.H., Tan, J.W.Y., Landao-Bassonga, E., Stephens, S., Chen, K., Yuan, J., Abudulai, L., Bollen, M., Nguyen, E.T.T.T., Kular, J., Papadimitriou, J.M., S e, K., Teasdale, R.D., Xu, J., Parton, R.G., Takayanagi, H., Pavlos, N.J., 2023. Sugar transporter Slc37a2 regulates bone metabolism in mice via a tubular lysosomal network in osteoclasts. *Nat. Commun.* 14, 906. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36484-2>

Nguyen, H.D., Bisson, M., Scott, M., Boire, G., Bouchard, L., Roux, S., 2021. miR profile in pagetic osteoclasts: from large-scale sequencing to gene expression study. *J. Mol. Med.* 99, 1771–1781. <https://doi.org/10.1007/s00109-021-02128-5>

Nickless, A., Bailis, J.M., You, Z., 2017. Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway. *Cell Biosci.* 7, 26. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0153-7>

Niida, shumpei, Amizuca, N., Hara, F., Ozawa, H., Kodama, H., 1994. Expression of Mac-2 Antigen in the Preosteoclast and Osteoclast Identified in the oplop Mouse Injected with Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Bone Miner Res.*

Nio-Kobayashi, J., 2017. Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat. Sci. Int.* 92, 25–36. <https://doi.org/10.1007/s12565-016-0366-6>

Nishi, N., Itoh, A., Fujiyama, A., Yoshida, N., Araya, S., Hirashima, M., Shoji, H., Nakamura, T., 2005. Development of highly stable galectins: Truncation of the linker peptide confers protease-resistance on tandem-repeat type galectins. *FEBS Lett.* 579, 2058–2064. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.054>

Nishi, N., Itoh, A., Shoji, H., Miyanaka, H., Nakamura, T., 2006. Galectin-8 and galectin-9 are novel substrates for thrombin. *Glycobiology* 16, 15C-20C. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl028>

Nishi, N., Shoji, H., Seki, M., Itoh, A., Miyanaka, H., Yuube, K., Hirashima, M., Nakamura, T., 2003. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin α M. *Glycobiology* 13, 755–763. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg102>

Noda, N.N., 2021. Atg2 and Atg9: Intermembrane and interleaflet lipid transporters driving autophagy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1866, 158956. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158956>

Norambuena, A., Metz, C., Vicu a, L., Silva, A., Pardo, E., Oyanadel, C., Massardo, L., Gonz alez, A., Soza, A., 2009. Galectin-8 Induces Apoptosis in Jurkat T Cells by Phosphatidic Acid-mediated ERK1/2 Activation Supported by Protein Kinase A Down-regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 12670–12679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808949200>

Nottingham, R.M., Pfeffer, S.R., 2015. Measuring Rab GTPase-Activating Protein (GAP) Activity in Live Cells and Extracts. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1298, 61–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2569-8_5

Obino, D., Fetler, L., Soza, A., Malbec, O., Saez, J.J., Labarca, M., Oyanadel, C., Batalla, F.D.V., Goles, N., Chikina, A., Lankar, D., Segovia-Miranda, F., Garcia, C., Léger, T., Gonzalez, A., Espéli, M., Lennon-Duménil, A.-M., Yuseff, M.-I., 2018. Galectin-8 Favors the Presentation of Surface-Tethered Antigens by Stabilizing the B Cell Immune Synapse. *Cell Rep.* 25, 3110. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.052>

O'Brien, C.A., 2010. Control of RANKL Gene Expression. *Bone* 46, 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.08.050>

Oda, S., Nozawa, T., Nozawa-Minowa, A., Tanaka, M., Aikawa, C., Harada, H., Nakagawa, I., 2016. Golgi-Resident GTPase Rab30 Promotes the Biogenesis of Pathogen-Containing Autophagosomes. *PLOS ONE* 11, e0147061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147061>

Ohmae, S., Noma, N., Toyomoto, M., Shinohara, M., Takeiri, M., Fuji, H., Takemoto, K., Iwaisako, K., Fujita, T., Takeda, N., Kawatani, M., Aoyama, M., Hagiwara, M., Ishihama, Y., Asagiri, M., 2017. Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K. *Sci. Rep.* 7, 41710. <https://doi.org/10.1038/srep41710>

Okusha, Y., Tran, M.T., Itagaki, M., Sogawa, C., Eguchi, T., Okui, T., Kadowaki, T., Sakai, E., Tsukuba, T., Okamoto, K., 2020. Rab11A Functions as a Negative Regulator of Osteoclastogenesis through Dictating Lysosome-Induced Proteolysis of c-fms and RANK Surface Receptors. *Cells* 9, 2384. <https://doi.org/10.3390/cells9112384>

Ono, T., Nakashima, T., 2018. Recent advances in osteoclast biology. *Histochem. Cell Biol.* 149, 325–341. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1636-2>

Ory, S., Brazier, H., Pawlak, G., Blangy, A., 2008. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur. J. Cell Biol.* 87, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.03.002>

Palokangas, H., Mulari, M., Vaananen, H.K., 1997. Endocytic pathway from the basal plasma membrane to the ruffled border membrane in bone-resorbing osteoclasts. *J. Cell Sci.* 110, 1767–1780.

Palumbo, C., Ferretti, M., 2021. The Osteocyte: From “Prisoner” to “Orchestrator.” *J. Funct. Morphol. Kinesiol.* 6, 28. <https://doi.org/10.3390/jfmk6010028>

Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M., Lambright, D.G., 2006. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* 442, 303–306. <https://doi.org/10.1038/nature04847>

Panarella, A., Bexiga, M.G., Galea, G., O' Neill, E.D., Salvati, A., Dawson, K.A., Simpson, J.C., 2016. A systematic High-Content Screening microscopy approach reveals key roles for Rab33b, OATL1 and Myo6 in nanoparticle trafficking in HeLa cells. *Sci. Rep.* 6, 28865. <https://doi.org/10.1038/srep28865>

Park, J.H., Lee, N.K., Lee, S.Y., 2017. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol. Cells* 40, 706–713. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0225>

- Park-Min, K.-H., Lorenzo, J., 2022. Osteoclasts: Other functions. *Bone* 165, 116576. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116576>
- Parzych, K.R., Klionsky, D.J., 2014. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 460–473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pascaretti-Grizon, F., Mabileau, G., Basle, M. f., Chappard, D., 2011. Measurement by vertical scanning profilometry of resorption volume and lacunae depth caused by osteoclasts on dentine slices. *J. Microsc.* 241, 147–152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03410.x>
- Patnaik, S.K., Potvin, B., Carlsson, S., Sturm, D., Leffler, H., Stanley, P., 2006. Complex N-glycans are the major ligands for galectin-1, -3, and -8 on Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 16, 305–317. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj063>
- Pavlos, N.J., Cheng, T.S., Qin, A., Ng, P.Y., Feng, H.-T., Ang, E.S.M., Carrello, A., Sung, C.-H., Jahn, R., Zheng, M.-H., Xu, J., 2011. Tctex-1, a Novel Interaction Partner of Rab3D, Is Required for Osteoclastic Bone Resorption. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1551–1564. <https://doi.org/10.1128/MCB.00834-10>
- Pavlos, N.J., Xu, J., Riedel, D., Yeoh, J.S.G., Teitelbaum, S.L., Papadimitriou, J.M., Jahn, R., Ross, F.P., Zheng, M.H., 2005. Rab3D Regulates a Novel Vesicular Trafficking Pathway That Is Required for Osteoclastic Bone Resorption. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5253–5269. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.5253-5269.2005>
- Pennanen, P., Kallionpää, R.A., Peltonen, S., Nissinen, L., Kähäri, V.-M., Heervä, E., Peltonen, J., 2021. Signaling pathways in human osteoclasts differentiation: ERK1/2 as a key player. *Mol. Biol. Rep.* 48, 1243–1254. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06128-5>
- Pfeffer, S.R., 2017. Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* 28, 712–715. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-10-0737>
- Pfeffer, S.R., 2013. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell organelles* 25, 414–419. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.04.002>
- Pied, N., Daussy, C.F., Denis, Z., Ragues, J., Faure, M., Iggo, R., Tschan, M.P., Roger, B., Rayne, F., Wodrich, H., 2022. TBK1 is part of a galectin 8 dependent membrane damage recognition complex and drives autophagy upon Adenovirus endosomal escape. *PLOS Pathog.* 18, e1010736. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010736>
- Pivetta, E., Scapolan, M., Pecolo, M., Wassermann, B., Abu-Rumeileh, I., Balestreri, L., Borsatti, E., Tripodo, C., Colombatti, A., Spessotto, P., 2011. MMP-13 stimulates osteoclast differentiation and activation in tumour breast bone metastases. *Breast Cancer Res.* 13, R105. <https://doi.org/10.1186/bcr3047>
- Ponzetti, M., Rucci, N., 2021. Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 6651. <https://doi.org/10.3390/ijms22136651>
- Popa, S.J., Stewart, S.E., Moreau, K., 2018. Unconventional secretion of annexins and galectins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 83, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.022>

- Porębska, N., Poźniak, M., Matynia, A., Żukowska, D., Zakrzewska, M., Otlewski, J., Opaliński, Ł., 2021. Galectins as modulators of receptor tyrosine kinases signaling in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 60, 89–106. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.03.004>
- Porther, N., Barbieri, M., 2015. The role of endocytic Rab GTPases in regulation of growth factor signaling and the migration and invasion of tumor cells. *Small GTPases* 6, 135–144. <https://doi.org/10.1080/21541248.2015.1050152>
- Prato, C.A., Carabelli, J., Campetella, O., Tribulatti, M.V., 2020. Galectin-8 Enhances T cell Response by Promotion of Antigen Internalization and Processing. *iScience* 23, 101278. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101278>
- Prieto-Dominguez, N., Parnell, C., Teng, Y., 2019. Drugging the Small GTPase Pathways in Cancer Treatment: Promises and Challenges. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8030255>
- Pusapati, G.V., Luchetti, G., Pfeffer, S.R., 2012. Ric1-Rgp1 Complex Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor for the Late Golgi Rab6A GTPase and an Effector of the Medial Golgi Rab33B GTPase. *J. Biol. Chem.* 287, 42129–42137. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.414565>
- Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., 2009. Turning “sweet” on immunity: galectin–glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 338–352. <https://doi.org/10.1038/nri2536>
- Radhakrishnan, A., Chellapandian, H., Ramasamy, P., Jeyachandran, S., 2022. Back2Basics: animal lectins: an insight into a highly versatile recognition protein. *J. Proteins Proteomics* 1–17. <https://doi.org/10.1007/s42485-022-00102-4>
- Ralston, S.H., Layfield, R., 2012. Pathogenesis of Paget disease of bone. *Calcif. Tissue Int.* 91, 97–113. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9599-0>
- Ravenhill, B.J., Boyle, K.B., Muhlinen, N. von, Ellison, C.J., Masson, G.R., Otten, E.G., Foeglein, A., Williams, R., Randow, F., 2019. The Cargo Receptor NDP52 Initiates Selective Autophagy by Recruiting the ULK Complex to Cytosol-Invasive Bacteria. *Mol. Cell* 74, 320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.041>
- Reddy, S.V., 2004. Etiology of Paget’s disease and osteoclast abnormalities. *J. Cell. Biochem.* 93, 688–696. <https://doi.org/10.1002/jcb.20256>
- Renard, H.-F., Tyckaert, F., Lo Giudice, C., Hirsch, T., Valades-Cruz, C.A., Lemaigre, C., Shafaq-Zadah, M., Wunder, C., Wattiez, R., Johannes, L., van der Bruggen, P., Alsteens, D., Morsomme, P., 2020. Endophilin-A3 and Galectin-8 control the clathrin-independent endocytosis of CD166. *Nat. Commun.* 11, 1457. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15303-y>
- Renier, J.C., Leroy, E., Audran, M., 1996. The initial site of bone lesions in Paget’s disease. A review of two hundred cases. *Rev. Rhum. Engl. Ed* 63, 823–829.
- Ribet, A.B.P., Ng, P.Y., Pavlos, N.J., 2021. Membrane Transport Proteins in Osteoclasts: The Ins and Outs. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.

- Romaniuk, M.A., Tribulatti, M.V., Cattaneo, V., Lapponi, M.J., Molinas, F.C., Campetella, O., Schattner, M., 2010. Human platelets express and are activated by galectin-8. *Biochem. J.* 432, 535–547. <https://doi.org/10.1042/BJ20100538>
- Roodman, G.D., Kurihara, N., Ohsaki, Y., Kukita, A., Hosking, D., Demulder, A., Smith, J.F., Singer, F.R., 1992. Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone. *J. Clin. Invest.* 89, 46–52.
- Roodman, G.D., Windle, J.J., 2005. Paget disease of bone. *J. Clin. Invest.* 115, 200–208.
- Roscher, A., Hasegawa, T., Dohnke, S., Ocaña-Morgner, C., Amizuka, N., Jessberger, R., Garbe, A.I., 2016. The F-actin modulator SWAP-70 controls podosome patterning in osteoclasts. *Bone Rep.* 5, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2016.07.002>
- Rose, S.D., Kim, D.-H., Amarzguioui, M., Heidel, J.D., Collingwood, M.A., Davis, M.E., Rossi, J.J., Behlke, M.A., 2005. Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 4140–4156. <https://doi.org/10.1093/nar/gki732>
- Roux, S., Brown, J.P., 2009. Osteoclast Apoptosis in Rheumatic Diseases Characterized by a High Level of Bone Resorption (Osteoporosis, Rheumatoid Arthritis, Myeloma and Paget's Disease of Bone). *Curr. Rheumatol. Rev.* 5, 98–110. <https://doi.org/10.2174/157339709788298428>
- Roux, S., Lambert-Comeau, P., Saint-Pierre, C., Lépine, M., Sawan, B., Parent, J.-L., 2005. Death receptors, Fas and TRAIL receptors, are involved in human osteoclast apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.092>
- Roy, M., Roux, S., 2018. Rab GTPases in Osteoclastic Endomembrane Systems. *BioMed Res. Int.* 2018, 4541538. <https://doi.org/10.1155/2018/4541538>
- Roy, M., Roux, S., 2017. Étude de l'expression et du rôle de TBC1D25 et de ses isoformes dans les ostéoclastes humains. Université de Sherbrooke.
- Ruan, M., Pederson, L., Bradley, E.W., Bamberger, A.-M., Oursler, M.J., 2010. Transforming Growth Factor- β Coordinately Induces Suppressor of Cytokine Signaling 3 and Leukemia Inhibitory Factor to Suppress Osteoclast Apoptosis. *Endocrinology* 151, 1713–1722. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0813>
- Sakai, H., Kobayashi, Y., Sakai, E., Shibata, M., Kato, Y., 2000. Cell Adhesion Is a Prerequisite for Osteoclast Survival. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 550–556. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2485>
- Salo, J., Lehenkari, P., Mulari, M., Metsikkö, K., Väänänen, H.K., 1997. Removal of Osteoclast Bone Resorption Products by Transcytosis. *Science* 276, 270–273. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.270>
- Salo, J., Metsikkö, K., Palokangas, H., Lehenkari, P., Väänänen, H.K., 1996. Bone-resorbing osteoclasts reveal a dynamic division of basal plasma membrane into two different domains. *J. Cell Sci.* 109, 301–307. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.2.301>
- Schmidt, S., Nakchbandi, I., Ruppert, R., Kawelke, N., Hess, M.W., Pfaller, K., Jurdic, P., Fässler, R., Moser, M., 2011. Kindlin-3-mediated signaling from multiple integrin classes is required for

osteoclast-mediated bone resorption. *J. Cell Biol.* 192, 883–897. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007141>

Schwartz, S.L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A., Wandinger-Ness, A., 2007. Rab GTPases at a glance. *J. Cell Sci.* 120, 3905–3910. <https://doi.org/10.1242/jcs.015909>

Sfeir, J.G., Drake, M.T., Khosla, S., Farr, J.N., 2022. Skeletal Aging. *Mayo Clin. Proc.* 97, 1194–1208. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2022.03.011>

Shafaq-Zadah, M., Dransart, E., Johannes, L., 2020. Clathrin-independent endocytosis, retrograde trafficking, and cell polarity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 65, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.009>

Shatz-Azoulay, H., Vinik, Y., Isaac, R., Kohler, U., Lev, S., Zick, Y., 2020. The Animal Lectin Galectin-8 Promotes Cytokine Expression and Metastatic Tumor Growth in Mice. *Sci. Rep.* 10, 7375. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64371-z>

Shen, J., Lin, X., Dai, F., Chen, G., Lin, H., Fang, B., Liu, H., 2023. Ubiquitin-specific peptidases: Players in bone metabolism. *Cell Prolif.* n/a, e13444. <https://doi.org/10.1111/cpr.13444>

Sheng, M.H.-C., Amoui, M., Stiffel, V., Srivastava, A.K., Wergedal, J.E., Lau, K.-H.W., 2009. Targeted Transgenic Expression of an Osteoclastic Transmembrane Protein-tyrosine Phosphatase in Cells of Osteoclastic Lineage Increases Bone Resorption and Bone Loss in Male Young Adult Mice. *J. Biol. Chem.* 284, 11531–11545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808324200>

Shi, J., Chen, Y., Zhao, W., Chen, Y., Yang, Q., Zhao, Z., Wang, H., Zhou, W., Sun, W., 2023. Galectin-8 involves in arthritic condylar bone loss via podoplanin/AKT/ERK axis-mediated inflammatory lymphangiogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 31, 753–765. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2023.01.008>

Shi, Jiali, Chen, Y., Zhao, W., Zhen, Q., Zhao, Z., Wang, H., Zhou, W., Sun, W., 2023. Galectin-8 Involves in Arthritic Condylar Bone Loss via Podoplanin/AKT/ERK Axis-mediated Inflammatory Lymphangiogenesis. *Osteoarthritis and Cartilage*.

Shimada-Sugawara, M., Sakai, E., Okamoto, K., Fukuda, M., Izumi, T., Yoshida, N., Tsukuba, T., 2015. Rab27A Regulates Transport of Cell Surface Receptors Modulating Multinucleation and Lysosome-Related Organelles in Osteoclasts. *Sci. Rep.* 5, 9620. <https://doi.org/10.1038/srep09620>

Shibley, J.M., Birdsall, S., Clark, J., Crew, J., Gill, S., Linehan, M., Gnarra, J., Fisher, S., Craig, I.W., Cooper, C.S., 1995. Mapping the X chromosome breakpoint in two papillary renal cell carcinoma cell lines with a t(X;1)(p11.2;q21.2) and the first report of a female case. *Cytogenet. Cell Genet.* 71, 280–284. <https://doi.org/10.1159/000134127>

Shibley, J.M., Clark, J., Crew, A.J., Birdsall, S., Rocques, P.J., Gill, S., Chelly, J., Monaco, A.P., Abe, S., Gusterson, B.A., 1994. The t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcomas involves two distinct loci on the X chromosome. *Oncogene* 9, 1447–1453.

Si, Y., Yao, Y., Jaramillo Ayala, G., Li, X., Han, Q., Zhang, W., Xu, X., Tai, G., Mayo, K.H., Zhou, Y., Su, J., 2021. Human galectin-16 has a pseudo ligand binding site and plays a role in regulating c-

Rel-mediated lymphocyte activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1865, 129755. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129755>

Siddiqui, J.A., Partridge, N.C., 2016. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology* 31, 233–245. <https://doi.org/10.1152/physiol.00061.2014>

Simon, D., Derer, A., Andes, F.T., Lezuo, P., Bozec, A., Schett, G., Herrmann, M., Harre, U., 2017. Galectin-3 as a novel regulator of osteoblast-osteoclast interaction and bone homeostasis. *Bone* 105, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.08.013>

Singer, F.R., 2015. Paget's disease of bone—genetic and environmental factors. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 662–671. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.138>

Smurova, K., Podbilewicz, B., 2016. Endocytosis regulates membrane localization and function of the fusogen EFF-1. *Small GTPases* 8, 177–180. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1211399>

Soysa, N.S., Alles, N., 2019. Positive and negative regulators of osteoclast apoptosis. *Bone Rep.* 11, 100225. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100225>

Soysa, N.S., Alles, N., 2016. Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.019>

Sparr, C., Meyer, A., Saleppico, R., Nickel, W., 2022. Unconventional secretion mediated by direct protein self-translocation across the plasma membranes of mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* 47, 699–709. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.04.001>

Stanley, E.R., Chitu, V., 2014. CSF-1 Receptor Signaling in Myeloid Cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a021857. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021857>

Stanley, P., Moremen, K.W., Lewis, N.E., Taniguchi, N., Aebi, M., 2022. N-Glycans, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Mohnen, D., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Starr, T., Sun, Y., Wilkins, N., Storrie, B., 2010. Rab33b and Rab6 are functionally overlapping regulators of Golgi homeostasis and trafficking. *Traffic Cph. Den.* 11, 626–636. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01051.x>

Statistique Canada, 2022a. Âge (en années), âge moyen et âge médian et genre : Canada et régions de tri d'acheminement © [WWW Document]. URL <https://www150.statcan.gc.ca/t1/tbl1/fr/tv.action?pid=9810002701> (accessed 1.7.23).

Statistique Canada, 2022b. Portrait de la population croissante des personnes âgées de 85 ans et plus au Canada selon le Recensement de 2021 [WWW Document]. URL <https://www12.statcan.gc.ca/census-recensement/2021/as-sa/98-200-X/2021004/98-200-X2021004-fra.cfm> (accessed 1.7.23).

Statistique Canada, 2021. La structure osseuse et la fonction musculaire du bas du corps chez les adultes âgés et les aînés au Canada, de 2016 à 2019. Feuille d'information sur la santé.

Stenbeck, G., Horton, M.A., 2004. Endocytic trafficking in actively resorbing osteoclasts. *J. Cell Sci.* 117, 827–836. <https://doi.org/10.1242/jcs.00935>

Stephens, E., Roy, M., Bisson, M., Nguyen, H.D., Scott, M.S., Boire, G., Bouchard, L., Roux, S., 2020. Osteoclast signaling-targeting miR-146a-3p and miR-155-5p are downregulated in Paget's disease of bone. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1866, 165852. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165852>

Stowell, S.R., Arthur, C.M., Dias-Baruffi, M., Rodrigues, L.C., Gourdine, J.-P., Heimburg-Molinaro, J., Ju, T., Molinaro, R.J., Rivera-Marrero, C., Xia, B., Smith, D.F., Cummings, R.D., 2010. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. *Nat. Med.* 16, 295–301. <https://doi.org/10.1038/nm.2103>

Subramani, D., Alahari, S.K., 2010. Integrin-mediated function of Rab GTPases in cancer progression. *Mol. Cancer* 9, 312. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-312>

Sugatani, T., Hruska, K.A., 2005. Akt1/Akt2 and Mammalian Target of Rapamycin/Bim Play Critical Roles in Osteoclast Differentiation and Survival, Respectively, Whereas Akt Is Dispensable for Cell Survival in Isolated Osteoclast Precursors*. *J. Biol. Chem.* 280, 3583–3589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410480200>

Sun, L., Xu, X., Chen, Y., Zhou, Y., Tan, R., Qiu, H., Jin, L., Zhang, W., Fan, R., Hong, W., Wang, T., 2018. Rab34 regulates adhesion, migration, and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 37, 3698–3714. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0202-7>

Sun, Y., Bilan, P.J., Liu, Z., Klip, A., 2010. Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 19909–19914. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009523107>

Sun, Y., Büki, K.G., Ettala, O., Vääräniemi, J.P., Väänänen, H.K., 2005. Possible Role of Direct Rac1-Rab7 Interaction in Ruffled Border Formation of Osteoclasts. *J. Biol. Chem.* 280, 32356–32361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414213200>

Sundaram, K., Shanmugarajan, S., Rao, D.S., Reddy, S.V., 2011. Mutant p62P392L Stimulation of Osteoclast Differentiation in Paget's Disease of Bone. *Endocrinology* 152, 4180–4189. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1225>

Svenning, S., Johansen, T., 2013. Selective autophagy. *Essays Biochem.* 55, 79–92. <https://doi.org/10.1042/bse0550079>

Szatmári, Z., Sass, M., 2014. The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators. *Autophagy* 10, 1154–1166. <https://doi.org/10.4161/auto.29395>

Takahata, M., Iwasaki, N., Nakagawa, H., Abe, Y., Watanabe, T., Ito, M., Majima, T., Minami, A., 2007. Sialylation of cell surface glycoconjugates is essential for osteoclastogenesis. *Bone* 41, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.03.016>

Takayanagi, H., 2021. RANKL as the master regulator of osteoclast differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* 39, 13–18. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01191-1>

Takeshita, S., Kaji, K., Kudo, A., 2000. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1477–1488. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.8.1477>

Tan, A., Ralston, S.H., 2014. Clinical Presentation of Paget's Disease: Evaluation of a Contemporary Cohort and Systematic Review. *Calcif. Tissue Int.* 95, 385–392. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9904-1>

Tanaka, S., 2007. Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system. *Am. J. Nephrol.* 27, 466–478.

Tang, L., Yin, Y., Liu, J., Li, Z., Lu, X., 2017. MiR-124 Attenuates Osteoclastogenic Differentiation of Bone Marrow Monocytes Via Targeting Rab27a. *Cell. Physiol. Biochem.* 43, 1663–1672. <https://doi.org/10.1159/000484027>

Tanida, I., 2011. Autophagy basics. *Microbiol. Immunol.* 55, 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00271.x>

Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., 2004. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol., Autophagy and Cell Fate* 36, 2503–2518. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.009>

Taylor, M.E., Drickamer, K., Imberty, A., van Kooyk, Y., Schnaar, R.L., Etzler, M.E., Varki, A., 2022. Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins, in: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Mohnen, D., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., Schnaar, R.L., Seeberger, P.H. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).

Tazhitdinova, R., Timoshenko, A.V., 2020. The Emerging Role of Galectins and O-GlcNAc Homeostasis in Processes of Cellular Differentiation. *Cells* 9, 1792. <https://doi.org/10.3390/cells9081792>

TBC1D25 (human) [WWW Document], n.d. URL <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=19946&showAllSites=true#> (accessed 11.7.23).

Teitelbaum, S.L., 2011. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1240, 14–17. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06283.x>

Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., 2003. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 4, 638–649. <https://doi.org/10.1038/nrg1122>

Teti, A., 2013. Mechanisms of osteoclast-dependent bone formation. *BoneKey Rep.* 2. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.183>

The human blood proteins - proteins detected in ms - The Human Protein Atlas [WWW Document], n.d. URL <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/blood+protein/proteins+detected+in+ms> (accessed 6.15.23).

The Status, Quality, and Expansion of the NIH Full-Length cDNA Project: The Mammalian Gene Collection (MGC), 2004. *Genome Res.* 14, 2121–2127. <https://doi.org/10.1101/gr.2596504>

Thiemann, S., Baum, L.G., 2016. Galectins and Immune Responses—Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu. Rev. Immunol.* 34, 243–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-041015-055402>

Thirunavukkarasu, K., Miles, R.R., Halladay, D.L., Yang, X., Galvin, R.J.S., Chandrasekhar, S., Martin, T.J., Onyia, J.E., 2001. Stimulation of Osteoprotegerin (OPG) Gene Expression by Transforming Growth Factor- β (TGF- β): MAPPING OF THE OPG PROMOTER REGION THAT MEDIATES TGF- β EFFECTS *. *J. Biol. Chem.* 276, 36241–36250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104319200>

Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, Á., Randow, F., 2012. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414–418. <https://doi.org/10.1038/nature10744>

Tian, F., Wang, Y., Bikle, D.D., 2018. IGF-1 signaling mediated cell-specific skeletal mechano-transduction. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 36, 576–583. <https://doi.org/10.1002/jor.23767>

Tissue expression of TBC1D25 - Summary - The Human Protein Atlas [WWW Document], n.d. URL <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000068354-TBC1D25/tissue> (accessed 2.11.17).

Tong, X., Gu, J., Song, R., Wang, D., Sun, Z., Sui, C., Zhang, C., Liu, X., Bian, J., Liu, Z., 2019. Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption by enhancing autophagy via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro. *J. Cell. Biochem.* 120, 1630–1642. <https://doi.org/10.1002/jcb.27468>

Tong, X., Zhang, C., Wang, D., Song, R., Ma, Y., Cao, Y., Zhao, H., Bian, J., Gu, J., Liu, Z., 2020. Suppression of AMP-activated protein kinase reverses osteoprotegerin-induced inhibition of osteoclast differentiation by reducing autophagy. *Cell Prolif.* 53, e12714. <https://doi.org/10.1111/cpr.12714>

Toscano, M.A., Martínez Allo, V.C., Cutine, A.M., Rabinovich, G.A., Mariño, K.V., 2018. Untangling Galectin-Driven Regulatory Circuits in Autoimmune Inflammation. *Trends Mol. Med.* 24, 348–363. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.008>

Touaitahuata, H., Blangy, A., Vives, V., 2014. Modulation of osteoclast differentiation and bone resorption by Rho GTPases. *Small GTPases* 5, e28119. <https://doi.org/10.4161/sgtp.28119>

Townsend, P.A., Villanova, I., Teti, A., Horton, M.A., 1999. β 1 Integrin antisense oligodeoxynucleotides: utility in controlling osteoclast function. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 485–496. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(99\)80075-2](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(99)80075-2)

Tran, M.T., Okusha, Y., Feng, Y., Morimatsu, M., Wei, P., Sogawa, C., Eguchi, T., Kadowaki, T., Sakai, E., Okamura, H., Naruse, K., Tsukuba, T., Okamoto, K., 2020a. The Inhibitory Role of Rab11b in Osteoclastogenesis through Triggering Lysosome-Induced Degradation of c-Fms and RANK Surface Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21249352>

Tran, M.T., Okusha, Y., Feng, Y., Morimatsu, M., Wei, P., Sogawa, C., Eguchi, T., Kadowaki, T., Sakai, E., Okamura, H., Naruse, K., Tsukuba, T., Okamoto, K., 2020b. The Inhibitory Role of Rab11b in Osteoclastogenesis through Triggering Lysosome-Induced Degradation of c-Fms and RANK Surface Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 9352. <https://doi.org/10.3390/ijms21249352>

Tranquilli Leali, P., Doria, C., Zachos, A., Ruggiu, A., Milia, F., Barca, F., 2009. Bone fragility: current reviews and clinical features. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 6, 109–113.

Tribulatti, M.V., Cattaneo, V., Hellman, U., Mucci, J., Campetella, O., 2009. Galectin-8 provides costimulatory and proliferative signals to T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 86, 371–380. <https://doi.org/10.1189/jlb.0908529>

Tribulatti, M.V., Mucci, J., Cattaneo, V., Agüero, F., Gilmartin, T., Head, S.R., Campetella, O., 2007. Galectin-8 Induces Apoptosis in the CD4^{high}CD8^{high} Thymocyte Subpopulation. *Glycobiology* 17, 1404–1412. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm104>

Troncoso, M.F., Ferragut, F., Bacigalupo, M.L., Cárdenas Delgado, V.M., Nugnes, L.G., Gentilini, L., Laderach, D., Wolfenstein-Todel, C., Compagno, D., Rabinovich, G.A., Elola, M.T., 2014. Galectin-8: A matricellular lectin with key roles in angiogenesis. *Glycobiology* 24, 907–914. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu054>

Trottein, F., Schaffer, L., Ivanov, S., Paget, C., Vendeville, C., Groux-Degroote, S., Lee, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Head, S.R., Gosset, P., Delannoy, P., 2009. Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconj. J.* 26, 1259–1274. <https://doi.org/10.1007/s10719-009-9244-y>

Tuck, S.P., Layfield, R., Walker, J., Mekayil, B., Francis, R., 2017. Adult Paget's disease of bone: a review. *Rheumatology* 56, 2050–2059. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew430>

Urbanski, L., Leclair, N., Anczuków, O., 2018. Alternative-splicing defects in cancer: splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 9, e1476. <https://doi.org/10.1002/wrna.1476>

Usategui-Martín, R., García-Aparicio, J., Corral-Gudino, L., Calero-Paniagua, I., Pino-Montes, J.D., Sarmiento, R.G., 2015. Polymorphisms in Autophagy Genes Are Associated with Paget Disease of Bone. *PLOS ONE* 10, e0128984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128984>

Usategui-Martín, R., Gestoso-Uzal, N., Calero-Paniagua, I., De Pereda, J.M., del Pino-Montes, J., González-Sarmiento, R., 2020. A mutation in p62 protein (p. R321C), associated to Paget's disease of bone, causes a blockade of autophagy and an activation of NF-κB pathway. *Bone* 133, 115265. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115265>

Väänänen, H.K., Karhukorpi, E.-K., Sundquist, K., Wallmark, B., Roinien, I., Hentunen, T., Tuukkanen, J., Lakkakorpi, P.T., 1990. Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H(+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J. Cell Biol.* 111, 1305–1311.

Vääräniemi, J., Halleen, J.M., Kaarlone, K., Ylipahkala, H., Alatalo, S.L., Andersson, G., Kaija, H., Vihko, P., Väänänen, H.K., 2004. Intracellular Machinery for Matrix Degradation in Bone-Resorbing Osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 19, 1432–1440. <https://doi.org/10.1359/JBMR.040603>

- Valenzuela, E.N., Pietschmann, P., 2017. Epidemiology and pathology of Paget's disease of bone – a review. *Wien. Med. Wochenschr.* 167, 2–8. <https://doi.org/10.1007/s10354-016-0496-4>
- Vallet, M., Soares, D.C., Wani, S., Sophocleous, A., Warner, J., Salter, D.M., Ralston, S.H., Albagha, O.M.E., 2015. Targeted sequencing of the Paget's disease associated 14q32 locus identifies several missense coding variants in RIN3 that predispose to Paget's disease of bone. *Hum. Mol. Genet.* 24, 3286–3295. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv068>
- Valsdottir, R., Hashimoto, H., Ashman, K., Koda, T., Storrie, B., Nilsson, T., 2001. Identification of rabaptin-5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER. *FEBS Lett.* 508, 201–209. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02993-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02993-3)
- Van Wesenbeeck, L., Odgren, P.R., Coxon, F.P., Frattini, A., Moens, P., Perdu, B., MacKay, C.A., Van Hul, E., Timmermans, J.-P., Vanhoenacker, F., Jacobs, R., Peruzzi, B., Teti, A., Helfrich, M.H., Rogers, M.J., Villa, A., Van Hul, W., 2007. Involvement of PLEKHM1 in osteoclastic vesicular transport and osteopetrosis in incisors absent rats and humans. *J. Clin. Invest.* 117, 919–930. <https://doi.org/10.1172/JCI30328>
- Vargas, J.N.S., Hamasaki, M., Kawabata, T., Youle, R.J., Yoshimori, T., 2023. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24, 167–185. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00542-2>
- Varki, A., Kornfeld, S., 2022. Historical Background and Overview, in: *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vasta, G.R., 2009. Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 424–438. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2146>
- Verkerke, H., Dias-Baruffi, M., Cummings, R.D., Arthur, C.M., Stowell, S.R., 2022. Galectins: An Ancient Family of Carbohydrate Binding Proteins Carbohydrate binding proteins (CBPs) with Modern Functions, in: Stowell, S.R., Arthur, C.M., Cummings, R.D. (Eds.), *Galectins: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Springer US, New York, NY, pp. 1–40. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2055-7_1
- Vértesy, S., Michalak, M., Miller, M.C., Schnölzer, M., André, S., Kopitz, J., Mayo, K.H., Gabius, H.-J., 2015. Structural significance of galectin design: impairment of homodimer stability by linker insertion and partial reversion by ligand presence. *Protein Eng. Des. Sel.* 28, 199–210. <https://doi.org/10.1093/protein/gzv014>
- Villanova, I., Townsend, P.A., Uhlmann, E., Knolle, J., Peyman, A., Amling, M., Baron, R., Horton, M.A., Teti, A., 1999. Oligodeoxynucleotide Targeted to the α v Gene Inhibits α v Integrin Synthesis, Impairs Osteoclast Function, and Activates Intracellular Signals to Apoptosis. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1867–1879. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.11.1867>
- Vinik, Y., Shatz-Azoulay, H., Hiram-Bab, S., Kandel, L., Gabet, Y., Rivkin, G., Zick, Y., 2018. Ablation of the mammalian lectin galectin-8 induces bone defects in mice. *FASEB J.* 32, 2366–2380. <https://doi.org/10.1096/fj.201700716R>
- Vinik, Y., Shatz-Azoulay, H., Vivanti, A., Hever, N., Levy, Y., Karmona, R., Brumfeld, V., Baraghithy, S., Attar-Lamdar, M., Boura-Halfon, S., Bab, I., Zick, Y., 2015. The mammalian lectin galectin-8

induces RANKL expression, osteoclastogenesis, and bone mass reduction in mice. *eLife* 4, e05914. <https://doi.org/10.7554/eLife.05914>

Vladoiu, M.C., Labrie, M., St-Pierre, Y., 2014. Intracellular galectins in cancer cells: Potential new targets for therapy (Review). *Int. J. Oncol.* 44, 1001–1014. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2267>

Vokhmyanina, O., Rapoport, E., Ryzhov, I., Korchagina, E., Pazynina, G., Severov, V., Kaltner, H., André, S., Gabius, H., Bovin, N., 2011. Carbohydrate specificity of chicken and human tandem-repeat-type galectins-8 in composition of cells. *Biochem.* 00062979 76, 1185–1192. <https://doi.org/10.1134/S0006297911100130>

von Hundelshausen, P., Wichapong, K., Gabius, H.-J., Mayo, K.H., 2021. The marriage of chemokines and galectins as functional heterodimers. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 8073–8095. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04010-6>

Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., Penninger, J.M., 2006. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol. Med.* 12, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.11.007>

Walsh, J.S., 2015. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surg. Oxf., Orthopaedics I: General Principles* 33, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.10.010>

Wang, H., Hu, Q., Tong, Y., Li, S., Chen, M., Wang, B., Li, H., 2021. LncRNA SOX2-OT regulates miR-192-5p/RAB2A axis and ERK pathway to promote glioblastoma cell growth. *Cell Cycle* 20, 2010–2020. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1965722>

Wang, K., Niu, J., Kim, H., Kolattukudy, P.E., 2011. Osteoclast precursor differentiation by MCPIP via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 360–368. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr021>

Wang, T., Hong, W., 2002. Interorganellar Regulation of Lysosome Positioning by the Golgi Apparatus through Rab34 Interaction with Rab-interacting Lysosomal Protein. *Mol. Biol. Cell* 13, 4317–4332. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-05-0280>

Wang, Y., Zhou, L., Lu, J., Jiang, B., Liu, C., Guo, J., 2020. USP4 function and multifaceted roles in cancer: a possible and potential therapeutic target. *Cancer Cell Int.* 20, 298. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01391-9>

Weinmann, D., Kenn, M., Schmidt, S., Schmidt, K., Walzer, S.M., Kubista, B., Windhager, R., Schreiner, W., Toegel, S., Gabius, H.-J., 2018. Galectin-8 induces functional disease markers in human osteoarthritis and cooperates with galectins-1 and -3. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 4187–4205. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2856-2>

Weng, I.-C., Chen, H.-L., Lo, T.-H., Lin, W.-H., Chen, H.-Y., Hsu, D.K., Liu, F.-T., 2018. Cytosolic galectin-3 and -8 regulate antibacterial autophagy through differential recognition of host glycans on damaged phagosomes. *Glycobiology* 28, 392–405. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy017>

- Wenzel, D.M., Mackay, D.R., Skalicky, J.J., Paine, E.L., Miller, M.S., Ullman, K.S., Sundquist, W.I., n.d. Comprehensive analysis of the human ESCRT-III-MIT domain interactome reveals new cofactors for cytokinetic abscission. *eLife* 11, e77779. <https://doi.org/10.7554/eLife.77779>
- Wermers, R.A., Tiegs, R.D., Atkinson, E.J., Achenbach, S.J., Melton III, L.J., 2008. Morbidity and Mortality Associated With Paget's Disease of Bone: A Population-Based Study. *J. Bone Miner. Res.* 23, 819–825. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080215>
- Werner de Castro, G.R., Buss, Z., Da Rosa, J.S., Fröde, T.S., 2014. Inflammatory cytokines in Paget's disease of bone. *Int. Immunopharmacol.* 18, 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.12.003>
- Weterman, M.A., Wilbrink, M., Janssen, I., Janssen, H.A., van den Berg, E., Fisher, S.E., Craig, I., Geurts van Kessel, A., 1996. Molecular cloning of the papillary renal cell carcinoma-associated translocation (X;1)(p11;q21) breakpoint. *Cytogenet. Cell Genet.* 75, 2–6. <https://doi.org/10.1159/000134444>
- Witwicka, H., Jia, H., Kutikov, A., Reyes-Gutierrez, P., Li, X., Odgren, P.R., 2015. TRAFD1 (FLN29) Interacts with Plekhm1 and Regulates Osteoclast Acidification and Resorption. *PLOS ONE* 10, e0127537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127537>
- Wright, C.J., Smith, C.W.J., Jiggins, C.D., 2022. Alternative splicing as a source of phenotypic diversity. *Nat. Rev. Genet.* 23, 697–710. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00514-4>
- Wu, A., Ye, M., Ma, T., She, Z., Li, R., Shi, H., Yang, L., Yi, M., Li, H., 2023. TBC1D25 alleviates nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting abnormal lipid accumulation and inflammation. *J. Cell. Physiol.* 238, 393–406. <https://doi.org/10.1002/jcp.30934>
- Xing, L., Boyce, B.F., 2005. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun., Vertebrate Skeletal Biology* 328, 709–720. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.072>
- Xu, F., Teitelbaum, S.L., 2013. Osteoclasts: New Insights. *Bone Res.* 1, 11–26. <https://doi.org/10.4248/BR201301003>
- Yamaguchi, Y., Sakai, E., Okamoto, K., Kajiya, H., Okabe, K., Naito, M., Kadowaki, T., Tsukuba, T., 2018. Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 33–48. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2607-9>
- Yamamoto, H., Nishi, N., Shoji, H., Itoh, A., Lu, L.-H., Hirashima, M., Nakamura, T., 2008. Induction of Cell Adhesion by Galectin-8 and its Target Molecules in Jurkat T-Cells. *J. Biochem. (Tokyo)* 143, 311–324. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm223>
- Yang, D.-Q., Feng, S., Chen, W., Zhao, H., Paulson, C., Li, Y.-P., 2012. V-ATPase subunit ATP6AP1 (Ac45) regulates osteoclast differentiation, extracellular acidification, lysosomal trafficking, and protease exocytosis in osteoclast-mediated bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1695–1707. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1623>
- Yoshida, H., Yamashita, S., Teraoka, M., Itoh, A., Nakakita, S., Nishi, N., Kamitori, S., 2012. X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-8 with two carbohydrate

recognition domains. *FEBS J.* 279, 3937–3951. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08753.x>

Zach, F., Polzer, F., Mueller, A., Gessner, A., 2018. p62/sequestosome 1 deficiency accelerates osteoclastogenesis in vitro and leads to Paget's disease-like bone phenotypes in mice. *J. Biol. Chem.* 293, 9530–9541. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002449>

Zamorano, P., Koning, T., Oyanadel, C., Mardones, G.A., Ehrenfeld, P., Boric, M.P., González, A., Soza, A., Sánchez, F.A., 2019. Galectin-8 induces endothelial hyperpermeability through the eNOS pathway involving S-nitrosylation-mediated adherens junction disassembly. *Carcinogenesis* 40, 313–323. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz002>

Zhang, L., Dai, F., Cui, L., Zhou, B., Guo, Y., 2017. Up-regulation of the active form of small GTPase Rab13 promotes macroautophagy in vascular endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1864, 613–624. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.01.003>

Zhang, S., Moussodia, R.-O., Vértessy, S., André, S., Klein, M.L., Gabius, H.-J., Percec, V., 2015. Unraveling functional significance of natural variations of a human galectin by glycodendrimersomes with programmable glycan surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5585–5590.

Zhang, Y., Cui, Y., Wang, L., Han, J., 2020. Autophagy promotes osteoclast podosome disassembly and cell motility through the interaction of kindlin3 with LC3. *Cell. Signal.* 67, 109505. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109505>

Zhang, Z., Ma, T., Fu, Z., Feng, Y., Wang, Z., Tian, S., Liu, Z., Wei, W., Li, X., Chen, J., Zhao, W., 2022. TBC1Domain Family Member 25 deficiency aggravates cerebral ischemia-reperfusion injury via TAK1-JNK/p38 pathway. *J. Neurochem.* 160, 392–411. <https://doi.org/10.1111/jnc.15546>

Zhao, H., Ettala, O., Väänänen, H.K., 2002. Intracellular membrane trafficking pathways in bone-resorbing osteoclasts revealed by cloning and subcellular localization studies of small GTP-binding rab proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1060–1065. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00326-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00326-1)

Zhao, H., Ito, Y., Chappel, J., Andrews, N.W., Teitelbaum, S.L., Ross, F.P., 2008. Synaptotagmin VII Regulates Bone Remodeling by Modulating Osteoclast and Osteoblast Secretion. *Dev. Cell* 14, 914–925. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.022>

Zhao, H., Laitala-Leinonen, T., Parikka, V., Väänänen, H.K., 2001. Downregulation of Small GTPase Rab7 Impairs Osteoclast Polarization and Bone Resorption. *J. Biol. Chem.* 276, 39295–39302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010999200>

Zhao, H., Ross, F.P., 2007. Mechanisms of Osteoclastic Secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1116, 238–244. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.058>

Zhao, H., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L., 2005. Unoccupied $\alpha\beta 3$ Integrin Regulates Osteoclast Apoptosis by Transmitting a Positive Death Signal. *Mol. Endocrinol.* 19, 771–780. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0161>

Zhao, Y.G., Zhang, H., 2019. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J. Cell Biol.* 218, 757–770. <https://doi.org/10.1083/jcb.201810099>

Zhen, Y., Stenmark, H., 2015. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* 128, 3171–3176. <https://doi.org/10.1242/jcs.166074>

Zheng, L., Xia, J., Ge, P., Meng, Y., Li, W., Li, M., Wang, M., Song, C., Fan, Y., Zhou, Y., 2023. The interrelation of galectins and autophagy. *Int. Immunopharmacol.* 120, 110336. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110336>

Zhu, F., Nair, R.R., Fisher, E.M.C., Cunningham, T.J., 2019. Humanising the mouse genome piece by piece. *Nat. Commun.* 10, 1845. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09716-7>

Zhu, L., Tang, Y., Li, X.-Y., Kerk, S.A., Lyssiotis, C.A., Sun, X., Wang, Z., Cho, J.-S., Ma, J., Weiss, S.J., 2023. Proteolytic regulation of a galectin-3/Lrp1 axis controls osteoclast-mediated bone resorption. *J. Cell Biol.* 222, e202206121. <https://doi.org/10.1083/jcb.202206121>

Zhu, S., Chim, S.M., Cheng, T., Ang, E., Ng, B., Lim, B., Chen, K., Qiu, H., Tickner, J., Xu, H., Pavlos, N., Xu, J., 2016. Calmodulin interacts with Rab3D and modulates osteoclastic bone resorption. *Sci. Rep.* 6, 37963. <https://doi.org/10.1038/srep37963>

Zhu, S., Yao, F., Qiu, H., Zhang, G., Xu, H., Xu, J., 2018. Coupling factors and exosomal packaging microRNAs involved in the regulation of bone remodelling. *Biol. Rev.* 93, 469–480. <https://doi.org/10.1111/brv.12353>

Zick, Y., 2022. Galectin-8, cytokines, and the storm. *Biochem. Soc. Trans.* BST20200677. <https://doi.org/10.1042/BST20200677>

Zick, Y., Eisenstein, M., Goren, R.A., Hadari, Y.R., Levy, Y., Ronen, D., 2004. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj. J.* 19, 517–526. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000014081.55445.af>

Zimmermann, E.A., Busse, B., Ritchie, R.O., 2015. The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. *BoneKey Rep.* 4, 743. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2015.112>

ANNEXE I

Tableau supplémentaire 1 : Interactome de TBC1D25

Gène	Protéine	Score	Fonctions en bref
<i>RAB2A</i>	RAB2A	1.00	GTPase; Transport vésiculaire
<i>GABARAP</i>	GABA (A) receptor associated protein	1.00	Autophagie; Réorganisation du cytosquelette
<i>GABARAPL2</i>	GATE-16	1.00	Autophagie; Transport intra-Golgi
<i>IST1</i>	IST1 homolog	1.00	Cytokinèse
<i>MAP2K4*</i>	MAP kinase kinase 4	1.00	Activation de p38 et JNK
<i>ARFIP2</i>	Arfaptin-2	1.00	Autophagie; Régulation de NFKB; Effecteur de ARL1
<i>HCCS</i>	Cytochrome c-type heme lyase	1.00	Production du cytochrome c mature
<i>TOMM70A</i>	Mitochondrial import receptor subunit TOM70	1.00	Import de protéines dans la mitochondrie
<i>YWHAB</i>	14-3-3 protein β/α	1.00	Protéine adaptatrice
<i>ACAD9</i>	Complex I assembly factor ACAD9, mitochondrial	1.00	Phosphorylation oxydative
<i>DKAKD</i>	Dephospho-CoA kinase domain-containing protein	1.00	---
<i>HMOX2</i>	Heme oxygenase	1.00	Catabolisme de l'hème
<i>AASDHPPT</i>	4'-phosphopantetheinyl transferase	1.00	Impliquée dans la biosynthèse de la lysine
<i>DAK</i>	Triokinase/FMN cyclase	0.99	Phosphorylation de dihydroxyacétone
<i>PPID</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	0.98	Translocation de protéines
<i>TMEM55B</i>	Ptlns-4,5-P2 4-Ptase I	0.98	Transport des lysosomes; Assemblage de V-ATPASE
<i>ARFGAP1</i>	Arf GAP3	0.98	GAP de ARF1
<i>ABCB7</i>	ATP-Binding Cassette Transporter 7, mitochondrial	0.98	Transport de l'hème
<i>DHRS7</i>	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	0.98	Métabolise plusieurs composés
<i>NDUFA4</i>	NADH dehydrogenase 1 α subcomplex assembly factor 4	0.96	Phosphorylation oxydative
<i>NAA10</i>	N-alpha-acetyltransferase 10	0.96	Modification post-traductionnelle N-acétylation
<i>ILVBL</i>	2-hydrocyacyl-CoA lyase 2	0.96	Dégradation de la phytosphingosine
<i>RDH14</i>	Retinol dehydrogenase 14	0.95	Activation de la NADP-rétinol déshydrogénase
<i>TBRG4</i>	FAST kinase domain-containing protein 4	0.95	Régulation de l'ARN mitochondriale
<i>SEC61B</i>	Protein transport protein SEC61 subunit beta	0.95	Translocation de protéines
<i>HARS</i>	Histidine-tRNA ligase, cytoplasmic	0.95	Incorporation de l'histidine dans les protéines
<i>BZW2</i>	eIF5-mimic protein 1	0.95	Régulation de l'initiation de la traduction
<i>DUT</i>	2-hydrocyacyl-CoA lyase 2	0.93	Inhibition du récepteur PARR
<i>ARL6PIP5</i>	Retinol dehydrogenase 14	0.92	Régulation négative SLC1A1
<i>NDUFA3</i>	NADH dehydrogenase 1 α subcomplex assembly factor 3	0.91	Phosphorylation oxydative
<i>JAGN1</i>	Protein jagunal homolog 1	0.91	Transport vésiculaire; Traffic de protéines
<i>ACBD3</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	0.91	Traffic du Golgi à la membrane
<i>PPOX</i>	Protoporphyrinogen oxidase	0.91	Biosynthèse de l'hème
<i>RAP1GDS1</i>	Rap1 GGTPase-GDP dissociation stimulator 1	0.91	GEF et GDI de RHO GTPase
<i>GPX1*</i>	Gluthione peroxidase 1	0.91	Dégradation du peroxyde d'hydrogène
<i>RTN3</i>	Reticulon-3	0.91	Production d'amyloïde β
<i>ALG5</i>	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	0.91	Glycosylation
<i>DOLPP1</i>	Dolichyldiphosphatase 1	0.91	Glycosylation

En gras les partenaires connus de TBC1D25; *fonction connue dans l'ostéoclaste; Fonctions selon les bases de données UniProt et GeneCards