



Mécanismes de tri et voies de transport intracellulaire des protéines de la membrane du lysosome

Jason Ecard

► To cite this version:

Jason Ecard. Mécanismes de tri et voies de transport intracellulaire des protéines de la membrane du lysosome. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT: 2019SORUS094 . tel-03141343

HAL Id: tel-03141343

<https://theses.hal.science/tel-03141343>

Submitted on 15 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

École doctorale Complexité du Vivant (ED515)

MÉCANISMES DE TRI ET VOIES DE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DU LYSOSOME

Thèse de doctorat en Sciences

Par **Jason Ecard**

Dirigée par **Gaëlle Boncompain** et **Franck Perez**

Laboratoire ***Dynamique de l'Organisation Intracellulaire***

CNRS-UMR144, Institut Curie

Co-encadrée par **Emmanuelle Vigne**

Laboratoire ***Biologics Research***

Centre de Recherche et Développement, Sanofi-Vitry

Soutenue le 27 septembre 2019, devant un jury composé de :

Catherine L. Jackson	Directrice de recherche Institut Jacques Monod, Paris	Rapportrice
Guillaume van Niel	Directeur de recherche Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris	Rapporteur
Etienne Morel	Directeur de recherche Institut Necker Enfants Malades, Paris	Examineur
Franck Perez	Directeur de recherche Institut Curie, Paris	Directeur de thèse
Joëlle Sobczak-Thépot	Professeure des universités Centre de recherche Saint-Antoine, Paris	Examinatrice
Sylvie Urbé	Équivalent professeure des universités Institute of Translational Medicine, Liverpool	Examinatrice
Gaëlle Boncompain	Chargée de recherche Institut Curie	Invitée
Emmanuelle Vigne	Directrice scientifique Sanofi, Centre R&D, Vitry sur Seine	Invitée

SOMMAIRE

Résumé.....	4
Summary	6
Abréviations.....	8
Introduction.....	9
1 Le transport dans la cellule.....	9
2 La voie de sécrétion.....	10
2.1 L'entrée de la voie de sécrétion : le réticulum endoplasmique.....	11
2.1.1 Structure et fonctions du réticulum endoplasmique	11
2.1.2 La translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique	12
2.1.3 Le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi	13
2.2 L'appareil de Golgi.....	17
2.2.1 Structure et fonctions de l'appareil de Golgi	17
2.2.1 Le transport intra-Golgi	20
2.2.2 Le tri des cargos et la sortie de l'appareil de Golgi	21
2.2.2.1 La clathrine et les adaptateurs de la clathrine dans le tri des cargos	22
2.2.2.2 Le tri médié par agrégation	24
2.2.2.3 Le tri médié par des modifications post-traductionnelles	25
2.2.2.4 La voie de sécrétion constitutive.....	25
2.2.2.5 Les mécanismes de génération et de fission des intermédiaires de transport post-golgiens	26
2.3 Le transport vers la membrane plasmique et l'exocytose	26
2.4 Les techniques d'étude de la voie de sécrétion	27
3 La voie d'endocytose	31
3.1 L'endocytose médiée par la clathrine	32
3.1.1 La formation du puits à clathrine	32
3.1.2 La scission	34
3.1.3 Les phosphoinositides au cœur du processus.....	34
3.1.4 Le démantèlement du manteau.....	35
3.1.5 Les signaux de l'endocytose	35
3.2 La maturation des endosomes	36
3.3 Le tri des cargos dans les endosomes	40
3.3.1 Le recyclage des cargos vers la membrane plasmique	40
3.3.2 La réorientation des cargos vers l'appareil de Golgi	42
3.3.2.1 La réorientation vers l'appareil de Golgi par le complexe rétromère	42

3.3.2.2	La réorientation vers l'appareil de Golgi médié par TIP47 et Rab9.....	43
3.3.2.3	La réorientation vers l'appareil de Golgi médié par AP5	44
3.3.3	La réorientation des cargos vers les compartiments matures de la voie d'endocytose	45
3.3.4	L'incorporation des cargos dans les vésicules intraluminales.....	46
3.4	Les compartiments matures de la voie d'endocytose	47
3.4.1	Différencier lysosome et endosome tardif.....	47
3.4.2	La formation des lysosomes	48
3.4.3	Les endosomes matures et les lysosomes accomplissent de nombreuses fonctions.....	49
3.4.3.1	Les lysosomes dans l'homéostasie de la cellule	49
3.4.3.2	La sécrétion du contenu des MVB et des lysosomes	50
3.4.3.3	Les compartiments associés aux lysosomes.....	51
4	Les voies de trafic des glycoprotéines de la membrane du lysosome ...	51
4.1	Présentation des principales glycoprotéines de la membrane du lysosome	52
4.1.1	Présentation de LAMP1 et LAMP2	52
4.1.1.1	Structures et fonctions des LAMP	52
4.1.1.2	LAMP2 et l'autophagie médiée par des chaperonnes	57
4.1.2	Présentation de LIMP2	58
4.1.3	Présentation de CD63.....	60
4.2	Les voies de trafic des récepteurs au mannose-6-phosphate et des hydrolases lysosomales	63
4.3	Les voies de transport des protéines de la membrane du lysosome	67
4.3.1	La voie de transport de LIMP2.....	67
4.3.2	Les voies de transport d'autres LMP à signal di-leucine	68
4.3.3	Les voies de transport de LAMP1 et LAMP2	68
4.3.4	La voie de transport de CD63	71
4.3.5	La voie de transport de LAP.....	72
4.3.6	D'autres voies menant les LMP aux endosomes	72
4.4	Les LMP à la surface cellulaire : rôles dans les cancers.....	73
	Résultats	76
1	Manuscrit d'article : <i>Lysosomal membrane proteins LAMP1 and LIMP2 are segregated and sorted in the Golgi apparatus independently of their clathrin adaptor binding motif.</i>	78
	Introduction	78
	Results	80
	Discussion.....	84
	Materials and Methods.....	86

References.....	88
Figures	92
2 Réalisation d'un crible d'inactivation de gènes : à la recherche de régulateurs du trafic de LAMP1.....	104
Contexte	104
Réalisation du crible	106
Résultats et discussion	110
Matériels et méthodes.....	114
Remerciements	118
Discussion	119
Les LMP dans le système RUSH.....	119
La voie de trafic des LAMP et de LAP	120
La voie de trafic de LIMP2.....	121
Les rôles de AP1 dans le trafic de LAMP1 et LIMP2	123
Crible d'inactivation génétique pour l'identification de régulateurs du transport de LAMP1.....	124
Bibliographie.....	126

RESUME

La voie d'endocytose se compose d'une succession de compartiments membranaires – les endosomes. Cette voie assure l'internalisation d'éléments extracellulaires et de protéines de la membrane plasmique. La voie d'endocytose converge vers les endolysosomes, résultat de la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes, et site de dégradation des éléments endocytés. En plus de ce rôle de dégradation, les endosomes et lysosomes sont aussi impliqués dans de nombreuses autres fonctions cellulaires, telles que la sécrétion d'exosomes, la réparation de la membrane plasmique, la défense contre certains pathogènes, la perception des niveaux de nutriments intracellulaires, l'autophagie... Ces fonctions dépendent des hydrolases présentes dans la lumière des (endo)lysosomes, mais aussi des protéines insérées dans leur membrane (les LMP, pour *Lysosomal Membrane Proteins*). De façon intéressante, certaines LMP présentent des localisations intracellulaires anormales dans certains cancers. Par exemple, la glycoprotéine LAMP1 s'avère surexposée à la surface cellulaire dans de nombreuses lignées cancéreuses. Elle y joue plusieurs rôles dans l'agressivité tumorale, en étant notamment impliquée dans la migration cellulaire et la résistance au système immunitaire.

Les voies de transport impliquées dans la localisation des LMP ne sont pas bien comprises. Ces protéines sont transloquées dans le réticulum endoplasmique puis transportées vers l'appareil de Golgi. De là, deux voies ont été décrites. Dans la voie dite « directe », les LMP sont directement transportées de l'appareil de Golgi vers les endosomes. Dans la voie dite « indirecte », les LMP sont envoyées à la membrane plasmique, d'où elles accèdent aux endosomes par endocytose. Cette divergence suggère l'existence de mécanismes de tri des LMP au niveau de l'appareil de Golgi.

Nous avons analysé le transport de plusieurs LMP le long de la voie de sécrétion. Pour ce faire, nous les avons incorporées dans le système RUSH (pour *Retention Using Selective Hooks*). Cette technologie permet la synchronisation de la sécrétion d'une protéine d'intérêt. Nous avons démontré que LAMP1 et LIMP2 sont ségrégées et triées au niveau de l'appareil de Golgi. Nous avons montré que LAMP1 est délivrée à la membrane plasmique et, en conséquence, suit une voie indirecte vers les lysosomes. LIMP2 est supposée suivre une voie directe. Nous avons montré qu'au niveau de l'appareil de Golgi, LIMP2 est concentrée dans des structures dépourvues de clathrine qui assurent son export de l'appareil de Golgi. Fait

important, ce phénomène de tri est indépendant des signaux de recrutement d'adaptateurs à la clathrine portés par LAMP1 et LIMP2.

Dans le but d'identifier des régulateurs du trafic des LMP ainsi que des mécanismes impliqués dans la délocalisation de LAMP1 dans les cancers, nous avons réalisé un criblage génétique d'inactivation de gènes. Celui-ci était basé sur la technologie CRISPR-Cas9 et permettait le ciblage de la quasi-totalité du génome. La méthode a été pensée de sorte à identifier des gènes dont l'inactivation influe sur la présence de LAMP1 à la surface cellulaire. La réalisation de ce criblage a permis d'identifier de nombreux gènes candidats.

Mots clefs : trafic intracellulaire ; protéines de la membrane du lysosome ; appareil de Golgi ; CRISPR-Cas9.

SUMMARY

The endocytic pathway is composed of an array of membrane-bound organelles – the endosomes. This pathway mediates the internalisation of extracellular materials as well as cell surface proteins and ends in endolysosomes. Endolysosomes result from the fusion between late endosomes and lysosomes and are the site of degradation of endocytosed elements. These organelles are also involved in multiple other cell functions, including exosome secretion, plasma membrane repair, defence against pathogen, nutrient sensing, autophagy... These functions rely on luminal hydrolases but also on proteins inserted in the membrane of late endosomes and lysosomes, generally referred as lysosomal membrane proteins (LMPs). Interestingly, some of these LMPs display altered intracellular localisation in some cancers. For example, LAMP1 was shown to be overexposed at the cell surface in multiple cancer cell lines. At the cell surface, this LMP was shown to be involved in cancers aggressiveness through multiple mechanisms including influencing cell migration abilities or increasing resistance to the immune system.

The trafficking pathways involved in the intracellular localisation of the LMPs are not well understood. They enter the secretory pathway at the level of the endoplasmic reticulum and are transported to the Golgi apparatus. From there, two pathways were described. In the “direct pathway”, LMPs are directly delivered from the Golgi apparatus to endosomes. Conversely, in the “indirect pathway”, endosomal proteins are targeted to the plasma membrane and enter the endosomes by endocytosis. This divergence suggests the existence of mechanisms for the sorting of LMPs at the level of the Golgi apparatus.

We studied the trafficking of several LMPs along the secretory pathway. To do so, we incorporated them into the Retention Using Selective Hooks (RUSH) system. This tool makes it possible to synchronize the traffic along the secretory pathway of a protein of interest. We demonstrated that the two LMPs LAMP1 and LIMP2 are segregated and sorted at the Golgi apparatus. We show that LAMP1 is targeted to the cell surface and therefore follows an indirect pathway to lysosomes. LIMP2 is thought to follow a direct pathway. We show that at the Golgi apparatus, this protein is concentrated into clathrin-free structures which mediate its Golgi exit. Importantly, this sorting at the Golgi apparatus were independent on the adaptor binding signals carried by LAMP1 and LIMP2.

In order to identify LMPs trafficking regulators as well as mechanisms involved in LAMP1 mislocalisation in cancers, we also performed a virtually genome-wide genetic screen based on the CRISPR-Cas9 technology. We were searching for gene whose inactivation influences LAMP1 presence at the cell surface and were able to identify numerous candidates.

Keywords: intracellular trafficking; lysosomal membrane proteins; Golgi apparatus; CRISPR-Cas9.

ABRÉVIATIONS

AMP :	Adénosine MonoPhosphate
ARN :	Acide RiboNucléique
ATP :	Adénosine TriPhosphate
CGN :	<i>Cis-Golgi Network</i>
CLEM:	<i>Correlative Light-Electron Microscopy</i>
CMA :	<i>Chaperone-Mediated Autophagy</i>
COPI/II :	<i>Coat Protein complex I/II</i>
ERES :	<i>Endoplasmic Reticulum Exit Site</i>
ERGIC :	<i>Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment</i>
GAP :	<i>GTPase-Activating Proteins</i>
GDI :	<i>Guanine Dissociation Inhibitor</i>
GDP :	Guanosine DiPhosphate
GEF :	<i>Guanine Exchange Factor</i>
GFP :	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Glc :	Glucose
GlcNAc :	N-acétylglucosamine
GPCR :	<i>G protein-coupled receptor</i>
GPI :	GlycosylPhosphatidyInositol
GTP :	Guanosine TriPhosphate
ILV :	<i>IntraLuminal Vesicles</i>
LMP :	<i>Lysosomal Membrane Protein</i>
LRO :	<i>Lysosome-Related Organelle</i>
Man :	Mannose
MIIC :	<i>Major histocompatibility complex class II Compartment</i>
MPR :	Mannose-6-Phosphate Receptor
MVB :	<i>MultiVesicular Bodies</i>
NK :	<i>Natural Killer</i>
PI(3,4)P ₂ :	PhosphatidyInositol-3,4-bisPhosphate
PI(3,4,5)P ₃ :	PhosphatidyInositol-3,4,5-triPhosphate
PI(3,5)P ₂ :	PhosphatidyInositol-3,5-bisPhosphate
PI(4,5)P ₂ :	PhosphatidyInositol-4,5-bisPhosphate
PI3P :	PhosphatidyInositol-3-Phosphate
PI4P :	PhosphatidyInositol-4-Phosphate
PI5P :	PhosphatidyInositol-5-Phosphate
RE :	Réticulum Endoplasmique
RUSH :	<i>Retention Using Selective Hooks</i>
SNARE :	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Proteins Receptor</i>
TEM :	<i>Tetraspanin-Enriched Microdomain</i>
TGN :	<i>Trans Golgi Network</i>
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

1 Le transport dans la cellule

La cellule est régulièrement définie comme « l'unité structurale et fonctionnelle du vivant ». Mais le vivant est un concept flou et tenter de le définir ne peut se passer d'une dimension philosophique. Par ailleurs, créer ainsi un lien de réciprocité entre la cellule et le vivant n'est peut-être pas souhaitable. Cela bride la réflexion lors de questionnements sur la nature, vivante ou non, de certains objets. De tels questionnements ont par exemple eu lieu récemment au sujet des virus (Forterre, 2016).

Pour un biologiste cellulaire, la cellule est un volume délimité par une membrane et qui renferme un microcosme d'une complexité fascinante. Au sein de celui-ci se déroule toute une myriade de réactions en chaîne aboutissant à divers phénomènes (synthèse/dégradation de molécules, assemblage de structures moléculaires complexes, conversions d'énergies...). Ces phénomènes complexes sont organisés dans l'espace et le temps et permettent à la cellule de se mouvoir, d'échanger avec le milieu extérieur (extracellulaire) ou encore de se répliquer.

Classiquement, les organismes cellulaires sont classés en deux groupes : les procaryotes et les eucaryotes. Les eucaryotes sont des organismes dont le matériel génétique est séparé du reste de la cellule par une enveloppe membranaire. Ces organismes peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. Ce groupe comprend les animaux, les plantes, les champignons, les protozoaires et les chromistes. Le groupe des procaryotes comprend les bactéries et les archées. Ces organismes sont unicellulaires et leur matériel génétique n'est pas séparé du reste de la cellule par une membrane.

Les cellules eucaryotes présentent une complexité interne supérieure avec la présence de plusieurs compartiments intracellulaires délimités par une membrane (**Figure 1**). Cette compartimentalisation de la cellule permet de potentialiser les réactions biochimiques en concentrant ensemble les substrats et les enzymes et en séparant les réactions antagonistes.

Aucun compartiment n'est isolé, ils sont tous capables d'échanges avec d'autres structures intracellulaires. La notion de « trafic intracellulaire » fait référence à tous les échanges entre différents compartiments. Dans ce manuscrit, le terme « trafic » fera plus

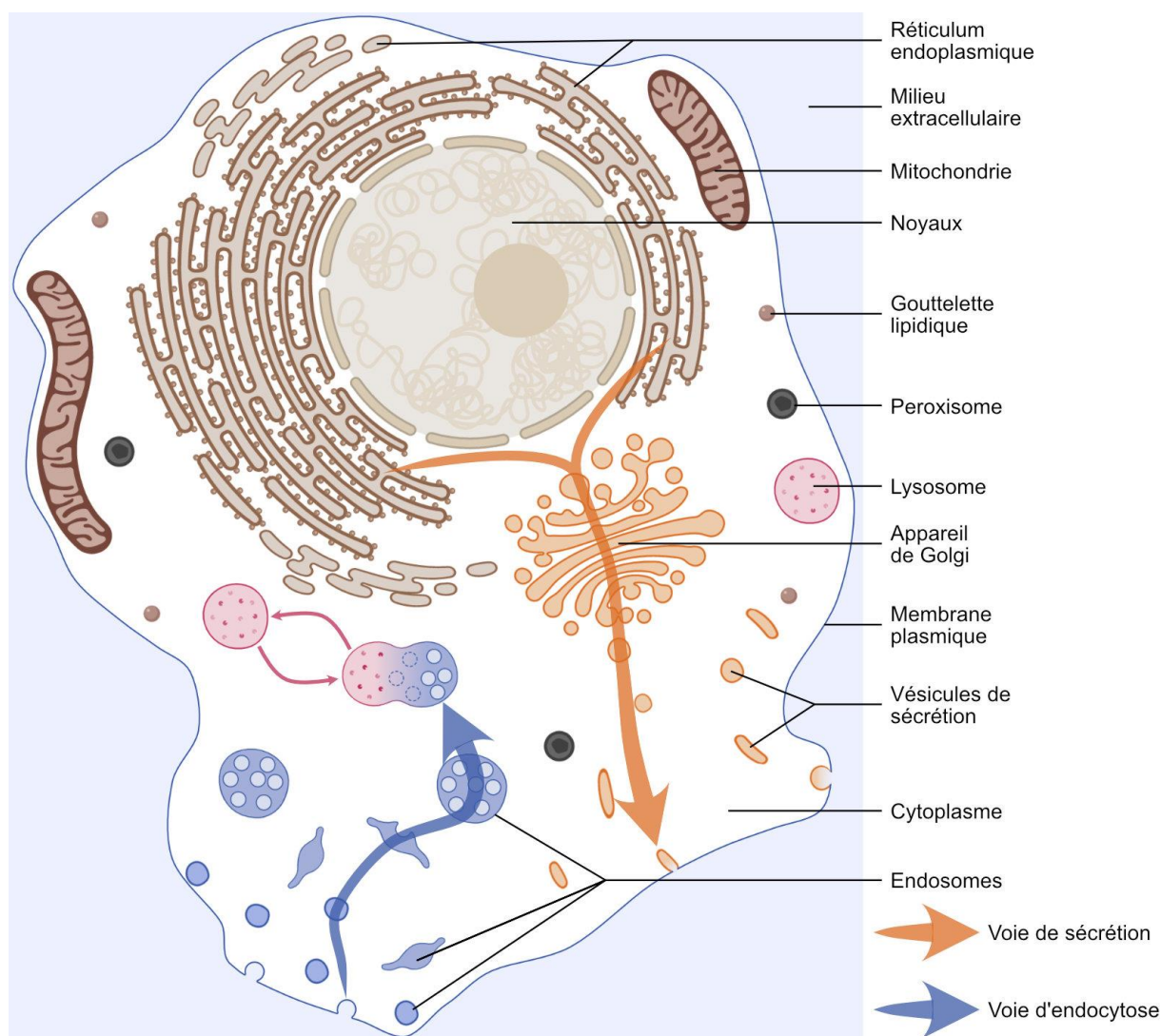


Figure 1. **La cellule animale est compartimentée.** Représentation simplifiée de différents compartiments intracellulaires membranaires (ou délimités par une monocouche de phospholipides dans le cas des gouttelettes lipidiques) d'une cellule animale. Schéma dessiné avec l'aide de BioRender (<https://biorender.com/>).

spécifiquement référence à des échanges médiés par l'intermédiaire de vésicules ou autres intermédiaires membranaires.

Plusieurs compartiments participent à des échanges avec le milieu extérieur. Ceux qui collaborent dans le processus de sécrétion sont regroupés sous l'appellation de « voie de sécrétion » (**Figure 1**). Ceux qui collaborent dans le processus d'internalisation d'éléments du milieu extérieur définissent la « voie d'endocytose ».

2 La voie de sécrétion

La sécrétion joue un rôle majeur dans la biologie de la cellule et des organismes en permettant notamment la communication entre cellules, la dissémination de nutriments dans l'organisme, l'organisation du milieu extracellulaire et l'adhérence cellulaire.

Dans les cellules de mammifères, environ 30% des protéines sont incorporées dans la voie de sécrétion. L'entrée des protéines dans cette voie se fait au niveau du réticulum endoplasmique. Les cargos sont ensuite transportés vers l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de vésicules. L'appareil de Golgi organise alors le tri des différents cargos et les expédie vers leur compartiment final, que ce soit le milieu extracellulaire, la membrane plasmique basolatérale, la membrane plasmique apicale, les granules de sécrétion ou les endosomes.

2.1 L'entrée de la voie de sécrétion : le réticulum endoplasmique

2.1.1 Structure et fonctions du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) représente le point d'entrée de la voie de sécrétion. Il se compose de tubules membranaires interconnectés qui forment un réseau hétérogène associé à l'enveloppe nucléaire et qui s'étend dans toute la cellule (**Figure 2** ; Nixon-Abell *et al.*, 2016; Schwarz et Blower, 2016). Cette extension dans toute la cellule est médiée par l'interactions avec le cytosquelette de microtubules via, notamment, des protéines résidentes du RE telles que STIM1 (pour *Stromal Interaction Molecule 1*) ou CLIMP-63 (pour *Cytoskeleton-Linking Membrane Protein 63* ; Vedrenne, Klopfenstein et Hauri, 2005; Grigoriev *et al.*, 2008). Deux types de RE, rugueux ou lisse, sont distingués en fonction de la présence de ribosomes ancrés sur leur membrane.

En plus de son rôle dans la voie de sécrétion, le réticulum endoplasmique est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. Il est l'un des lieux principaux de la biosynthèse de lipides, notamment des phospholipides membranaires et du cholestérol (Schwarz et Blower,

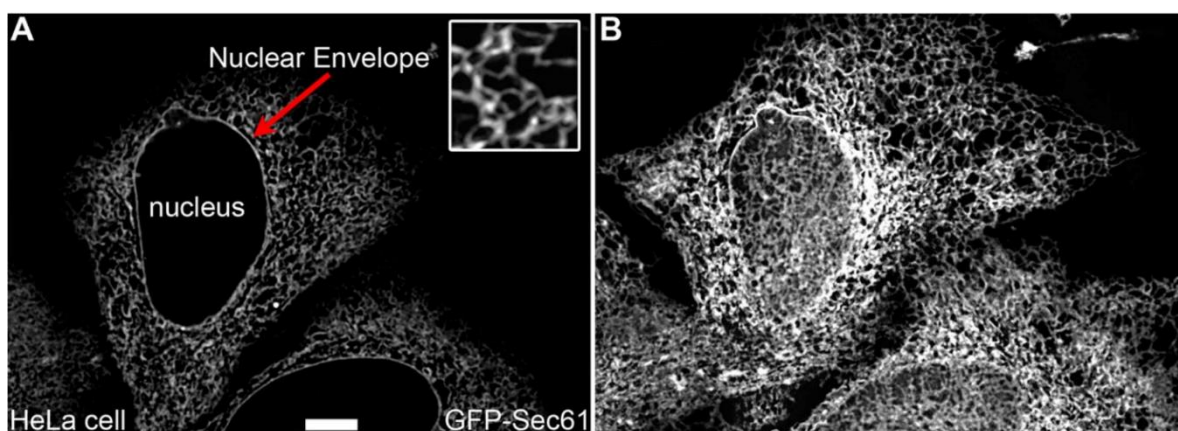


Figure 2. **Structure du réticulum endoplasmique.** (a) Images confocales de cellules HeLa exprimant GFP-Sec61. L'encart représente un grossissement x3. Barre d'échelle : 10 µm. (b) Mêmes cellules que dans (a) acquises à un plan confocal plus proche de la lamelle, permettant d'apprécier le réseau de RE périphérique. Schwarz et Blower, 2016.

2016). Il joue aussi le rôle important de stock de Ca^{2+} , sa concentration dans la lumière du RE étant de 1000 à 8000 fois supérieure que dans le cytoplasme (Schwarz et Blower, 2016). Le relargage de Ca^{2+} dans le cytoplasme par le RE régule de nombreux mécanismes cellulaires et voies de signalisation (Clapham, 2007). Le RE est aussi impliqué dans la biologie des autres organites via des contacts directs (Eden, 2016). Il régule par exemple les événements de fission des mitochondries (Kraus et Ryan, 2017), le positionnement des endosomes (Raiborg *et al.*, 2015), la formation des autophagosomes (Kotani *et al.*, 2018), l'expansion de la membrane plasmique (Petkovic *et al.*, 2014)...

2.1.2 La translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique

La plupart des protéines incorporées dans le RE possèdent un peptide signal hydrophobe. Lors de la traduction des ARN messagers codant pour ces protéines, le peptide signal est reconnu par la protéine SRP (pour *Signal Recognition Particle*). La SRP permet l'ancrage du ribosome à la membrane du RE en s'associant au récepteur de la SRP (Schwarz et Blower, 2016). La traduction est poursuivie sur les membranes du RE et la protéine en cours de synthèse est transloquée vers la lumière du RE grâce à un complexe protéique transmembranaire dédié : le translocon (Rapoport, 2007; Jan, Williams et Weissman, 2014). Les protéines qui possèdent des domaines transmembranaires sont insérées dans la membrane au cours de la translocation (von Heijne, 2006). Le peptide signal, hydrophobe, peut constituer un domaine transmembranaire ou alors être clivé dans la lumière du RE (Schwarz et Blower, 2016). Les protéines ne possédant qu'un seul domaine transmembranaire et s'insérant dans le sens de leur translocation (extrémité N-terminale luminale) sont appelées protéines transmembranaires de type I. À l'inverse, les protéines avec un seul domaine transmembranaire et l'extrémité N-terminale cytosolique sont de type II. Les protéines dotées de plusieurs domaines transmembranaires sont de type III.

Le RE prend aussi en charge le repliement des protéines transloquées grâce à un ensemble de protéines chaperonnes (Braakman et Hebert, 2013). Le repliement est également assuré par l'ajout de N-glycosylations sur les régions luminales des cargos. Cette modification est catalysée par le complexe oligosaccharyltransférase (OST) qui catalyse la liaison d'oligosaccharides préassemblés (composés de 3 glucoses, 9 mannoses et 2 N-acétylglucosamines ; $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sur certains résidus (Braakman and Hebert, 2013). Le

RE dispose aussi de systèmes de dégradation pour éliminer les protéines mal repliées. Parmi ceux-ci, le système ERAD (pour *ER-Associated Degradation*) permet l'extraction de protéines mal repliées hors du RE et leur dégradation par la protéasome (Ruggiano, Foresti et Carvalho, 2014).

2.1.3 Le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi

Le transport de cargos du RE vers l'appareil de Golgi est médié par la formation de vésicules recouvertes d'un manteau COPII (pour *Coat Protein complex II* ; Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013). La formation de ces vésicules est concentrée dans des régions particulières du RE : les sites d'export du RE (ERES, pour *ER Exit Site* ; Bannykh, Rowe et Balch, 1996). Les mécanismes de formation des vésicules COPII, initialement identifiés chez *Saccharomyces cerevisiae* mais conservés chez les mammifères (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013), requièrent le recrutement séquentiel de plusieurs facteurs sur la membrane du RE. Le recrutement de la protéine Sar1 sur les membranes du RE participe à l'initiation du processus (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013).

Sar1 fait partie de la superfamille de la protéine Ras. Les protéines de cette superfamille sont des petites protéines G (aussi appelées petites GTPases) impliquées dans la régulation de diverses fonctions cellulaires (Rojas *et al.*, 2012). Les petites protéines G alternent entre deux états : 1) GTPase liée au GTP, active et capable de recruter des effecteurs et 2) GTPase liée au GDP, inactive (**Figure 3**). L'alternance est médiée par deux principales familles de régulateurs. Les facteurs d'échange du GDP (GEF, pour *Guanine Exchange Factor*) catalysent la dissociation de la petite protéine G du GDP qui sera alors remplacé par du GTP, plus abondant dans le cytoplasme. Les protéines activatrices de l'activité GTPase (GAP, pour *GTPase-Activating*

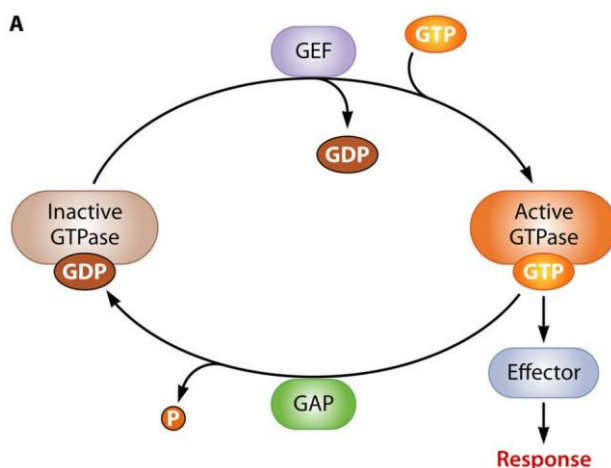


Figure 3. **Mode de régulation des petites GTPases.** GEF : *Guanine Exchange Factor*, GAP : *GTPases-Activating Protein*. Schmolli *et al.*, 2016.

Proteins) accroissent l'activité GTPase des petites protéines G, ce qui entraîne l'hydrolyse du GTP et, en conséquence, l'inactivation des petites GTPases (**Figure 3** ; Cherfils et Zeghouf, 2013).

Sar1 est recrutée et activée sur la membrane du réticulum endoplasmique grâce à sa GEF : la protéine membranaire du RE Sec12 (Nakano, Brada et Schekman, 1988; Barlowe et Schekman, 1993). Sar1-GTP recrute alors l'hétérodimère Sec23-Sec24 qui constitue la couche interne du manteau COPII (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013). Sec24 permet le recrutement des cargos par interaction avec de divers motifs protéiques cytosoliques (Miller *et al.*, 2002, 2003; Mossessova, Bickford et Goldberg, 2003; Mancias et Goldberg, 2008). Une seconde couche du manteau COPII, composée de Sec13 et Sec31, est recrutée par Sec23-Sec24. Ensemble, ces protéines permettent la déformation de la membrane du RE et la génération d'une vésicule (**Figure 4** ; Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013). La protéine Sec16 a aussi été impliquée dans ce phénomène, mais son rôle n'est pas clair. Elle pourrait fonctionner dans l'assemblage du manteau COPII et/ou comme régulateur négatif de l'activité GTPase de Sar1 pour maintenir celle-ci active à la membrane du RE (Sprangers et Rabouille, 2015).

Ces mécanismes de formation des vésicules COPII s'adaptent aussi à des cargos particuliers. C'est par exemple le cas lors de la sécrétion du collagène VII, de taille supérieure à celle des vésicules COPII canoniques. Le collagène VII peut faire appel à des protéines supplémentaires telles que TANGO1 (pour *Transport And Golgi Organization 1*) et cTAGE5

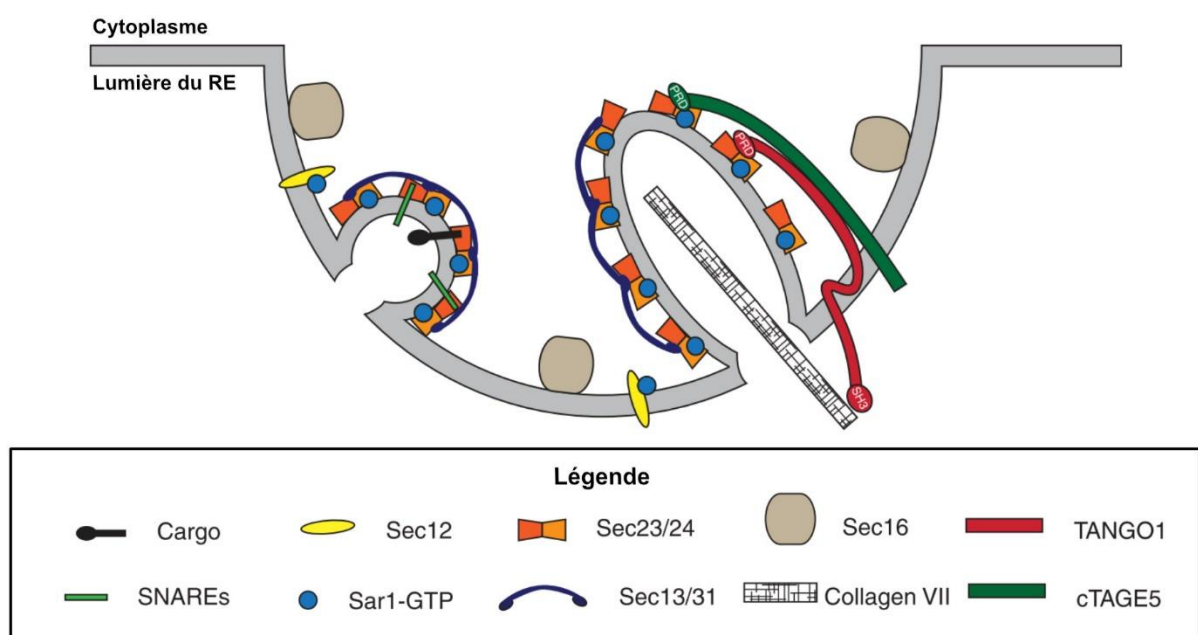


Figure 4. **Formation des vésicules COPII.** Adapté d'après Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013.

(*cutaneous T-cell lymphoma-associated Antigen 5*). Ces protéines lient le collagène VII ainsi que Sec23-Sec24 et déforment la vésicule en formation de sorte à ce que celle-ci s'adaptent à la taille du collagène (**Figure 4** ; Saito *et al.*, 2009, 2011; Malhotra et Erismann, 2011).

Après formation, les vésicules COPII sont délivrées à l'appareil de Golgi via un compartiment intermédiaire à l'interface entre l'appareil de Golgi et le RE et dont la nature n'est pas claire : l'ERGIC (pour *ER-Golgi Intermediate Compartment* ; Girod *et al.*, 1999). Les événements d'amarrage et de fusion des vésicules COPII au niveau de l'ERGIC et du *cis*-Golgi ne sont pas parfaitement compris et semblent impliquer la petite protéine G Rab1.

Les protéines Rab sont une famille de petites protéines G appartenant, tout comme Sar1, à la superfamille de la protéine Ras (Rojas *et al.*, 2012). Les Rab, étant généralement prénylées par un ou deux groupements géranylgeranyl, sont capables de s'associer avec les membranes intracellulaires (Stenmark, 2009). Cette association à la membrane est régulée par l'état d'activation de la Rab. Associées au GDP, les Rab sont généralement dissociées de la membrane et maintenues solubles dans le cytosol par l'interaction avec des protéines GDI (pour *Guanine Dissociation Inhibitor* ; Stenmark, 2009). Les protéines Rab sont des régulateurs majeurs du trafic intracellulaire agissant principalement en recrutant et régulant toute une gamme d'effecteurs (Wandinger-Ness et Zerial, 2014). Parmi les différents types d'effecteurs recrutés par les Rab, il est notamment possible de citer, entre autres, les moteurs moléculaires (Jordens *et al.*, 2001; Miserey-Lenkei *et al.*, 2010; Echard *et al.*, 2013; Delevoye *et al.*, 2014), les protéines d'amarrage (Simonsen *et al.*, 1998; Christoforidis, McBride, *et al.*, 1999; Wurmser *et al.*, 2000; Gomi *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2006), les protéines de remodelage des lipides (Christoforidis, Miaczynska, *et al.*, 1999; Dambournet *et al.*, 2011), des régulateurs des protéines SNARE (Nielsen *et al.*, 2000; Gomi *et al.*, 2005), et des régulateurs du cytosquelette d'actine (Grigoriev *et al.*, 2011; Frémont *et al.*, 2017). Chez les mammifères, il existe plus d'une soixantaine de protéines Rab, distribuées sur les différentes membranes cellulaires (**Figure 5** ; Stenmark, 2009). Elles comptent ainsi parmi les facteurs responsables de la définition et du maintien de l'identité des différentes membranes intracellulaires (Behnia et Munro, 2005; Stenmark, 2009; Pfeffer, 2013).

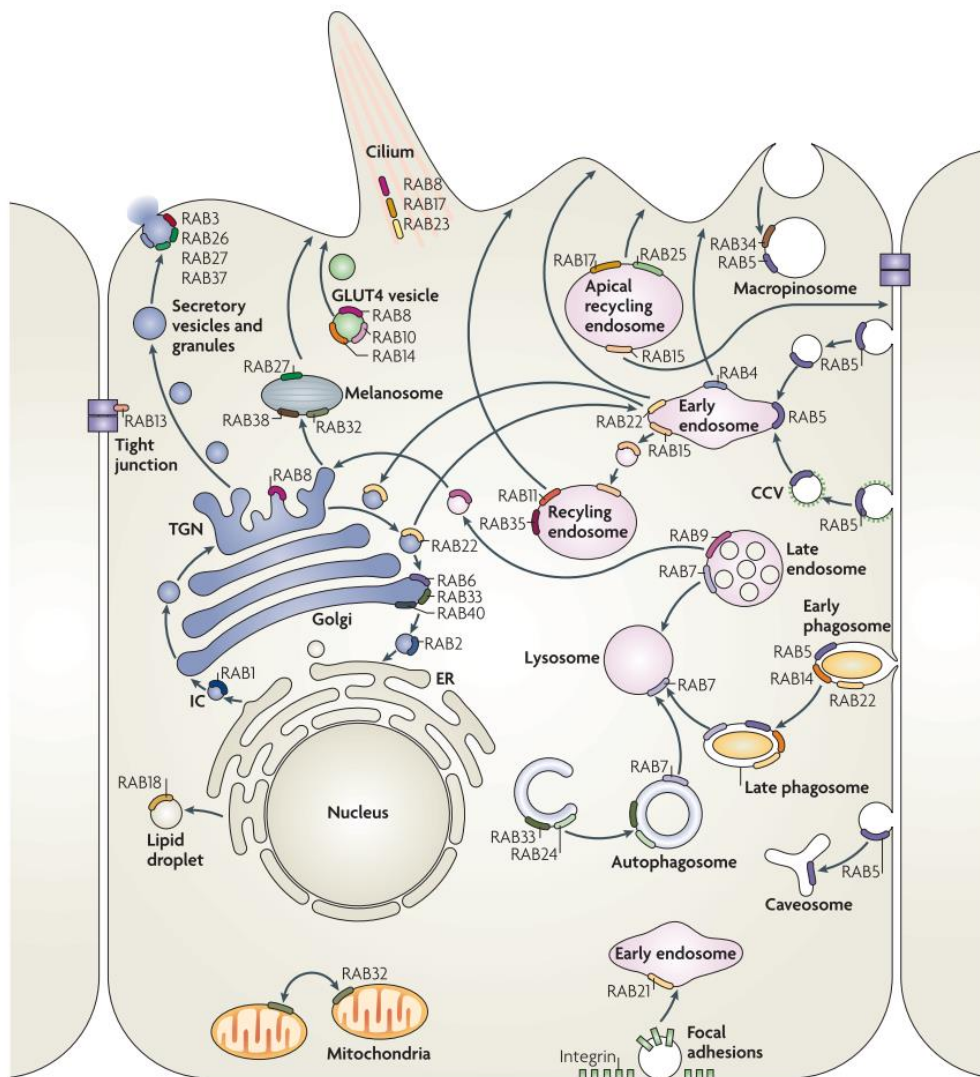


Figure 5. **Distribution des protéines Rab sur les membranes intracellulaires.** Les protéines Rab, dispersées sur les différentes membranes intracellulaires, régulent les différentes voies de trafic et de formation des compartiments et participent à définir l'identité des membranes. Stenmark, 2009.

Les complexes TRAPPI/II, GEF de Rab1, sont recrutés sur les vésicules COPII par Sec23 (Yu *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2007), et recrutent à leur tour Rab1 sur ces membranes (Barrowman *et al.*, 2010). Rab1 interagit avec la protéine d'amarrage du *cis*-Golgi GM130 (pour *Golgi Matrix protein of 130 kDa*) ainsi qu'avec la protéine cytoplasmique homodimérique p115 (Allan, Moyer et Balch, 2000; Moyer *et al.*, 2001). p115 interagit elle aussi avec GM130 (Nakamura *et al.*, 1997) et avec des protéines SNARE dont elle facilite l'assemblage (Allan, Moyer et Balch, 2000; Shorter *et al.*, 2002). En conséquence, il a ainsi été proposé que Rab1, en raison de son association à GM130 et du recrutement de p115, puisse médier l'amarrage des vésicules COPII à la face *cis* de l'appareil de Golgi ainsi que leur fusion (Lord, Ferro-Novick et Miller, 2013).

2.2 L'appareil de Golgi

2.2.1 Structure et fonctions de l'appareil de Golgi

À proximité du noyau de la plupart des cellules de mammifères existent plusieurs compartiments membranaires aplatis (appelés « citernes ») et empilés les uns sur les autres, formant une structure caractéristique : l'appareil de Golgi (**Figure 6** ; Klumperman, 2011). L'ancrage des citernes entre elles est réalisé grâce à l'intervention des protéines GRASP55 (pour *Golgi Reassembly And Stacking Protein 55*) et GRASP65. Ces deux protéines, cytoplasmiques, s'associent à la membrane golgienne grâce à leur myristoylation. Leur oligomérisation médie l'association des citernes entre elles (Rabouille et Linstedt, 2016). De plus, la face cytosolique des membranes golgiennes dispose d'un dense réseau de protéine :

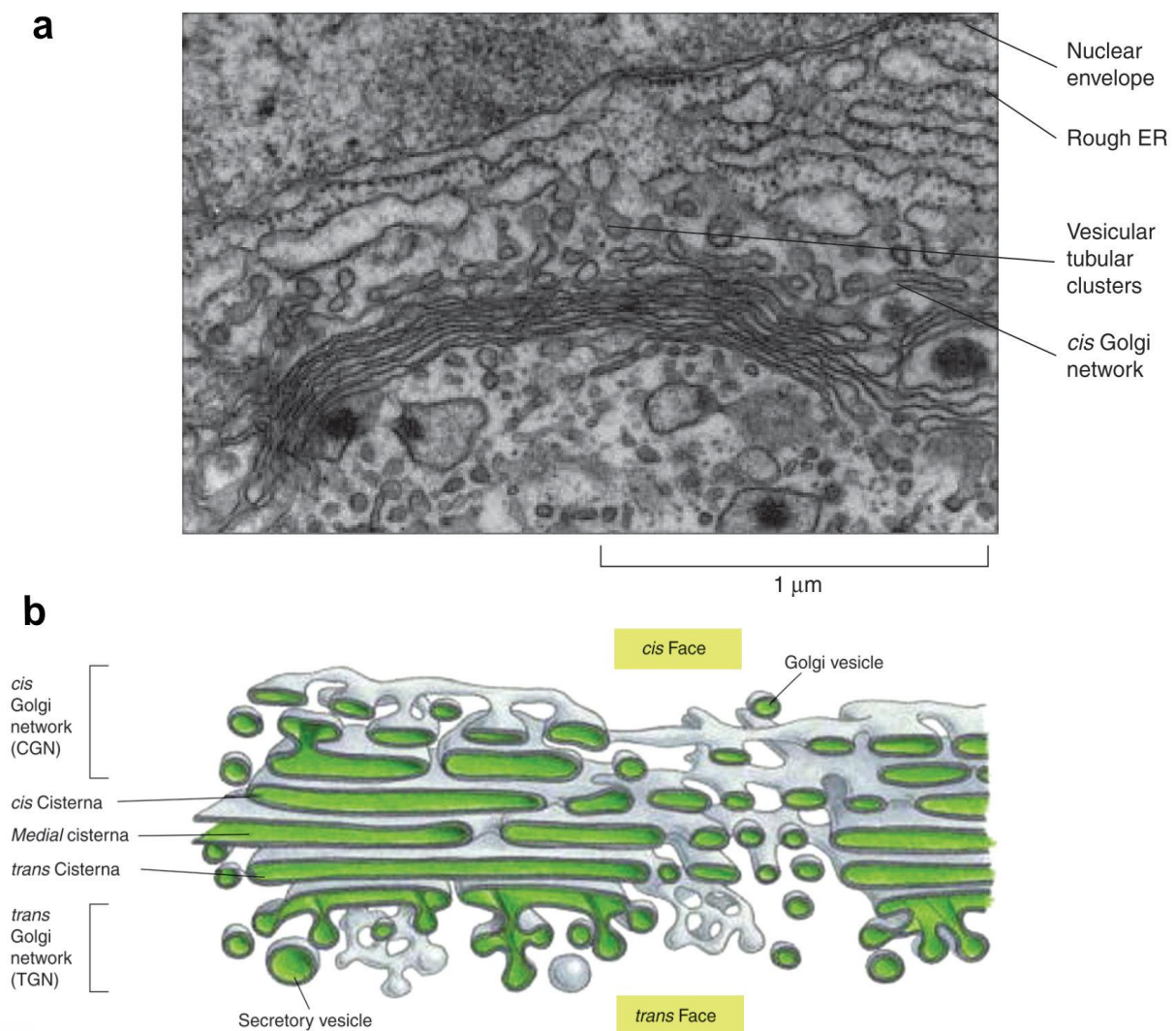


Figure 6. **Structure de l'appareil de Golgi.** (a) Image en microscopie électronique à transmission d'un appareil de Golgi de cellule animale. (b) Reconstruction tridimensionnelle de l'appareil de Golgi d'une cellule sécrétrice animale dessinée à partir de photographies de microscopie électronique. Luini et Parashuraman, 2015.

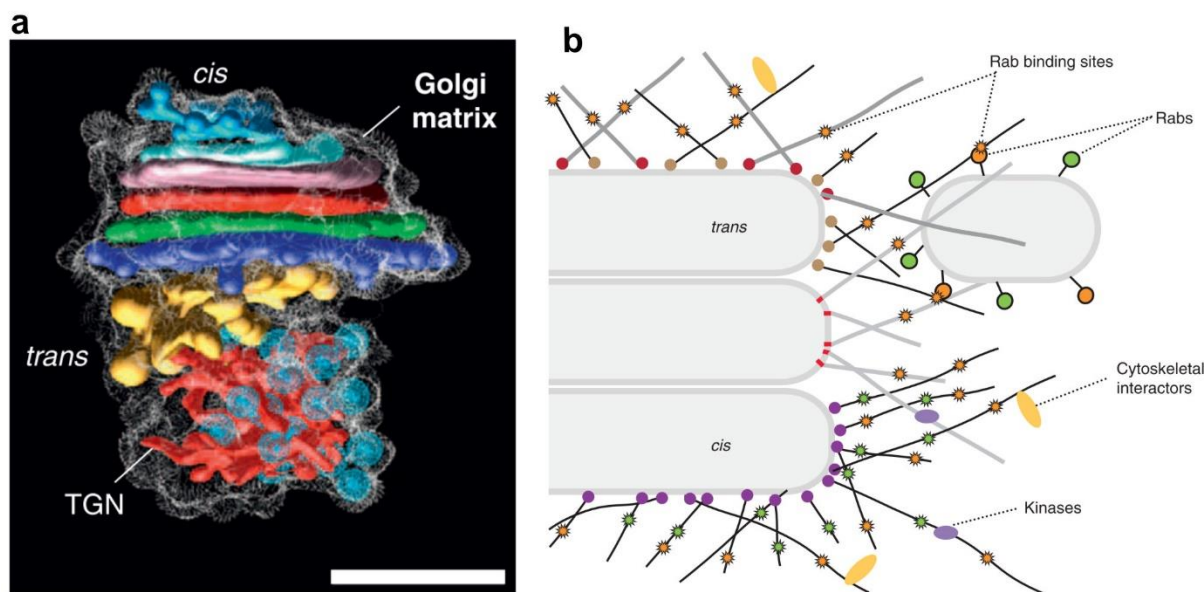


Figure 7. **La matrice golgienne.** (a) Modélisation d'un appareil de Golgi d'*Arabidopsis thaliana* à partir d'images de tomographie électronique. La structure périphérique blanche représente la matrice golgienne. Les différentes citernes sont différenciées par différentes couleurs. Les sphères bleues représentent des vésicules à clathrine. Barre d'échelle : 500 nm. Lowe, 2011. (b) Représentation schématisée de la matrice golgienne et de l'amarrage au Golgi par les golgines. Munro *et al.*, 2013.

la matrice golgienne. Celle-ci se compose de longues protéines à domaines super-enroulés (*coiled-coil*) – les golgines – qui fonctionnent dans l'amarrage des vésicules à destination de l'appareil de Golgi mais aussi dans le maintien de la structure de l'organite (**Figure 7** ; Barr et Short, 2003; Gillingham et Munro, 2016).

Les membranes de l'appareil de Golgi sont enrichies en phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P ; Schink, Tan et Stenmark, 2016). Les phosphoinositides sont des dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol (**Figure 8a**). Ils sont enrichis dans le feuillet cytosolique de la membrane de multiples compartiments (De Matteis et Godi, 2004). Sept phosphoinositides différents de par leur schéma de phosphorylation de l'inositol ont été décrits chez les animaux (PI3P, PI4P, PI5P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃). Chacune de ces formes présente une distribution sur les membranes intracellulaire qui lui est propre (**Figure 8b** ; Schink, Tan et Stenmark, 2016). Comme les protéines Rab, ces composés jouent un rôle majeur dans l'établissement de l'identité des membranes (Behnia et Munro, 2005). À l'image des Rab, ces lipides fonctionnent comme des plateformes de recrutement (Behnia et Munro, 2005). À l'appareil de Golgi, le PI4P recrute notamment le complexe adaptateur de la clathrine AP1 (voir **2.2.2 Le tri des cargos et la sortie de l'appareil de Golgi** ; Wang *et al.*, 2003) et les protéines FAPP1 et FAPP2 impliqués dans la fission au TGN (Godi *et al.*, 2004).

L'appareil de Golgi est polarisé. Cette polarité est caractérisée par des populations d'enzymes distinctes au sein des différentes citernes (Dunphy et Rothman, 1985; Kleene et Berger, 1993). Cette polarité s'illustre aussi par le transport vectoriel des cargos sécrétés qui traversent l'appareil de Golgi (Boncompain et Perez, 2013b). La face *cis* et le réseau *cis*-golgien (CGN, pour *Cis-Golgi Network*), zone d'entrée pour les protéines sécrétées, sont généralement orientés vers le centre cellulaire. La face *trans* et le réseau *trans*-Golgi (TGN, pour *Trans-Golgi Network*), zone d'export des protéines sécrétées, sont généralement orientés vers la périphérie (voir **Figure 6** ; Klumperman, 2011).

L'appareil de Golgi constitue une plateforme de tri au cœur de la voie de sécrétion, orientant les cargos qui l'empruntent vers leur destination finale (Boncompain et Weigel, 2018). Cet organe assure aussi toute une éventail de fonctions. L'appareil de Golgi fonctionne aussi dans la synthèse et la modification de lipides, et plus particulièrement des céramides (Futerman et Riezman, 2005). Il assure aussi le remodelage et la complexification des N-glycans ainsi que l'ajout d'O-glycans sur les protéines (Stanley, 2011). Il participe à la maturation de certaines protéines par protéolyse via des protéases luminales comme la furine, S1P (*site 1 protease*) ou S2P (Wise *et al.*, 1990; Rawson *et al.*, 1997; Seidah *et al.*, 1999). De plus, l'appareil de Golgi fonctionne aussi comme un centre organisateur des microtubules

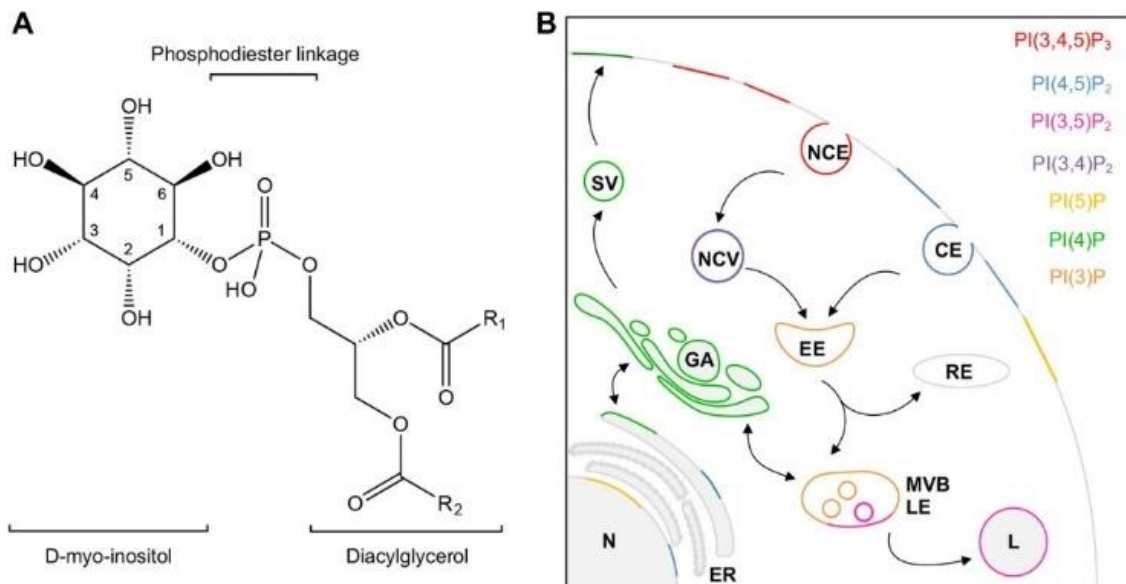


Figure 8. **Les phosphoinositides.** (A) Structure de la molécule de phosphatidylinositol non phosphorylée. R1 et R2 représentent des chaînes d'acide gras. (B) Distribution des différents phosphoinositides dans la cellule. CE : *clathrin-dependent endocytosis* ; NCE : *clathrin-independent endocytosis* ; NCV : *non-clathrin endocytic vesicles* ; EE : *early endosomes* ; RE : *recycling endosomes* ; MVB : *multivesicular bodies* ; LE : *late endosomes* ; L : *lysosome* ; ER : *endoplasmic reticulum* ; N : *nucleus* ; GA : *Golgi apparatus* ; SV : *secretory vesicles*. D'après Phan *et al.*, 2019.

(MTOC, pour *MicroTubule Organizing Center* ; Chabin-Brion *et al.*, 2001; Efimov *et al.*, 2007; Rivero *et al.*, 2009).

2.2.1 Le transport intra-Golgi

Les protéines sécrétées accèdent à l'appareil de Golgi par la face *cis* puis progressent le long des différentes citernes jusqu'à atteindre l'extrémité *trans* (Bonfanti *et al.*, 1998; Mironov *et al.*, 2001; Bergmann, 2004; Trucco *et al.*, 2004). Les mécanismes assurant la progression des cargos à travers l'appareil de Golgi a fait l'objet d'intenses débats dans les années 1990-2000. Initialement, deux modèles s'opposaient (Glick et Nakano, 2009).

Le modèle dit « vésiculaire » propose que les cargos soient transportés séquentiellement d'une citerne à l'autre dans le sens antérograde par l'intermédiaire de vésicules (**Figure 9a**). Ce modèle permet d'expliquer l'apparente stabilité des citernes. Cependant, ce modèle présente plusieurs défauts (Boncompain et Perez, 2013b). Par exemple, il ne permet pas d'expliquer le transport intra-Golgi de protéines dont la taille est supérieure au diamètre des vésicules COPI, impliquées dans les échanges entre citernes (Glick et Nakano, 2009).

Le modèle de maturation présente les citernes golgiennes comme des compartiments dynamiques (**Figure 9b**). Selon ce modèle, les membranes provenant du RE s'assemblent pour former un complexe membranaire qui va mûrir pour devenir une citerne golgienne *cis*. La maturation se poursuit, générant les citernes intermédiaires et *trans*. Les citernes *trans* se

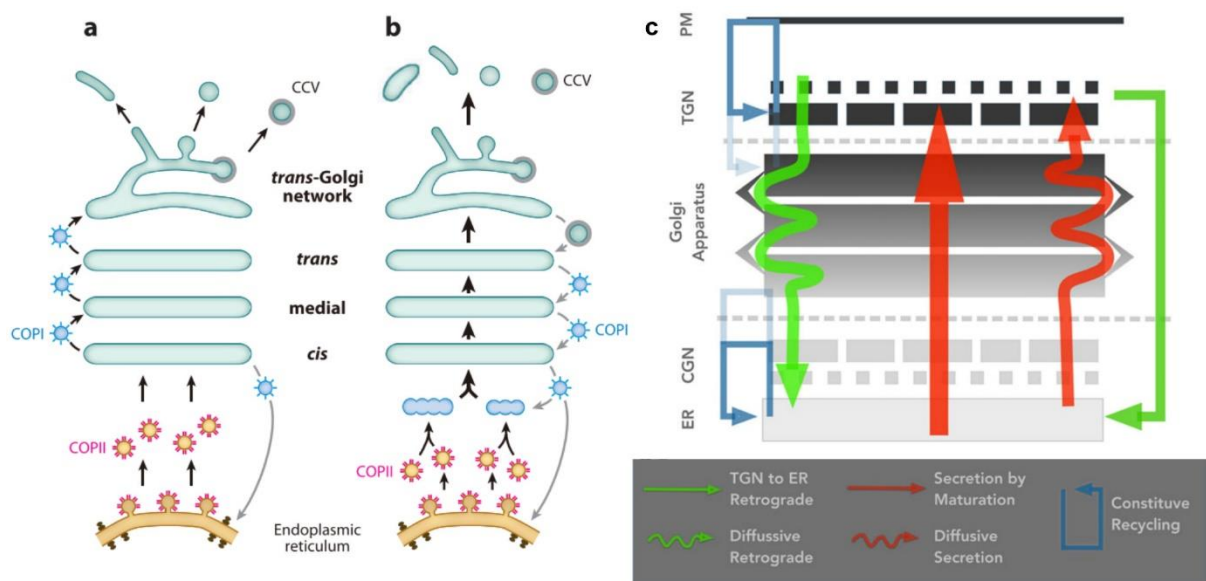


Figure 9. **Modèles de transport intra-Golgi.** (a-b) Modèles vésiculaire (a) et de maturation des citernes (b). CCV : *Clathrin-Coated Vesicle*. Glick et Nakano, 2009. (c) Modèle intégratif de maturation des citernes et diffusion inter-citernes proposé par Boncompain et Perez, 2013b. Adapté de Boncompain et Perez, 2013b.

scindent pour donner naissance aux différents intermédiaires de transport post-golgiens (Glick et Nakano, 2009). Dans ce modèle, les cargos sécrétés ne quittent pas les citernes mais progressent avec elles. Le maintien de la nature enzymatique de chaque citerne est assuré par un trafic vésiculaire rétrograde (dépendant de COPI) permettant le recyclage des enzymes golgiennes. Ce modèle a l'avantage d'expliquer le transport de larges protéines. De plus, le suivi de citernes golgiennes par vidéomicroscopie chez la levure a effectivement pu mettre en évidence des événements de maturation des citernes (Losev *et al.*, 2006; Matsuura-Tokita *et al.*, 2006; Kurokawa *et al.*, 2019). Mais un tel modèle ne permet pas d'expliquer les différences de cinétique observées pour différents cargos (Patterson *et al.*, 2008; Boncompain *et al.*, 2012; Beznoussenko *et al.*, 2014).

De façon intéressante, l'existence de connexions inter-citernes a été mise en évidence par microscopie électronique (San Pietro *et al.*, 2009; Beznoussenko *et al.*, 2014). Des cargos solubles de petite taille sont capables d'emprunter ces connexions et de diffuser d'une citerne à l'autre (Beznoussenko *et al.*, 2014). À l'inverse, de larges protéines comme les procollagènes sont exclues de ces connexions inter-citernes (Beznoussenko *et al.*, 2014).

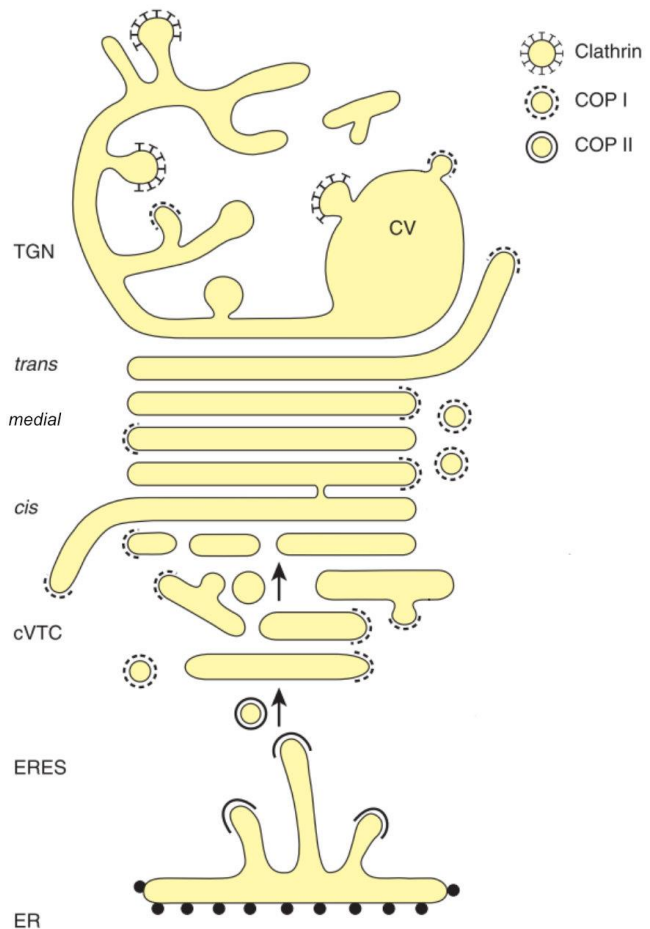
Associé au modèle de maturation des citernes, l'existence de ces continuités inter-citerne permet d'expliquer à la fois le transport de larges protéines ainsi que les différences de cinétique observées pour différents cargos (**Figure 9b**). Cependant, d'autres contradictions persistent et plusieurs autres modèles alternatifs ont aussi été proposés (Boncompain et Weigel, 2018).

2.2.2 Le tri des cargos et la sortie de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi fonctionne comme une plateforme de tri. Au niveau du TGN principalement, les différents cargos sont ségrégés et orientés vers leur destination finale (Boncompain et Weigel, 2018). Le TGN est un compartiment adjacent à la citerne *trans* et présente une structure tubulaire et réticulaire, différente des citernes golgiennes (**Figure 10** ; Klumperman, 2011).

De façon remarquable, l'appareil de Golgi doit faire face à une vaste diversité de cargos, comprenant des protéines solubles, des protéines ou complexes de tailles très variées, des protéines transmembranaires de différentes topologies, des protéines associées à la membrane par d'autres mécanismes (ancres GPI, lipidations...), des protéines faiblement ou massivement glycosylées... Au niveau de l'appareil de Golgi, les cargos sont orientés

Figure 10. **Structure de l'appareil de Golgi et du TGN.** Le TGN émerge du côté *trans* de l'appareil de Golgi. Il a une structure faite de tubules branchés et présente des régions couvertes de clathrine. Dans les cellules spécialisées dans la sécrétion, le TGN présente aussi des vacuoles de condensation (CV), précurseurs des granules de sécrétion. CV : *condensing Vacuole* ; cVTC : *central Vesicular Tubular Cluster* ; ER : *Endoplasmic Reticulum*. Adapté d'après Klumperman, 2011.



sélectivement vers les endosomes précoces, les endosomes tardifs, les endosomes de recyclage, les granules de sécrétion et la membrane plasmique apicale ou basale (De Matteis et Luini, 2008). Il est donc raisonnable de penser que toute une multitude de mécanismes de tri et d'export de l'appareil de Golgi coexistent.

L'export depuis l'appareil de Golgi a en effet pu être observé dans des compartiments variés structurellement (compartiments tubulovésiculaires, vésicules, granules de sécrétion...) et en termes de composition (Boncompain *et al.*, 2012; Wakana *et al.*, 2012; Pols, van Meel, *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017), illustrant ce phénomène de tri au TGN.

2.2.2.1 La clathrine et les adaptateurs de la clathrine dans le tri des cargos

Certains des mécanismes responsables du tri au Golgi ont été identifiés. Par exemple, certains cargos sont incorporés dans des vésicules recouvertes de clathrine au niveau du TGN. Généralement, ces protéines possèdent des signaux dans leur queue cytoplasmique pour le recrutement d'adaptateurs de la clathrine (Brulke et Bonifacino, 2009). Les adaptateurs AP1 et AP3 (l'acronyme AP signifiait initialement *Assembly Polypeptide*, mais il est maintenant plus

couramment décomposé en *Adaptor Protein* ; Zaremba et Keen, 1983; Robinson, 2004) sont présents à l'appareil de Golgi, de même que les GGA1-3 (pour *Golgi-localised Gamma ear-*

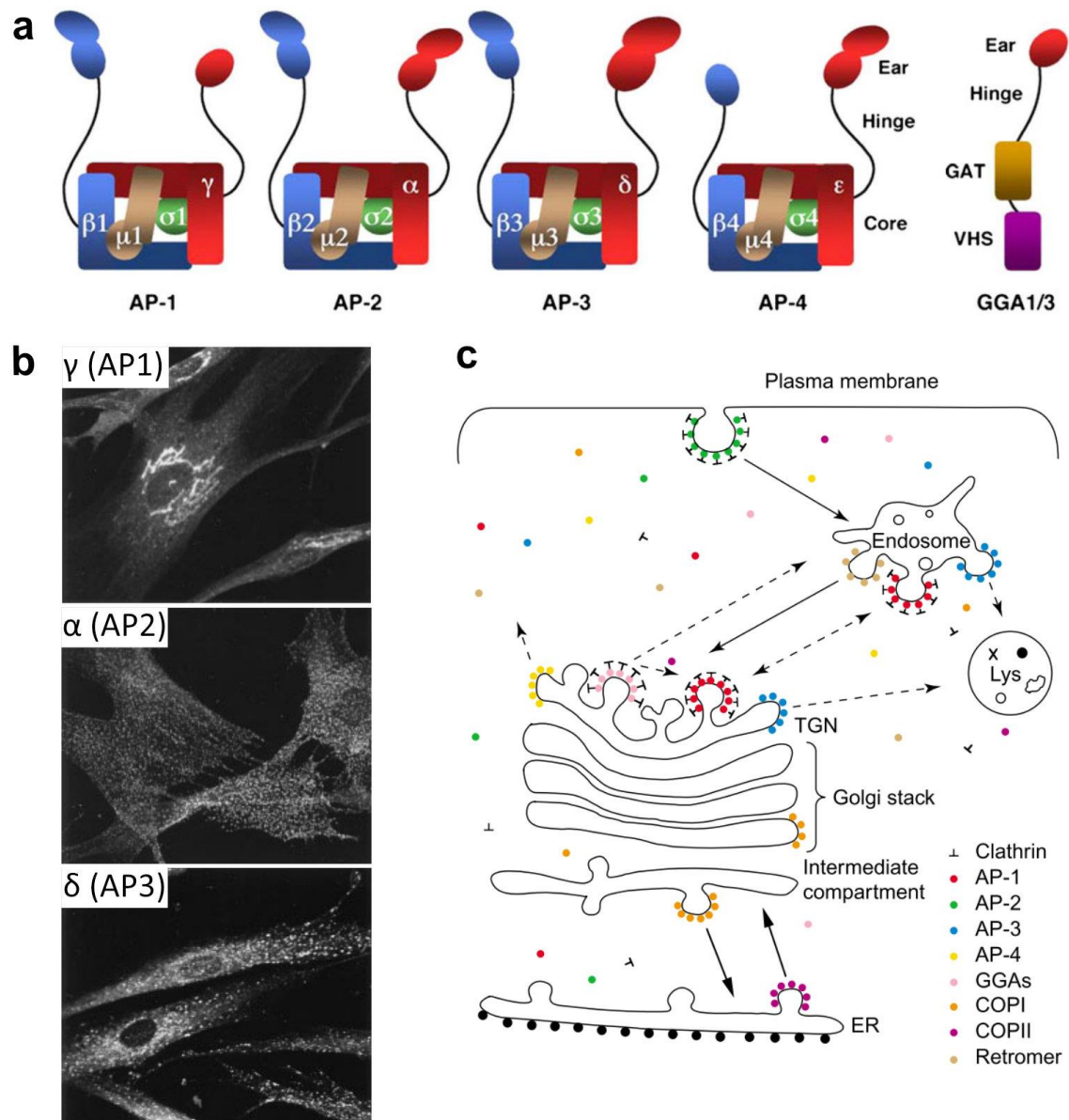


Figure 11. **Les adaptateurs de la clathrine AP et GGA.** (a) Structure des complexes AP1-4 et des GGA1-3. Le corps des complexes AP permet l'association à la membrane et aux cargos. Les régions charnières (*hinge*) dans AP1 et AP2 lient la clathrine. Les oreilles (*ear*) s'associe à des protéines accessoires (Bonifacino et Traub, 2003; Robinson, 2004). Le domaine *ear* des GGA est très proche de celui de AP1 γ . Un cinquième complexe AP (AP5) a été décrit mais n'est pas présenté ici (voir 3.3.2.3 La réorientation vers l'appareil de Golgi médié par AP5). Braulke et Bonifacino, 2009. (b) Cultures primaires de fibroblastes humains immunomarquées pour les sous-unités AP indiquées. AP1 localise principalement à l'appareil de Golgi mais aussi sur des endosomes. AP2 localise sur les puits et vésicules à clathrines au niveau de la membrane plasmique. AP3 localise principalement sur les endosomes mais aussi à l'appareil de Golgi (Robinson, 2004). AP4, non présenté ici, est localisé principalement à l'appareil de Golgi (Hirst *et al.*, 1999). Les GGA1-3 (non représentés) sont localisés à l'appareil de Golgi (Ghosh et Kornfeld, 2004b). Dell'Angelica *et al.*, 1999. (c) Représentation des localisations des différents AP et des GGA (ainsi que des manteaux COPI et COPII et du rétromère) et des voies de transport dans lesquels l'implication de ces adaptateurs a été proposée. Les flèches en pointillés dénotent d'incertitudes quant au sens de la voie et/ou de l'implication effective de l'adaptateur. ER : *endoplasmic reticulum* ; Lys : lysosome ; TGN : *trans-Golgi network*. Robinson, 2004.

containing, Arf-binding 1-3 ; **Figure 11** ; Robinson, 2004). Les AP reconnaissent des signaux de type tyrosine YXXΦ (avec Φ représentant un acide aminé hydrophobe encombrant) ou de type di-leucine (D/E)XXXL(L/I) (Braulke et Bonifacino, 2009). Le recrutement de AP1 sur la membrane golgienne est médié par le corps du complexe (**Figure 11a**), interagissant à la fois avec la petite GTPase golgienne Arf1 et le PI4P (Traub, Kornfeld et Ungewickell, 1995; Zhu, Drake et Kornfeld, 1999; Wang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008). Les GGA sont, eux aussi, recrutées au niveau de l'appareil de Golgi par Arf1 (Dell'Angelica *et al.*, 2000; Takatsu *et al.*, 2002; Collins, Watson et Owen, 2003) et sont capables de lier des signaux de types di-leucine DXXLL (Puertollano *et al.*, 2001; Misra *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2002). Les récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR) constituent la référence des cargos empruntant ce mode d'export de l'appareil de Golgi (voir **4.2 Les voies de trafic des récepteurs au mannose-6-phosphate et des hydrolases lysosomales**).

L'adaptateur AP4 (**Figure 11a**) est, lui aussi, localisé à l'appareil de Golgi mais semble fonctionner sans recruter la clathrine (Dell'Angelica, Mullins et Bonifacino, 1999; Hirst *et al.*, 1999). AP4 est recruté à l'appareil de Golgi grâce à son interaction avec Arf1 (Boehm, Aguilar et Bonifacino, 2001). Il reconnaît dans les cargos une variante du signal tyrosine : YXXΦE (Burgos *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2014; Mattera *et al.*, 2017). AP4 a été impliqué dans l'export de l'appareil de Golgi de plusieurs protéines, à savoir le médiateur de l'autophagie Atg9 (Mattera *et al.*, 2017; De Pace *et al.*, 2018), la protéine précurseur de l'amyloïde (APP, pour *amyloid precursor protein*) et deux récepteurs neuronaux (AMPA et le récepteur du glutamate δ2 ; Yap *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2008).

2.2.2.2 Le tri médié par agrégation

Un autre mécanisme de tri dans le TGN dépend de l'agrégation des protéines. Certaines protéines soluble destinées à être incluses dans les granules de sécrétion s'agrègent dans les membranes du TGN et forment un corps dense, précurseur des granules de sécrétion (Arvan et Castle, 1998). Pour certaines de ces protéines, des motifs peptidiques acides ont été impliqués dans leur capacité à agréger. Il semblerait que la concentration réduite de Ca²⁺ dans le TGN puisse jouer le rôle de facteur déclencheur de l'agrégation (Gerdes et Glombik, 1999; Kienzle et von Blume, 2014).

2.2.2.3 Le tri médié par des modifications post-traductionnelles

De multiples modifications post-traductionnelles peuvent déterminer le tri de cargos au niveau de l'appareil de Golgi. Certaines protéines peuvent se voir modifiées dans la lumière de RE par l'ajout d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) par la GPI transamidase (Kinoshita, 2014). Au niveau de l'appareil de Golgi, les protéines associées au GPI sont incorporées dans des sous-domaines lipidiques et transportées vers la membrane apicale (Brown et Rose, 1992).

Il a aussi été proposé que les N- et/ou O-glycosylations puissent être impliquées dans le tri de certains cargos vers la membrane apicale. Elles pourraient permettre l'agrégation des protéines modifiées et leur transport vers la membrane apicale par association avec des lectines telles que la galectine 3 (Delacour *et al.*, 2006).

D'autres protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui régissent leur interaction avec un récepteur. C'est par exemple le cas de la majorité des hydrolases lysosomales qui voient une ou plusieurs de leurs glycosylations modifiées par l'ajout d'un mannose-6-phosphate. Elles s'associent alors aux MPR qui les transportent vers les endosomes (voir **4.2 Les voies de trafic des récepteurs au mannose-6-phosphate et des hydrolases lysosomales**). Les protéines Wnt présentent un mécanisme apparenté. Les Wnt sont palmitoylées dans le RE par l'acyl-transférase porcupine (Perrimon *et al.*, 2000; Tanaka, Kitagawa et Kadowaki, 2002; Coombs *et al.*, 2010). Ces palmitoylations permettent leur interaction avec Wntless qui est responsable de leur transport vers la membrane plasmique (Das *et al.*, 2008). La sécrétion de Wnt3a à la membrane basolatérale dépend de AP1 et de la clathrine (Yamamoto *et al.*, 2013), suggérant que le complexe Wnt3a-Wntless pourrait être incorporé dans des vésicules à clathrine au niveau du TGN.

2.2.2.4 La voie de sécrétion constitutive

Il est vraisemblable que toutes les protéines sécrétées ne bénéficient pas d'un mécanisme de tri dédié. Allant dans ce sens, il est possible d'observer la sécrétion de cargos dénués de signal de tri et artificiellement insérés dans le RE par fusion à un peptide signal, comme c'est le cas pour la ssGFP (pour *secreted soluble* GFP ; Boncompain *et al.*, 2012). Les voies de sécrétion dépendantes de mécanismes de tri sont donc des compléments à une voie de sécrétion constitutive dont l'existence avait été postulée dès les années 1980 (Pfeffer et Rothman, 1987).

2.2.2.5 Les mécanismes de génération et de fission des intermédiaires de transport post-golgiens

Plusieurs facteurs sont nécessaires pour mener à bien la formation et la fission des intermédiaires de transport post-Golgi. La kinésine KIF5B a notamment été impliquée dans la formation d'intermédiaires de transport tubulaires (Grigoriev *et al.*, 2007; Jaulin *et al.*, 2007). La petite GTPase golgienne Rab6 joue un rôle important dans la fission de certains compartiments en formation au TGN. Cette petite protéine G recrute KIF20A/Rabkinésine 6, ainsi que la myosine II, qui sont toutes les deux requises pour la fission (Miserey-Lenkei *et al.*, 2010, 2017). La fission requiert aussi d'autres facteurs, comme les protéines *Four phosphate Adaptor Protein 1* (FAPP1) et FAPP2 (Godi *et al.*, 2004), des protéines à domaines BAR (Bonazzi *et al.*, 2005), la protéine kinase D (PKD ; Yeaman *et al.*, 2004) et la dynamine 2 (Kreitzer *et al.*, 2000; Salvarezza *et al.*, 2009).

2.3 Le transport vers la membrane plasmique et l'exocytose

Le transport des compartiments post-Golgi vers la membrane plasmique est dépendant des microtubules et du recrutement de kinésines (Lippincott-schwartz, Roberts et Hirschberg, 2000). L'extrémité + de certains microtubules est associée à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un complexe protéique comprenant les protéines CLASP, ELKS/RAB6IP2 et LL5 β (Lansbergen *et al.*, 2006). Dans ce complexe, LL5 β permet la liaison à la membrane plasmique de par son interaction avec le PI(3,4,5)P₃ et ELKS fait le lien avec les protéines CLASP, associées aux microtubules (Lansbergen *et al.*, 2006).

Rab6 est enrichie sur les compartiments post-Golgi (Grigoriev *et al.*, 2007; Fourriere *et al.*, 2019). De façon intéressante, Rab6 compte ELKS parmi ses effecteurs (Monier *et al.*, 2002). Rab6 permet ainsi de focaliser l'exocytose au niveau de points chauds de sécrétion proches des adhésions focales et riches en ELKS (Grigoriev *et al.*, 2011; Fourriere *et al.*, 2019).

La petite GTPase Rab8 est aussi impliqué dans l'exocytose des compartiments post-Golgi (Huber *et al.*, 1993; Ang *et al.*, 2003; Hattula *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2007). Elle est recrutée sur les compartiments post-Golgi de façon dépendante de Rab6 et fonctionne dans l'amarrage de ces compartiments à la membrane plasmique (Grigoriev *et al.*, 2011).

Les étapes finales de l'exocytose sont médiées par le complexe Exocyste, comprenant 8 sous-unités (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 et Exo84 ; Wu et Guo, 2015). Ce complexe se localise à la membrane plasmique, notamment via son interaction avec le

PI(4,5)P₂, et régule l'activité des protéines SNARE ainsi que le cytosquelette d'actine (Wu et Guo, 2015).

2.4 Les techniques d'étude de la voie de sécrétion

Un simple marquage de protéines endogènes ne permet que difficilement de conclure sur les voies de transport empruntées avant que celles-ci n'atteignent leur compartiment de destination. L'un des premiers moyens d'appréhender l'évolution des protéines après néosynthèse fut la réalisation d'expériences de *pulse-chase*. Cela consiste en une courte incubation des cellules (5-30 min) avec un acide aminé radioactif (*pulse*), suivi d'un changement de milieu pour un milieu froid (non radioactif, correspond au *chase*). Pendant le *pulse*, les protéines en cours de synthèse incorporent l'élément radioactif (généralement de la [³⁵S]Met), ce qui les rend traçables. L'utilisation de différents temps après lavage permettent de réaliser une cinétique de l'évolution des protéines marquées au sein des cellules. Cette expérience a souvent été associée à des tests de résistance à l'endoglycosidase H. Cette enzyme n'est capable de cliver les N-glycosylations ajoutées au niveau du RE qu'à condition que celles-ci aient conservé leur structure poly-mannoses initiales. L'enzyme golgienne α -mannosidase II digère une partie de cette structure, rendant les protéines résistantes à l'endoglycosidase H à leur arrivée à l'appareil de Golgi (Stanley, 2011). La combinaison de cette expérience de *pulse-chase* avec ce test de résistance à l'endoglycosidase H permet donc d'obtenir des cinétiques de transport du RE vers l'appareil de Golgi (Chen *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1987; Carlsson *et al.*, 1988; Granger *et al.*, 1990). De la même façon, l'association du *pulse-chase* à des techniques de marquage des protéines de surface (par exemple par biotinylation) ou de fractionnement cellulaire a permis d'établir des cinétiques de transport de protéines depuis le RE vers la membrane plasmique ou vers les endosomes (Green *et al.*, 1987; Harter et Mellman, 1992).

Le développement de techniques de synchronisation du transport le long de la voie de sécrétion permit une avancée dans le domaine en permettant de visualiser directement les voies de transport. Un moyen simple de synchroniser le trafic antérograde dans les cellules animales consiste à descendre les cellules à des températures non physiologiques. L'incubation des cellules à 15 °C bloque les cargos dans des compartiments post-RE et pre-Golgi et une incubation des cellules à 20 °C les bloque au niveau du TGN (Boncompain et Perez,

2013a). Le retour à une température physiologique permet alors de visualiser la sortie des cargos de ces compartiments (Matlin et Simons, 1983; Saraste et Kuismanen, 1984; Griffiths *et al.*, 1985; Boncompain et Perez, 2013a). Cette méthode présente cependant l'inconvénient de recourir à des températures non physiologiques. Après un retour à 37 °C, le rétablissement de tous les mécanismes de transport pourrait demander un temps d'adaptation. Il n'est donc pas assuré que les voies de transport observées en utilisant cette technique correspondent à la réalité physiologique.

Un autre moyen de suivre le transport des cargos le long de la voie de sécrétion est l'utilisation de la bréfeldine A (BFA), un inhibiteur de la GEF de Arf1 GBF1 (pour *Golgi-specific Brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange Factor 1* ; Niu *et al.*, 2005) produite par le champignon *Penicillium brefeldianum* (Hutchinson et Shu-Wen, 1983). L'incubation de cellules animales avec de la BFA relocalise les protéines et membranes golgiennes au RE et bloque la voie de sécrétion. Le lavage de la drogue permet la reformation de l'appareil de Golgi et un retour du trafic. Il est alors possible de suivre la sortie des cargos des appareils de Golgi nouvellement formés (Hutchinson et Shu-Wen, 1983; Janvier et Bonifacino, 2005). Cependant, la disparition temporaire de l'appareil de Golgi ainsi que le blocage global de la voie de sécrétion qui en résulte place les cellules dans une condition peu physiologique. De plus, la reformation de l'appareil de Golgi après lavage de l'inhibiteur se fait progressivement sur plusieurs dizaines de minutes. De fait, il est difficile d'interpréter des cinétiques de transport réalisées avec cette méthode. Finalement, la reformation de l'appareil de Golgi et la reprise du trafic se font de façon concomitante, ce qui suggère que les mécanismes de régulation du transport au niveau de l'appareil de Golgi puisse ne pas tous être opérationnels lors du passage des cargos étudiés.

Le développement d'un mutant thermosensible de la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSVGtsO45) permet de répondre à certains défauts des techniques précédentes. Le VSVG trimérise dans le RE, ce qui est nécessaire pour son export. La protéine VSVGtsO45 n'est pas capable de trimériser à 40 °C et reste bloquée dans le RE. Le passage des cellules à 32 °C permet de rétablir la trimérisation et ainsi l'export du VSVG vers l'appareil de Golgi puis vers la membrane plasmique (Lafay, 1974; Kreis et Lodish, 1986). En conséquence, l'accumulation de VSVGtsO45 dans le RE à 40 °C, suivi du changement de la température à 32 °C, permet la synchronisation du trafic de la protéine. Le développement de cet outil a fortement contribué à la compréhension de la voie de sécrétion. Mais, ne permettant que

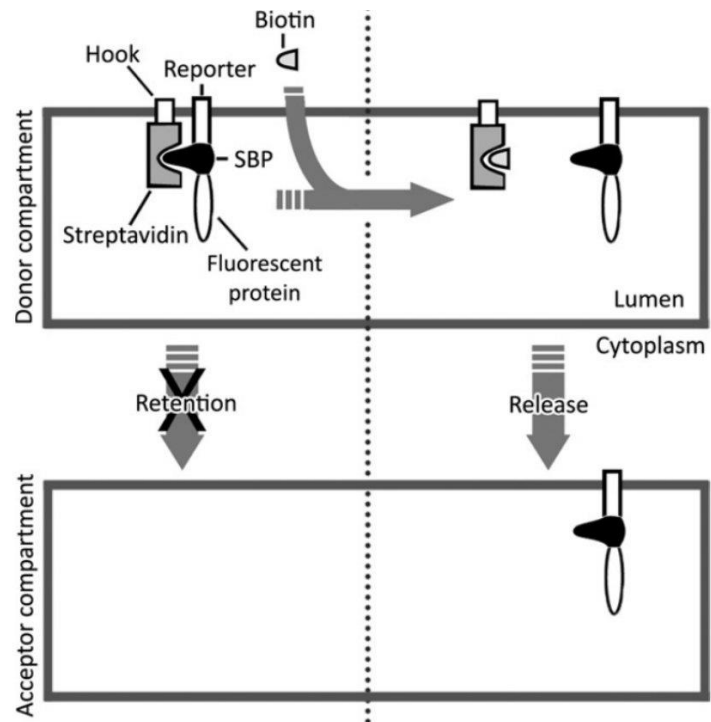
l'étude du transport du VSVG, cet outil ne permet pas d'appréhender la diversité des voies de transport antérogrades.

Des systèmes permettant la synchronisation de différents cargos d'intérêt ont finalement été développés. Une première méthode repose sur l'agrégation réversible des protéines d'intérêt dans le RE. Une mutation dans la protéine humaine FKBP12 (FKBP12^{F36M}) résulte en une protéine capable d'agrégation, mais qui est stabilisée par l'association avec la rapamycine ou des petites molécules synthétiques (Clackson *et al.*, 1998; Rivera *et al.*, 2000). Des protéines cargos fusionnées à quatre FKBP12^{F36M} en tandem (FM4) présentent une incapacité à quitter le RE, du fait de leur agrégation. L'ajout dans le milieu d'une petite molécule stabilisant les domaines FM4 permettent une désagrégation de ces protéines et, ainsi, une sortie synchronisée des protéines d'intérêt du RE (Rivera *et al.*, 2000). Ce système a été utilisé avec succès pour étudier les voies de trafic de toute une multitude de protéines. Il présente cependant l'inconvénient d'induire une forte déformation du RE (Rivera *et al.*, 2000). Il est aussi à noter que l'étiquette à ajouter aux protéines d'intérêt – 4 copies de FKBP12^{F36M} en tandem – et de taille imposante (> 400 acides aminés).

Fait intéressant, un autre système reposant sur l'agrégation réversible des protéines d'intérêt dans le RE a par la suite été développé et permet un contrôle optogénétique du relargage. Il repose sur la fusion de la protéine d'intérêt avec la protéine photosensible UVR8 (Chen, Gibson et Kennedy, 2013).

Un autre système de synchronisation, le système RUSH (pour *Retention Using Selective Hooks*), repose sur l'interaction réversible de la protéine d'intérêt à un « crochet moléculaire » qui la maintient dans le RE (Boncompain *et al.*, 2012). Cette interaction est médiée via la streptavidine et le polypeptide SBP (*Streptavidin Binding Peptide* ; Wilson, Keefe et Szostak, 2001; Barrette-Ng *et al.*, 2013). La protéine d'intérêt est fusionnée avec le SBP, ce qui permet sa rétention dans le RE par l'interaction avec la streptavidine fusionnée à une protéine résidente du RE (le « crochet » ; **Figure 12** ; Boncompain *et al.*, 2012). Le relargage de la protéine est assuré par l'ajout de biotine dans le milieu. La biotine est une vitamine soluble, non toxique, et elle déplace pratiquement instantanément le SBP de la streptavidine. Ce système a l'avantage de ne pas reposer sur un mécanisme d'agrégation de la protéine d'intérêt et n'induit donc ni déformation ni stress du RE. De plus, comparé aux systèmes d'agrégation, l'étiquette moléculaire nécessaire pour le système RUSH (le SBP) est ridiculement petite (37 acides aminés). Plusieurs crochets ont été développés afin de

Figure 12. **Représentation simplifiée du système RUSH.** Boncompain et Perez, 2013a.



répondre à tous types de topologies des protéines d'intérêt et à différents modes de fusion du SBP (Boncompain *et al.*, 2012). Le système RUSH donne aussi la possibilité de synchroniser le trafic de plusieurs cargos simultanément dans les mêmes cellules, offrant la possibilité de comparer directement les cinétiques et les voies de transport empruntées par différentes protéines sécrétées (**Figure 13**). Le système RUSH a ainsi permis une avancée dans la compréhension de la multiplicité des voies de transport le long de la voie de sécrétion (Boncompain *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2018; Tie *et al.*, 2018; Fourriere *et al.*, 2019). Autre avantage de ce système, celui-ci est parfaitement adaptable pour la réalisation de cribles et d'analyse à haut débit (Boncompain *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018).

Ensemble, ces techniques de synchronisation ont permis des avancées majeures dans la compréhension des voies de transport intracellulaire. Il est cependant nécessaire de garder à l'esprit que ces différentes techniques présentent un défaut commun et inhérent à la synchronisation elle-même. Du fait du trafic en vague généré par la synchronisation, les protéines d'intérêt se retrouvent surexprimées localement dans les différents compartiments traversés. Or, l'activité de certains régulateurs du trafic est saturable (Marks *et al.*, 1996). Les résultats obtenus via ces techniques doivent donc être interprétés avec précaution. C'est d'autant plus le cas pour les techniques affectant de façon globale la voie de sécrétion

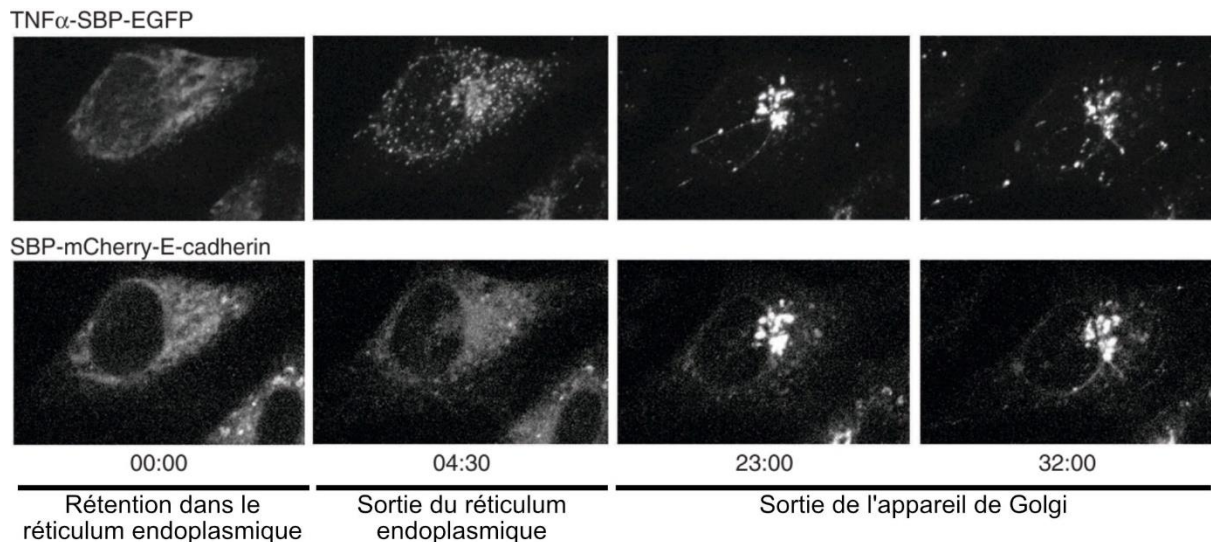


Figure 13. **Transport synchronisé par le système RUSH.** Cellules HeLa exprimant le crochet li-streptavidine (non fluorescent), TNF α -SBP-EGFP et SBP-mCherry-cadhérine E. Temps : min:s après ajout de biotine. Adapté d'après Boncompain *et al.*, 2012.

(blocages à 15 °C ou 20 °C et retrait de BFA). Il est aussi à noter que les systèmes d'agrégation dans le RE et le système RUSH, bien que puissants, nécessitent l'étiquetage des protéines d'intérêt. Cela présente un risque d'affecter les voies de transport empruntées (par exemple en masquant d'éventuels signaux au sein de la protéine d'intérêt) sans que cela ne soit facilement décelable. Il est donc nécessaire d'être prudent en utilisant ces techniques et d'utiliser si possible des modes de fusion déjà caractérisés et, si possible, d'en utiliser et comparer plusieurs différents.

3 La voie d'endocytose

L'endocytose constitue la voie d'entrée principale dans la cellule, que ce soit pour des matériaux nécessaires à la cellule (protéines, nutriments...) mais aussi pour des pathogènes. L'endocytose dépendante de la clathrine est le mécanisme principal d'endocytose, et le mieux documenté. Il existe cependant plusieurs autres voies d'endocytose indépendantes de la clathrine qui ne seront pas détaillées ici. Pour une description globale de ces voies, voir Mayor et Pagano, 2007, ou voir Hemalatha et Mayor, 2019 pour les avancées récentes sur le sujet.

En bref, l'endocytose médiée par la clathrine consiste en l'invagination de la membrane plasmique résultant en la formation d'une vésicule au sein du cytoplasme. Cette vésicule va fusionner avec des endosomes plus complexes, dit « précoces ». Ceux-ci fonctionnent comme une plateforme de tri des cargos endocytés. Depuis les endosomes précoces, les cargos endocytés peuvent soit être recyclés vers la membrane plasmique, soit suivre une voie

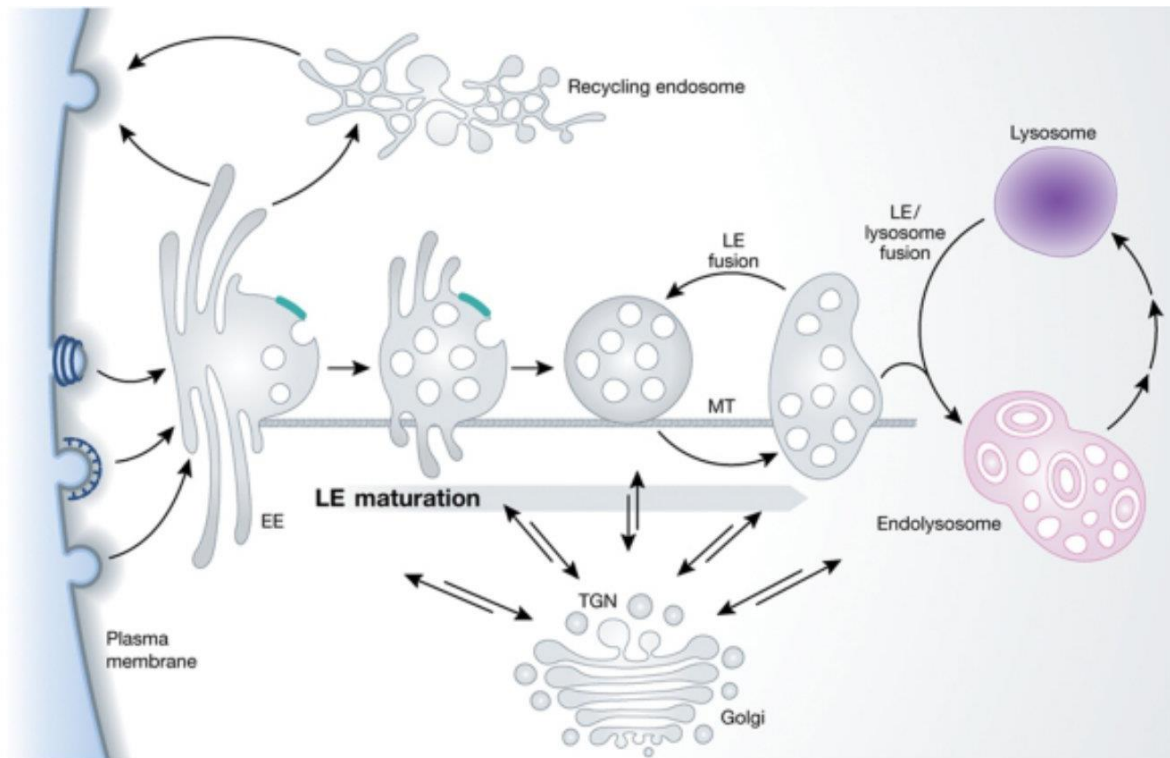


Figure 14. **Dynamique des compartiments de la voie d'endocytose.** Les plaques vertes sur les endosomes précoces symbole des manteaux à clathrine. EE, early endosome ; LE, late endosome ; MT, microtubule. Adapté d'après Huotari et Helenius, 2011.

rétrograde vers l'appareil de Golgi, ou alors se maintenir au sein des endosomes précoces qui vont maturer en endosomes tardifs et multivésiculaires. Dernière échappatoire avant leur dégradation, certains cargos peuvent encore être réorientés depuis les endosomes tardifs vers la voie rétrograde. Les endosomes tardifs vont finalement fusionner avec les lysosomes pour former un compartiment hybride, l'endolysosome, site de dégradation des cargos endocytés (**Figure 14**). Alternativement, les endosomes tardifs multivésiculaires (MVB, pour *MultiVesicular Bodies*), peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique. Il en résulte la sécrétion du contenu de la lumière du MVB et des vésicules intraluminales.

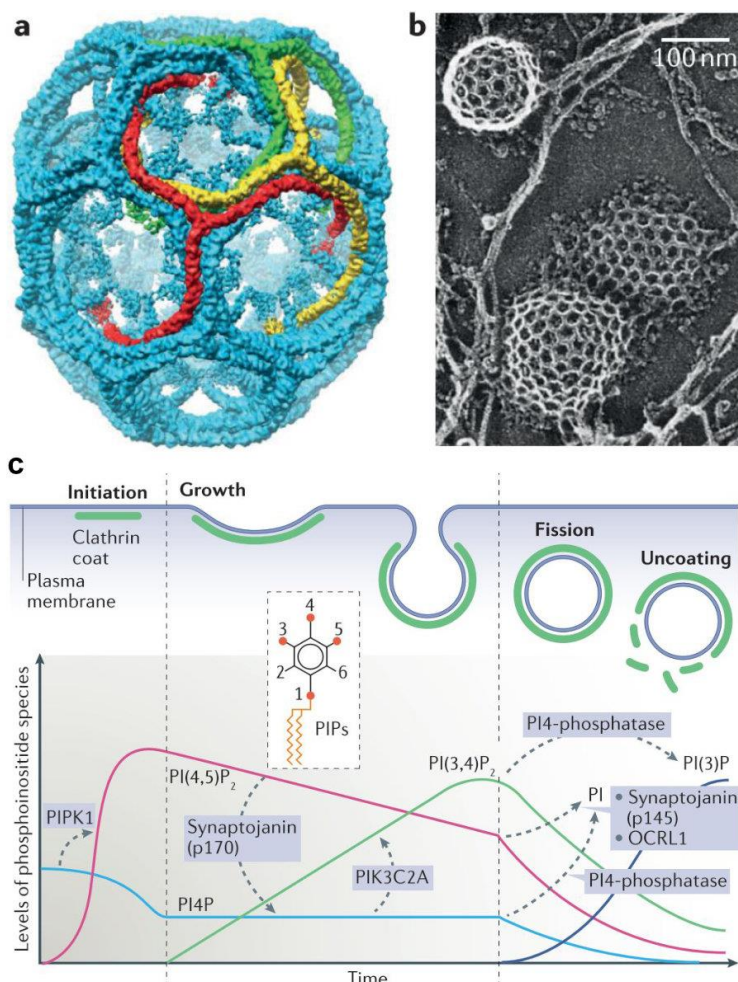
3.1 L'endocytose médiée par la clathrine

3.1.1 La formation du puits à clathrine

La clathrine est une protéine d'une forme caractéristique de triskèle (**Figure 15a**) qui s'assemble de sorte à former un maillage sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique (**Figure 15b**). Cette structure s'assemble avec d'autres protéines structurales grâce à plusieurs régulateurs. Ensemble, ces protéines peuvent mener à la déformation de la membrane

plasmique pour former dans un premier temps un puits recouvert de clathrine, et éventuellement mener à la genèse d'une vésicule recouverte de clathrine.

L'initiation de l'endocytose est médiée par un ensemble de protéines : AP2, FCHO1/2, EPS15, EPS15R et les intersectines 1 et 2 (Kaksonen et Roux, 2018). Le complexe adaptateur de la clathrine AP2 (**Figure 11**), ainsi que les protéines à domaine F-BAR FCHO1 et FCHO2 (pour *F-BAR domain only protein 1/2*) sont recrutés à la membrane plasmique grâce à leur liaison au PI(4,5)P₂. Les protéines *Epidermal growth factor receptor substrate 15* (EPS15) et *Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1* (EPS15R) et les intersectines sont ensuite recrutées et forment la structure permettant l'assemblage de la clathrine en agglomérant les protéines FCHO1/2 et AP2 (Kaksonen et Roux, 2018). Ces protéines sont les premiers constituants du manteau et initient la déformation de la membrane. Cette déformation est amplifiée par la force fournie par la polymérisation de l'actine autour du puits. Celle-ci est médiée notamment par le recrutement de la *Wiskott Aldrich Syndrome Protein* (WASP) et les *Actin-related proteins 2 et 3* (Arp2/3) au site d'endocytose (Merrifield *et al.*, 2004). Les protéines epsines



et les *Huntingtin-interacting protein 1-related proteins* (HIP1R), recrutées par le PI(4,5)P₂ lient à la fois la clathrine et les microfilaments d'actine et permettent ainsi le couplage entre la polymérisation des microfilaments et la déformation de la membrane (Engqvist-Goldstein *et al.*, 2004; Boulant *et al.*, 2011; Skruzny *et al.*, 2012; Messa *et al.*, 2014; Dmitrieff et Nédélec, 2015). L'implication de la myosine 1 dans cette déformation médiée par l'actine a aussi été suggérée (Cheng, Grassart et Drubin, 2012).

3.1.2 La scission

La scission du col du puits à clathrine fait appel à la dynamine. Il s'agit d'une grosse protéine à activité GTPase qui s'assemble de sorte à former une hélice autour du col du puits à clathrine. Cette structure permet la constriction du col et la fission de la vésicule. Bien qu'il soit clair que l'hydrolyse du GTP est nécessaire à la fission, le mode d'action moléculaire de la dynamine n'est pas bien compris (Antonny *et al.*, 2016). Plusieurs protéines BAR sont aussi impliquées dans la fission, notamment l'endophiline (Ringstad *et al.*, 1999), l'amphiphysine (Takei *et al.*, 1999) ou la *sorting nexin 9* (SNX9 ; Schöneberg *et al.*, 2017). Cependant, il n'est pas clairement défini si ces protéines agissent en déformant directement la membrane ou en recrutant d'autres acteurs au niveau de la constriction (Kaksonen et Roux, 2018).

3.1.3 Les phosphoinositides au cœur du processus

La nature des phosphoinositides de la membrane joue un rôle primordial dans l'évolution du puits à clathrine (**Figure 15c**). La génération du PI(4,5)P₂ est nécessaire pour l'initiation de l'endocytose (Zoncu *et al.*, 2007; Cocucci *et al.*, 2012). Sa quantité à la membrane plasmique est régulée par des PIP5K (kinase du PI4P en position 5 de l'inositol) et la synaptojanine (phosphatase du PI(4,5)P₂ en position 5 de l'inositol) et module la dynamique de l'endocytose (Antonescu *et al.*, 2011). La progression de la déformation de la membrane plasmique s'accompagne d'un enrichissement du puits en PI(3,4)P₂. Il a été montré récemment que la formation du PI(3,4)P₂, impliquant la PI3K C2α (kinase de la position 3 de l'inositol), joue un rôle primordial dans les étapes tardives de la formation de la vésicule (Posor *et al.*, 2013). Il permet par exemple le recrutement de la *sorting nexin 9* (SNX9), impliquée dans la scission, via son domaine PX (Posor *et al.*, 2013; Schöneberg *et al.*, 2017) et de *FCH and double SH3 domains protein 2* (FCHSD2) qui stimule la polymérisation de l'actine autour du puits (Almeida-Souza *et al.*, 2018).

3.1.4 Le démantèlement du manteau

Après scission, la vésicule a besoin d'être libérée de son manteau pour pouvoir fusionner avec les compartiments endosomaux précoces. Le démantèlement de la clathrine se fait grâce à la chaperonne HSC70 (Braell *et al.*, 1984; Ungewickell, 1985). Celle-ci est recrutée par l'auxiline, capable de lier à la fois la clathrine et HSC70, mais aussi la dynamine (Kaksonen et Roux, 2018). Encore ici, le PI(3,4)P₂ est nécessaire pour le recrutement de l'auxiline, qui possède aussi un domaine PTEN (Massol *et al.*, 2006). En parallèle, les phosphoinositides sont convertis en PI3P. D'une part, la déphosphorylation du PI(4,5)P₂ encore présent permet l'interaction avec la membrane de AP2 et de tous les régulateurs dépendants du PI(4,5)P₂. D'autre part, l'enrichissement en PI3P permet d'affirmer l'identité du compartiment, le PI3P étant le phosphoinositide principal des endosomes précoces (Behnia et Munro, 2005). Ces conversions impliquent INPP4A/B (phosphatase de l'inositol en position 4), la synaptojanine et la protéine *Oculo-Cerebro-Renal syndrome of Lowe* (OCRL, phosphatase de l'inositol en position 5) (Kaksonen et Roux, 2018; Wang, Lo et Haucke, 2019). OCRL est un effecteur de la petite GTPase Rab35 (Dambournet *et al.*, 2011). De façon intéressante, il a été montré que le recrutement de Rab35 et OCRL après la scission fait l'objet d'une régulation temporelle très fine. Immédiatement après la scission s'enchaînent de façon séquentielle le recrutement sur les vésicules à clathrine de connecdennine 1, une GEF de Rab35 (Chaîneau, Ioannou et Mcpherson, 2013), puis de Rab35 et OCRL (Cauvin *et al.*, 2016). Avant la scission, Rab35 est maintenue à l'écart par la présence de sa GAP EPI64B sur le puits à clathrine, qui le quitte dès la scission (Cauvin *et al.*, 2016). Cette séquence d'événements se réalise en une trentaine de secondes après la scission (Cauvin *et al.*, 2016).

3.1.5 Les signaux de l'endocytose

Le recrutement de AP2 est dépendant de sa liaison au PI(4,5)P₂, mais aussi à des signaux peptidiques portés par certains cargos (Höning *et al.*, 2005). AP2 est ainsi capable de reconnaître différents types de signaux via plusieurs de ses sous-unités (voir la revue de Traub et Bonifacino, 2013). La sous-unité μ 2 de AP2 lie le signal tyrosine YXX Φ (Φ désignant un résidu hydrophobe), retrouvé par exemple dans le récepteur à la transferrine (Collawn *et al.*, 1990). Les sous-unités α et σ 2 sont capables de reconnaître le signal di-leucine (D/E)XXXL(L/I), présent par exemple dans CD3 (Letourneur et Klausner, 1992) ou CD74 (Pond *et al.*, 1995). La sous-unité α pourrait aussi être capable de reconnaître des signaux formés de résidus acides

agrégés, présents par exemple dans la furine (Voorhees *et al.*, 1995) ou la protéine Nef du VIH de type 1 (Lindwasser *et al.*, 2008).

D'autres adaptateurs du manteau à clathrine sont impliqués dans la reconnaissance de modifications post-traductionnelles des cargos. Par exemple, EPS15 et les epsines 1 et 2 sont impliqués dans la reconnaissance de protéines ubiquitinyllées à la membrane plasmique. De même, les β -arrestines 1 et 2 reconnaissent des motifs phosphorylés, notamment dans plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, pour *G protein-coupled receptors*) (Bonifacino et Traub, 2003). D'autres adaptateurs reconnaissent des régions bien plus spécifiques de certaines protéines ou familles de protéines. Par exemple, la protéine *Phosphatidylinositol-Binding Clathrin Assembly* (PICALM) est capable de reconnaître les domaines SNARE de VAMP2 (pour *Vesicle-Associated Membrane Protein 2*), VAMP3 et VAMP8 (Miller *et al.*, 2011).

Il est aussi à noter qu'à l'inverse, des mécanismes pour exclure certains cargos des puits à clathrine existent, notamment en lien avec la taille des domaines transmembranaires (Mercanti *et al.*, 2010).

3.2 La maturation des endosomes

À la différence de la voie de sécrétion, la porte d'entrée de la voie d'endocytose – le milieu extracellulaire – est très facilement manipulable. Il est ainsi plus facile de suivre des éléments qui voyagent le long de cette voie. Selon le type cellulaire, les éléments endocytés atteignent les endosomes précoces (**Figure 16a, b**) 1 à 5 min après endocytose, puis les endosomes tardifs (**Figure 16c**) après 10 à 30 min. Les compartiments lytiques (**Figure 16d, e**) sont finalement atteints environ 30 min après l'endocytose (Sachse, Ramm, *et al.*, 2002).

La petite GTPase Rab5 est rapidement recrutée sur les vésicules d'endocytose et représente le régulateur principal de la dynamique des endosomes précoces (Wandinger-Ness et Zerial, 2014). Rab5, par sa présence et son interaction avec le complexe PI3K VPS34/p150, qui produit et maintient le PI3P sur les membranes des endosomes précoces (Christoforidis, Miaczynska, *et al.*, 1999), permet de définir l'identité de ces compartiments. Fonctionnant comme des plateformes de tri, les endosomes précoces ont des morphologies hétérogènes constituées d'une vacuole centrale à partir de laquelle émergent des tubules (**Figure 16a** ; Klumperman et Raposo, 2015).

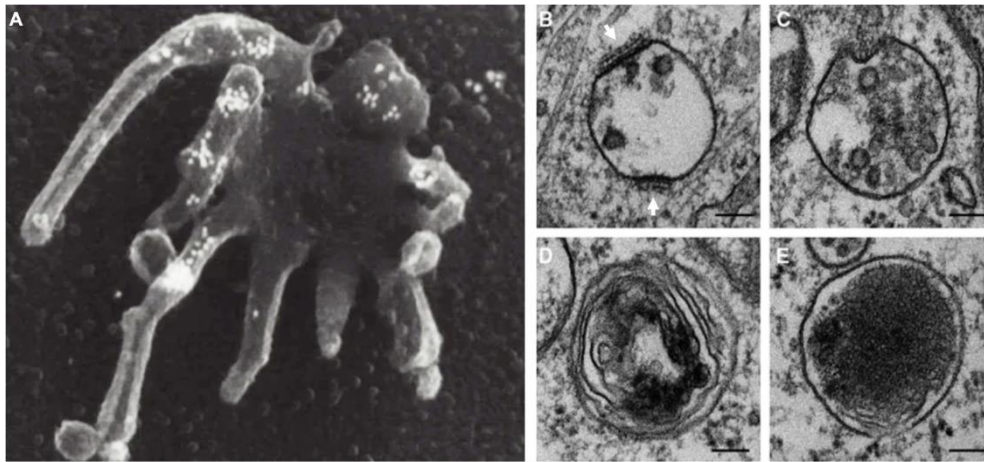


Figure 16. **Les principaux compartiments de la voie d'endocytose.** (a) Image de microscopie électronique à balayage d'un endosome précoce, mettant en évidence la présence de tubules et de sous-domaines. Les points blancs correspondent à du LDL couplé à des billes d'or endocyté (les couleurs ont été inversées). Gruenberg, 2001. (b-e) Images de microscopie à transmission d'endosome précoce (b), d'endosome tardif (c), d'endolysosome (d) et de lysosome (e). Les flèches dans (b) pointent des manteaux à clathrine sur l'endosome précoce. Bars d'échelle : 100 nm. Adapté de Huotari et Helenius, 2011.

Les endosomes précoces peuvent fusionner entre eux de façon dépendante de Rab5 (Gorvel *et al.*, 1991; Rybin *et al.*, 1996). La protéine d'amarrage EEA1 (*Early Endosomal Autoantigen 1*), un effecteur de Rab5 (Simonsen *et al.*, 1998; Christoforidis, McBride, *et al.*, 1999) recruté sur les membranes par le PI3P (Patki *et al.*, 1997), permet l'amarrage des endosomes précoces. Il a été montré que, après amarrage de deux endosomes précoces, EEA1 s'effondre sur elle-même suite à l'interaction avec Rab5 et rapproche ainsi les deux compartiments pour initier la fusion (Murray *et al.*, 2016). Il a aussi été montré que la protéine Rabénosyne 5, un autre effecteur de Rab5 capable de lier le PI3P via son domaine FYVE, recrute sur les endosomes précoces la protéine Vps45 (Nielsen *et al.*, 2000). Cette protéine fait partie de la famille de protéines Sec1/Munc18 qui régulent l'activité des protéines SNARE et facilitent ainsi les événements de fusion (Rizo et Südhof, 2012). De plus, EEA1 est aussi capable d'interagir avec la protéine SNARE Syntaxine 13 (Mcbride *et al.*, 1999), bien que la fonction de cette interaction ne soit pas très claire.

Un modèle explicatif de la maturation des endosomes précoces dit « en entonnoir » a été proposé (Foret *et al.*, 2012). Selon ce modèle, les contenus endocytés convergent par fusion des endosomes qui, dans le même temps, migrent vers le centre cellulaire. Les endosomes précoces matureraient ainsi tout en évoluant en taille et en contenu (**Figure 17**).

Les endosomes précoces évoluent en endosomes tardifs (Stoorvogel *et al.*, 1991). De façon marquante, cette maturation s'accompagne d'une conversion de la Rab dominante sur

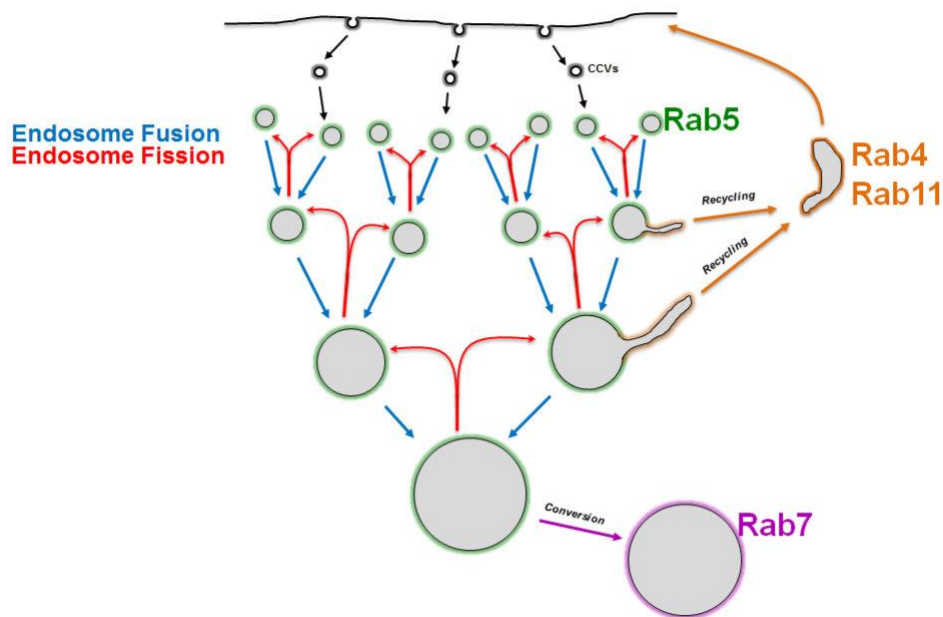


Figure 17. **Modèle de maturation en entonnoir des endosomes précoces.**
 Source : site web du laboratoire *Principles of cell and tissue organization*
 (Marino Zerial) ; <http://zerial.mpi-cbg.de/>.

les membranes du compartiment, passant de Rab5 à Rab7 en seulement quelques minutes (Figure 18 ; Rink *et al.*, 2005; Vonderheit et Helenius, 2005). Rab5 est maintenue active sur les membranes grâce à sa GEF Rabex-5 (Horiuchi *et al.*, 1997), elle-même positivement régulée par son interaction avec Rabaptin-5, effecteur de Rab5 (Christoforidis, McBride, *et al.*, 1999; Lippe *et al.*, 2001). Il en résulte une boucle d'activation positive recrutant et maintenant Rab5 sur la membrane des endosomes précoces, et dont le maintien est directement dépendant de Rabex-5. Ce sont les protéines SAND-1/Mon1a/b qui interviennent pour mettre fin à cette boucle et permettre la conversion. Une étude chez *Caenorhabditis elegans* a montré que SAND-1 (qui a deux homologues chez les vertébrés : Mon1a et Mon1b) s'associe à Rabex-5 et permet son retrait des endosomes précoces (Poteryaev *et al.*, 2010). De plus, SAND-1 permettrait aussi le recrutement de Rab7 en liant Vps18 et Vps11, deux sous-unités du complexe d'amarrage HOPS (pour *Homotypic fusion and vacuole Protein Sorting*) qui comprend aussi Vps39 et Vps33, deux partenaires de Rab7 (Poteryaev *et al.*, 2010; Spang, 2016). La régulation spatiotemporelle de l'activité de SAND-1/Mon1 n'est pas encore bien comprise.

La transition de Rab s'accompagne d'une modification des phosphoinositides de la membrane de l'endosome : une partie du PI3P laisse sa place à du PI(3,5)P₂ (Wang, Lo et

Haucke, 2019). Cette conversion est catalysée par PIKfyve (kinase de la position 5 de l'inositol), recrutée par le PI3P via son domaine FYVE (Hasegawa, Strunk et Weisman, 2017).

Les endosomes tardifs sont sujets à fusion homotypique. Rab7 n'est pas essentielle pour dans la formation des MVB (Vanlandingham et Ceresa, 2009) mais une fois ceux-ci formés, c'est Rab7 qui joue le rôle de chef d'orchestre (Wandinger-Ness et Zerial, 2014). Comme mentionné plus haut, Rab7 interagit avec le complexe d'amarrage HOPS via les sous-unités Vps39 et Vps33. Ce complexe, initialement identifié chez la levure, se compose de six sous-unités : Vps11, Vps16, Vps18, Vps33, Vps39 et Vps41 (Spang, 2016). Il est nécessaire pour la fusion homotypique des vacuoles en permettant un amarrage des compartiments via son interaction avec l'orthologue de Rab7, Ypt, via ses sous-unités Vps39 et Vps41 (Spang, 2016). Dans les cellules de mammifères, hVps41 et hVps39 ont aussi été impliquées dans la fusion homotypique des endosomes tardifs de même que pour la fusion de ceux-ci avec les lysosomes (Pols, Ten Brink, *et al.*, 2013). Le complexe SNARE impliqué dans cette fusion homotypique a été identifié. Il se compose des Q-SNARE syntaxine 7, Vti1b et syntaxine 8 et de la R-SNARE VAMP8 (Luzio *et al.*, 2017).

Finalement, les endosomes tardifs peuvent fusionner avec les lysosomes, formant ainsi un compartiment intermédiaire : l'endolysosome (Mullock *et al.*, 1998), site de dégradation des éléments contenus dans la lumière (Bright, Davis et Luzio, 2016). La fusion totale des deux compartiments est généralement précédée d'événements de « *kiss-and-run* », permettant un premier échange de matériel (Bright, Gratian et Luzio, 2005). Le complexe SNARE pour la fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes semble différer de celui impliqué dans la fusion homotypique des endosomes tardif que par la R-SNARE impliquée. La R-SNARE VAMP8 est remplacée par la R-SNARE *Tetanus neurotoxin-Insensitive Vesicular-Associated Membrane*

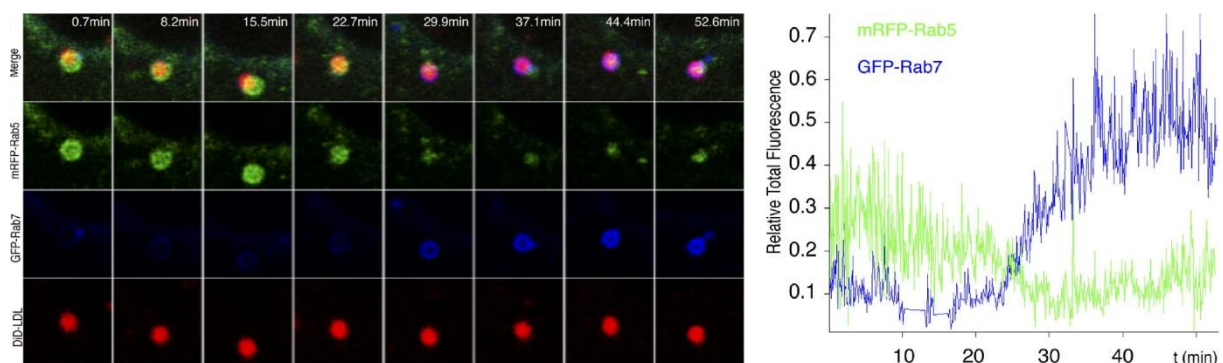


Figure 18. **Conversion de la Rab majoritaire lors de la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs.** Images de fluorescence : suivi d'un endosome dans des cellules A431 exprimant GFP-Rab7 et mRFP-Rab5 et incubées avec du LDL fluorescent (DID-LDL). Les temps indiqués correspondent aux temps après ajout du LDL dans le milieu. Graphiques : Intensité des fluorescences sur ce même endosome. Rink *et al.*, 2005.

Protein (TI-VAMP)/VAMP7 (Ward *et al.*, 2000; Pryor *et al.*, 2004). Cependant, des souris déplétées en VAMP7 sont viables et ne présentent pas de dysfonctionnements importants (Sato *et al.*, 2011; Danglot *et al.*, 2012), suggérant que les fonctions de VAMP7 pourraient être achevées par d'autres facteurs, ou que des effets compensatoires se manifestent dans ces souris. La fusion des endosomes tardifs avec les lysosomes est aussi dépendante du complexe d'amarrage HOPS (Pols, Ten Brink, *et al.*, 2013).

Alternativement, les endosomes tardifs peuvent aussi fusionner avec la membrane plasmique, menant à la sécrétion du contenu de la lumière et des vésicules intraluminales (Kowal, Tkach et Théry, 2014).

Le processus de maturation des endosomes, depuis les vésicules d'endocytose jusqu'aux endolysosomes, s'accompagne de plusieurs phénomènes. L'acidification de la lumière des compartiments est médiée par la pompe à proton V-ATPase (Mellman, Fuchs et Helenius, 1986). Le pH est d'environ 6,2 dans les endosomes précoces et progresse jusqu'à des valeurs proches de 4,0 dans les endosomes tardifs et endolysosomes. La maturation des endosomes s'accompagne aussi de la formation de vésicules intraluminales (ILV) (**Figure 16b, c** ; voir **3.3.4 L'incorporation des cargos dans les vésicules intraluminales**) et d'une augmentation de la fréquence des contacts entre endosomes et réticulum endoplasmique (Friedman *et al.*, 2013). Ces contacts jouent plusieurs rôles dans la biologie des endosomes, régulant notamment l'échange de lipides (van der Kant et Neefjes, 2014; Henne, 2019), l'échange de calcium (van der Kant et Neefjes, 2014; Patel, 2019), ou encore leur transport le long des microtubules et la fusion des MVB avec la membrane plasmique (Friedman *et al.*, 2013; Raiborg *et al.*, 2015 ; voir Eden, 2016 pour une revue générale sur les contacts RE-endosomes).

3.3 Le tri des cargos dans les endosomes

3.3.1 Le recyclage des cargos vers la membrane plasmique

Centre de tri majeur de la voie d'endocytose, les endosomes précoces forment des tubulations (**Figure 16a** ; Klumperman et Raposo, 2015) et sont organisés en sous-domaines (Sönnichsen *et al.*, 2000). Ces sous-domaines sont définis par les petites GTPases Rab4 et Rab11 (Sönnichsen *et al.*, 2000) qui régulent les voies de recyclage depuis les endosomes précoces vers la membrane plasmique (Ullrich *et al.*, 1996; Seachrist, Anborgh et Ferguson,

2000). Dans certains types cellulaires, les endosomes de recyclage, résultats de la scission des tubules émanant des endosomes précoces, convergent pour former un compartiment endosomal de recyclage périnucléaire (Klumperman et Raposo, 2015). Dans cette configuration, Rab4 semble plutôt définir les endosomes précoces/de recyclage et Rab11 les compartiments endosomaux de recyclage périnucléaire (van der Sluijs *et al.*, 1992; Ullrich *et al.*, 1996; Sheff *et al.*, 1999). En conséquence, Rab4 est proposé comme régulateur d'une voie de recyclage rapide alors que Rab11 régulerait une voie de recyclage plus lente (Stenmark, 2009; Klumperman et Raposo, 2015). Il a été montré que l'action de Rab4 dans le recyclage des cargos vers la membrane plasmique est associée à l'activité du complexe rétromère (Temkin *et al.*, 2011).

Le complexe rétromère a initialement été décrit chez *Saccharomyces cerevisiae* comme régulant la voie de trafic rétrograde des endosomes vers l'appareil de Golgi. Chez les mammifères, il se compose de Vps35, Vps29 et Vps26A/B et est aussi impliqué dans le recyclage des cargos vers la membrane plasmique (Seaman, 2012; Cullen et Steinberg, 2018). Les deux sous-unités Vps26A et Vps26B sont interchangeables au sein du complexe mais les deux complexes résultants sont fonctionnellement différents (Kerr *et al.*, 2005; Bugarcic *et al.*, 2011). Le complexe rétromère est présent sur les membranes des endosomes précoces et des endosomes tardifs. Il est recruté sur la membrane des endosomes précoces via son interaction avec SNX3, capable de lier le PI3P (Harterink *et al.*, 2011; Harrison *et al.*, 2014). Son recrutement sur les endosomes tardifs est, quant à lui, médié par sa liaison à Rab7 (Rojas *et al.*, 2008; Seaman *et al.*, 2009).

Ils fonctionnent en collaboration avec un dimère de protéines à domaine BAR constitué de SNX1 ou SNX2 associé à SNX5 ou SNX6 (Carlton *et al.*, 2004; Wassmer *et al.*, 2006; Hara *et al.*, 2008; Mari *et al.*, 2008; Cullen et Steinberg, 2018).

Son implication dans le recyclage vers la membrane plasmique a par exemple été démontré pour le *Divalent Metal Transporter 1* (DMT1 ; Tabuchi *et al.*, 2010) ou le récepteur adrénergique $\beta 2$ ($\beta 2AR$; Lauffer *et al.*, 2010; Temkin *et al.*, 2011). SNX3 fonctionne comme un adaptateur pour DMT1 en recrutant le complexe rétromère (Tabuchi *et al.*, 2010; Lucas *et al.*, 2016). D'autres cargos, comme $\beta 2AR$, utilisent la SNX27 comme adaptateur (Lauffer *et al.*, 2010; Temkin *et al.*, 2011; Steinberg *et al.*, 2013). SNX27 est aussi recrutée sur les endosomes par le PI3P (Ghai *et al.*, 2011, 2013) et recrute le rétromère via son interaction avec la sous-unité Vps26 (Gallon *et al.*, 2014). Il a été montré, dans le cas de $\beta 2AR$, que le rétromère est

nécessaire pour son inclusion dans les tubules positifs pour Rab4 émergeant des endosomes précoces (Temkin *et al.*, 2011).

La polymérisation de l'actine, régulée par le complexe WASH, régulateur de Arp2/3, est nécessaire pour mener à bien les tubulations sur les endosomes précoces et le recyclage des cargos (Derivery *et al.*, 2009, 2012; Gomez *et al.*, 2012). Pour ce faire, WASH est recruté sur les endosomes par l'interaction de sa sous-unité FAM21/WASHC2 avec la sous-unité du rétromère Vps35 (Harbour, Breusegem et Seaman, 2012; Jia *et al.*, 2012). Plusieurs protéines à domaine BAR ont aussi été impliquées dans la formation des tubules et le recyclage des cargos, comprenant notamment PACSIN1/Syndapine 1, PACSIN2/Syndapine 2 (PACSIN pour *Protein kinase C and Casein kinase Substrate In Neurons 1 et 2* ; Braun *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009) et ACAP1 (pour *Arf-GAP with Coiled-coil, ANK repeat and PH domain containing Protein 1* ; Dai *et al.*, 2004; Shinozaki-Narikawa, Kodama et Shibasaki, 2006). Rab4 localise sur les tubules dépendant du rétromère (Temkin *et al.*, 2011) et régule l'activité de la kinésine KIF2C (Bananis, 2003). Il pourrait donc aussi jouer un rôle dans l'élongation des tubules sur les endosomes précoces. Finalement, la fission des endosomes de recyclage est dépendante de la dynamine (Mesaki *et al.*, 2011).

Récemment, un autre complexe ressemblant au rétromère a été identifié lors d'une étude protéomique (McNally *et al.*, 2017). Ce complexe, appelé *retriever*, comprend Vps29, sous-unité du rétromère, associé à C16orf62 et *Down syndrome critical region protein 3* (DSCR3 ; McNally *et al.*, 2017). La SNX17 a été identifiée comme partenaire de ce complexe et semble être impliquée dans le recyclage de plus de 120 cargos, incluant APP (pour *β -amyloid precursor protein*), l'intégrine $\beta 1$ ou encore le récepteur au LDL (pour *Low Density Lipoprotein*) LRP1 (pour *Low density lipoprotein receptor-Related Protein 1* ; McNally *et al.*, 2017). SNX17 est recrutée sur les membranes des endosomes de la même façon que SNX3 et SNX27, en liant le PI3P (Ghai *et al.*, 2011).

3.3.2 La réorientation des cargos vers l'appareil de Golgi

3.3.2.1 La réorientation vers l'appareil de Golgi par le complexe rétromère

Avant d'être impliqué dans le recyclage vers la membrane plasmique, le complexe rétromère a été identifié chez la levure comme un régulateur de la voie rétrograde (Seaman, 2012). Chez les mammifères, le rôle du rétromère dans le trafic des endosomes vers l'appareil

de Golgi a aussi été observé (Arighi *et al.*, 2004; Carlton *et al.*, 2004; Seaman, 2004). Il a notamment été mis en évidence pour le trafic du CI-MPR (pour *Cation-Independent Mannose-6-Phosphate Receptor* ; Arighi *et al.*, 2004; Seaman, 2004), de Sortiline (Seaman, 2004), ou pour celui de Wntless (Harterink *et al.*, 2011). Il a été montré que l'interaction du CI-MPR avec le rétromère est médiée via SNX5 et SNX6 (Kvainickas *et al.*, 2017) qui reconnaissent un motif WLM dans la queue cytosolique du CI-MPR (Seaman, 2007; Simonetti *et al.*, 2017).

La clathrine a aussi été impliquée dans la voie rétrograde et pourrait être associée à la voie dépendante du rétromère (Johannes et Wunder, 2011). Il a notamment été montré que l'adaptateur AP1 jouait un rôle dans le trafic rétrograde du CI-MPR (Meyer *et al.*, 2000; Robinson, Sahlender et Foster, 2009). Rab4 et AP1 sont localisés sur les mêmes vésicules et Rab4 est capable d'interagir directement avec la sous-unité γ de AP1 (Perrin *et al.*, 2014). Il n'est cependant pas clair comment Rab4 pourrait être capable de réguler différenciellement un trafic vers la membrane plasmique et un trafic vers l'appareil de Golgi. D'autres petites GTPases, telles que Rab11 et Rab6, pourraient aussi jouer un rôle dans le transport depuis les endosomes vers l'appareil de Golgi (Mallard *et al.*, 2002).

Wong et Munro 2014 ont réalisé une étude dans laquelle ils délocalisent artificiellement les golgines une à une sur les mitochondries (Wong et Munro, 2014). Il est alors possible d'étudier les vésicules amarrées aux mitochondries et de tirer des conclusions sur les spécificités de chaque golgine. Ils ont ainsi établi que Golgin-97, Golgin-245 et GCC88 (pour *GRIP and Coiled-Coil domain containing protein of 88 kDa*), trois golgines du Golgi *trans*, permettent l'amarrage de vésicules contenant le CD-MPR (*Cation-Dependent Mannose-6-Phosphate Receptor*). Une autre équipe a montré en utilisant ce même système que la déplétion du rétromère affectait la quantité de vésicules contenant CI-MPR amarrées par GCC88, mais pas celles amarrées par Golgin-245 et Golgin-97 (Cui *et al.*, 2019). Ces données suggèrent que l'amarrage au niveau de l'appareil de Golgi de vésicules formées via le rétromère est dépendant de GCC88. Allant dans ce sens, la déplétion de GCC88 affecte le retour au Golgi du CI-MPR, mais pas celui du CD-MPR, indépendant du rétromère (Seaman, 2004; Cui, Yang et Teasdale, 2019).

3.3.2.2 La réorientation vers l'appareil de Golgi médié par TIP47 et Rab9.

La petite GTPase Rab9 est localisée sur les endosomes tardifs et définit un sous-domaine distinct des membranes contenant Rab7 (Barbero, Bittova et Pfeffer, 2002). Plusieurs études

démontrent que Rab9 régule une voie de trafic permettant le retour des CI- et CD-MPR depuis les endosomes tardifs vers l'appareil de Golgi (Barbero, Bittova et Pfeffer, 2002; Kucera *et al.*, 2015). Cette voie de trafic dépend de la protéine *tail-interacting protein of 47 kD* (TIP47), qui interagit à la fois avec les MPR (Díaz et Pfeffer, 1998; Krise *et al.*, 2000; Orsel *et al.*, 2000) et Rab9 (Carroll *et al.*, 2001) et semble jouer un rôle d'adaptateur. L'interaction avec TIP47 est médiée par des signaux différents pour chaque MPR : TIP47 reconnaît un motif riche en proline dans la queue cytosolique du CI-MPR et un motif Phe-Trp dans celui du CD-MPR (Orsel *et al.*, 2000) (Díaz et Pfeffer, 1998). En accord avec un rôle d'adaptateur pour TIP47, son interaction avec les MPR augmente son affinité pour Rab9 (Carroll *et al.*, 2001).

La golgine GCC185 semble être impliquée dans l'amarrage des vésicules de cette voie de transport au niveau de l'appareil de Golgi. D'une part, GCC185 est capable de lier Rab9 (Reddy *et al.*, 2006), et d'autre part, il a été montré qu'elle est importante pour le retour des MPR au Golgi (Reddy *et al.*, 2006; Derby *et al.*, 2007). Les SNARE Syntaxine 10, Syntaxine 16, Vti1a et VAMP3 ont aussi été décrites comme importantes pour le trafic rétrograde du CD-MPR (Ganley, Espinosa et Pfeffer, 2008). De plus, Syntaxine 10 interagit avec GCC185 (Ganley, Espinosa et Pfeffer, 2008). Cela suggère qu'après leur amarrage au TGN par GCC185, les vésicules positives pour Rab9 fusionnent grâce à un complexe SNARE STX10-STX16-Vti1a-VAMP3.

3.3.2.3 La réorientation vers l'appareil de Golgi médié par AP5

De façon intéressante, l'équipe de M.S. Robinson a récemment montré que le complexe adaptateur de la clathrine AP5 joue aussi un rôle dans le retour du CI-MPR des endosomes tardifs vers l'appareil de Golgi (Hirst *et al.*, 2018). AP5 a été découvert plus récemment que les complexes AP1-4 (Hirst *et al.*, 2011) et a la particularité d'être hexamérique (les complexes AP1-4 sont tétramériques ; voir **Figure 11**). Il se compose de AP5 ζ , μ 5, β 5, σ 5 et des protéines *Spastic Paraplegia Gene 11* (SPG11) et SPG15 (Hirst *et al.*, 2011, 2013). SPG15 est capable de lier le CI-MPR et sortiline et la déplétion de AP5 ζ perturbe le recyclage du CI-MPR depuis les endosomes vers le Golgi (Hirst *et al.*, 2018). Cette voie semble indépendante du rétromère car la co-déplétion de AP5 et du rétromère ont des effets cumulatifs sur le trafic du CI-MPR (Hirst *et al.*, 2018). AP5 étant localisé aux endosomes tardifs (Hirst *et al.*, 2011, 2013), les auteurs proposent que cette voie puisse servir de voie de soutien à la voie dépendante du rétromère

pour le retour au Golgi de ces protéines (Hirst *et al.*, 2018). Cependant, il n'est pas exclu que AP5 fonctionne dans la même voie que Rab9 et TIP47.

3.3.3 La réorientation des cargos vers les compartiments matures de la voie d'endocytose

L'existence d'une voie de transport depuis les endosomes précoces vers les endosomes matures et impliquant l'adaptateur AP3 (**Figure 11**) a été proposée (Robinson, 2004). En effet, AP3 localise principalement sur les endosomes précoces (Robinson, 2004) et plusieurs protéines membranaires lysosomales, incluant LAMP1, CD63, CLN3 ou encore LIMP2, sont capables de recruter AP3 et dépendent de celui-ci pour leur transport vers les lysosomes (voir **4.3 Les voies de transport des protéines de la membrane du lysosome** ; Höning *et al.*, 1996; Le Borgne *et al.*, 1998; Dell'Angelica *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 1999; Hirst *et al.*, 1999; Rous *et al.*, 2002; Janvier *et al.*, 2003; Braulke et Bonifacino, 2009). Il a aussi été mis en évidence qu'en l'absence d'AP3, LAMP1 et CD63 se voient recyclées vers la membrane plasmique (Starcevic, Nazarian et Dell'Angelica, 2002; Peden *et al.*, 2004). AP3 s'avère aussi important pour la genèse de plusieurs organites associés aux lysosomes (LRO, pour *Lysosome Related Organelles*), incluant notamment les mélanosomes ou certaines vésicules synaptiques (Starcevic, Nazarian et Dell'Angelica, 2002; Stinchcombe, Bossi et Griffiths, 2004; Seong *et al.*, 2005). En lien avec cela, la protéine mélanosomale tyrosinase lie aussi AP3 (Höning, Sandoval et Von Figura, 1998; Theos *et al.*, 2005) et dépend de celui-ci pour accéder aux mélanosomes (Huizing *et al.*, 2001). Ensemble, ces données suggèrent que AP3 fonctionne dans le transport des LMP depuis les endosomes précoces vers les compartiments matures de la voie d'endocytose. On peut cependant se demander si AP3 agit uniquement en empêchant le recyclage de ces cargos vers la membrane plasmique, par exemple en séquestrant les LMP dans des sous-domaines endosomaux à l'écart des tubules de recyclage ; ou si AP3 agit en initiant la formation d'intermédiaires de transport à destination des endosomes matures.

Par microscopie électronique, AP3 a été observé sur des tubules émergeant des endosomes précoces (Peden *et al.*, 2004; Theos *et al.*, 2005). De plus, LAMP1, LAMP2 et tyrosinase sont enrichies dans ces tubulations positives pour AP3 (Peden *et al.*, 2004; Theos *et al.*, 2005). Finalement, il a récemment été montré que AP3 forme un complexe avec Rab4A, Rabénosyne-5 et la kinésine KIF3 au niveau des endosomes. Ces données suggèrent fortement

la génération d'intermédiaires de transport médiée par AP3 sur ces endosomes précoces (Nag *et al.*, 2018).

3.3.4 L'incorporation des cargos dans les vésicules intraluminales

Pour assurer la dégradation de cargos dans les endolysosomes, ceux-ci peuvent être inclus dans les vésicules intraluminales au niveau des endosomes précoces et tardifs. Pour beaucoup de récepteurs, leur ubiquitinylation constitue le marqueur décisif de ce processus (Cullen et Steinberg, 2018). L'inclusion de ces protéines dans les ILV est médiée par le recrutement de Hrs et STAM, composants du complexe ESCRT-0. Ces deux protéines lient l'ubiquitine et permettent l'agrégation des protéines ubiquitinylées (Christ *et al.*, 2017). L'intégration d'autres protéines, non ubiquitinylées, dans les ILV peut aussi être médiée par la protéine ALIX (Bissig et Gruenberg, 2014). C'est par exemple le cas des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, pour *G Protein-Coupled Receptors*) PAR1 et P2Y₁ (Dores *et al.*, 2012, 2016). Les complexes ESCRT-I et II sont ensuite recrutés et permettent la mobilisation de CHMP4. La polymérisation en hélice de CHMP4 induit la déformation de la membrane et à terme, la formation de la vésicule intraluminale (Schöneberg *et al.*, 2016).

La microscopie électronique a permis la caractérisation de sous-domaines recouverts d'un manteau de clathrine dans les endosomes précoces, adjacents aux sites de formation des ILV (Sachse, Urbé, *et al.*, 2002; Murk *et al.*, 2003). Ce manteau à clathrine a une apparence inhabituelle : il est relativement plat et se compose de deux strates denses aux électrons, la plus extérieure contenant la clathrine (Sachse, Urbé, *et al.*, 2002) (**Figure 16b**, flèches blanches). Ces manteaux sont dénués des adaptateurs à la clathrine AP1, AP2 ou AP3 (Sachse, Urbé, *et al.*, 2002), mais contiennent la protéine Hrs (Raiborg *et al.*, 2002; Sachse, Urbé, *et al.*, 2002; van Niel *et al.*, 2011). En plus de son domaine de liaison à l'ubiquitine, Hrs possède un domaine FYVE de liaison au PI3P et est capable de lier la clathrine (Raiborg *et al.*, 2001, 2002). De façon intéressante, plusieurs cargos, tels que l'EFGR (pour *Epidermal Growth Factor Receptor*) et le GHR (pour *Growth Hormone Receptor*) sont enrichis dans ces structures, mais pas le récepteur à la transferrine (TfR) (Sachse, Urbé, *et al.*, 2002). Pourtant, le résultat de la fusion du TfR et de l'ubiquitine localise dans ces sous-domaines de façon dépendante de Hrs (Raiborg *et al.*, 2002; Urbe *et al.*, 2003). Le manteau de clathrine étant cytosolique et la vésicule s'invaginant vers l'intérieur de l'endosome, la topologie est différente des autres cas de formation de vésicules médiées par la clathrine. Il est possible que, dans ce cas de figure,

la clathrine soit recrutée pour former un sous-domaine tenant les cargos qui doivent être dégradés à l'écart des tubules de recyclage.

D'autres voies permettent la formation des ILV indépendamment des ESCRT. Il a par exemple été montré que l'oligomérisation des protéines peut induire leur inclusion dans les ILV de façon indépendante des ESCRT (Fang *et al.*, 2007). Il a aussi été montré que l'inclusion dans des radeaux lipidiques, ainsi que la production de céramide et d'acide phosphatidique, sont déterminants pour l'inclusion dans les ILV de certaines protéines, indépendamment des ESCRT (Trajkovic *et al.*, 2008; Buschow *et al.*, 2009; Ghossoub *et al.*, 2014; Gassart *et al.*, 2015).

La tétraspanine CD63, elle-même incluse dans les ILV indépendamment des ESCRT (Fang *et al.*, 2007; Trajkovic *et al.*, 2008), joue un rôle de régulateur dans plusieurs de ces voies. Par exemple, la protéine PMEL (pour *PreMelanosome protein*), incluse dans les ILV indépendamment des ESCRT (Theos *et al.*, 2006), interagit avec CD63 et dépend de celle-ci pour son tri dans les ILV (van Niel *et al.*, 2011). De façon intéressante, les ILV générées via la voie dépendante des ESCRT ou via la voie dépendante de CD63 s'avèrent structurellement différentes (Edgar, Eden et Futter, 2014).

3.4 Les compartiments matures de la voie d'endocytose

3.4.1 Différencier lysosome et endosome tardif

Le terme de « lysosome » est relativement mal défini et souffre d'abus de langage, avec plusieurs articles qui tendent à associer le terme « lysosome » à tout compartiment positif pour un marqueur commun aux endosomes tardifs et lysosomes (très souvent LAMP1 ou LAMP2 ; Cheng *et al.*, 2018). Cela est dû à l'absence de marqueur disponible pour définir uniquement le lysosome (Scott, Vacca et Gruenberg, 2014). Ce compartiment a initialement été décrit comme le compartiment ultime de la voie d'endocytose, site acide de la dégradation des éléments endocytés. Il a été défini comme enrichi en protéines de la membrane du lysosome et en hydrolases acides, mais dénué de CI/CD-MPR. Cette définition biochimique était associée à une définition structurale définissant le lysosome comme une vacuole avec un cœur dense aux électrons et avec parfois la présence de membranes multi-lamellaires (Luzio, Pryor et Bright, 2007). Cependant, les compartiments couverts par ces deux définitions ne se recoupent pas totalement. Par exemple, les compartiments résultants de la fusion des

lysosomes avec les endosomes tardifs sont dénués de Cl/CD-MPR mais n'ont pas nécessairement cette densité aux électrons caractéristique que présentent les lysosomes (Bright, Davis et Luzio, 2016). Plus récemment, il a été observé que les lysosomes faisaient preuve d'une grande dynamique, étant capable de fusionner avec les endosomes tardifs mais aussi d'être reformés à partir de ceux-ci (Luzio, Pryor et Bright, 2007). Il a finalement été démontré en 2016, par microscopies photonique et électronique corrélées (CLEM, pour *Correlative Light-Electron Microscopy*), que ces structures denses aux électrons, définies comme étant des lysosomes, ne sont en réalité pas acides et sont dépourvues d'activité hydrolytique (Bright, Davis et Luzio, 2016). Bright *et al.* décrivent les lysosomes comme des stocks d'enzymes, similaires à des granules de sécrétion en attente d'un signal pour délivrer leur contenu (Bright, Davis et Luzio, 2016). Ils sont désignés « lysosomes terminaux de stockage » (*late storage lysosomes*) et les compartiments résultants de leur fusion avec les endosomes tardifs sont appelés « endolysosomes » (Luzio, Pryor et Bright, 2007; Bright, Davis et Luzio, 2016).

3.4.2 La formation des lysosomes

Les lysosomes sont donc définissables comme des compartiments transitoires, capables de fusion avec les endosomes tardifs et de reformation à partir de ceux-ci. De ces conclusions naît une nouvelle question : quels mécanismes permettent la reformation des lysosomes, compartiments particulièrement denses, à partir des endolysosomes, très différents structurellement ? Cette question reste encore largement sans réponse.

L'équipe de Li Yu a permis une nette avancée dans la compréhension de la reformation des lysosomes à partir des autolysosomes, résultats de la fusion entre autophagosomes et lysosomes. Ils ont démontré que, dans ces cas, la reformation des lysosomes, régulée par mTOR, était médiée par la formation de tubules par la membrane des autolysosomes (Yu *et al.*, 2010). Celle-ci est dépendante de la clathrine, recrutée sur les autolysosomes, mais aussi de AP2 et AP4 (Rong *et al.*, 2012). De plus, la formation de PI(4,5)P₂ sur ces autolysosomes est nécessaire (Rong *et al.*, 2012). Il est très probablement produit à partir du PI4P, phosphoinositide majeur des autophagosomes, par la kinase PIP5K1A, elle aussi nécessaire à la reformation des lysosomes à partir de ces membranes (Rong *et al.*, 2012). La kinésine KIF5B, recrutée par le PI(4,5)P₂, est également impliquée dans ce processus : elle entraîne la déformation de la membrane pour former les tubules (Du *et al.*, 2016). Il sera intéressant de

voir si ces mécanismes sont communs avec ceux de la reformation des lysosomes à partir des endolysosomes.

Il a récemment été montré que PIKfyve était nécessaire à la reformation des lysosomes depuis les endolysosomes (Bissig *et al.*, 2017). PIKfyve fait partie, avec FIG4 et VAC14, d'un complexe régulateur des niveaux de PI(3,5)P₂ sur les endosomes. PIKfyve et FIG4 ont une activité catalytique de kinase en position 5 de l'inositol et de phosphatase des phosphoinositide, respectivement (Mccartney, Zhang et Weisman, 2014). L'utilisation d'un inhibiteur de PIKfyve entraîne une déplétion des lysosomes et, de façon intéressante, le lavage de cette drogue fait apparaître des tubulations de la membrane des endolysosomes.

Le Ca²⁺ ainsi que le transporteur membranaire lysosomal du Ca²⁺ mucopolipine/TRPML1 ont été impliqués dans la reformation des lysosomes (Pryor *et al.*, 2000). Cependant, l'activité de transporteur ne semble pas être nécessaire pour la formation des tubules de reformation des lysosomes (Bissig *et al.*, 2017).

3.4.3 Les endosomes matures et les lysosomes accomplissent de nombreuses fonctions

3.4.3.1 Les lysosomes dans l'homéostasie de la cellule

La fonction la plus évidente des endolysosomes et lysosomes est la dégradation du contenu de la lumière endolysosomale. Celle-ci contient des éléments endocytés, mais aussi des composants du cytoplasme introduits dans la lumière par microautophagie ou par autophagie médiée par des chaperonnes. La microautophagie désigne le phénomène d'incorporation d'éléments du cytoplasme dans la lumière des endosomes par formation de vésicules intraluminales. Les éléments incorporés peuvent l'être aléatoirement ou, au contraire, faire l'objet d'une sélection (Li, Li et Bao, 2012). L'autophagie médiée par des chaperonnes désigne un mécanisme de translocation de protéines à travers la membrane endosomale (voir **4.1.1.2 LAMP2 et l'autophagie médiée par des chaperonnes**).

Les lysosomes permettent aussi la dégradation du contenu des autophagosomes. L'amarrage des deux compartiments nécessite LC3 sur la membrane autophagosomale et implique Rab7 ainsi que LAMP2 sur la membrane lysosomale. LC3 s'associe à plusieurs effecteurs de Rab7, incluant le complexe d'amarrage HOPS, mais aussi les protéines EGP5 et PLEKM1 (Zhao et Zhang, 2019). En condition de déprivation de glucose, la protéine golgienne GRASP55 (voir **2.2.1 Structure et fonctions de l'appareil de Golgi**) participe aussi à l'amarrage

en s'associant à la fois à LC3 et LAMP2 (voir **4.1.1.1 Structures et fonctions des LAMP**). La fusion est catalysée par la formation d'un complexe SNARE incluant STX7 et VAMP7 ou 8 (sur la membrane lysosomale) et STX17 et YKT6 (sur la membrane autophagosomale ; Zhao et Zhang, 2019).

Les nutriments résultants de la dégradation du contenu des endosomes, phagosomes et autophagosomes sont libérés dans le cytoplasme (Mony, Benjamin et O'Rourke, 2016), conférant un rôle essentiel des lysosomes dans l'homéostasie cellulaire. En parallèle, les (endo)lysosomes fonctionnent aussi comme des senseurs des niveaux de nutriments dans la cellule. En effet, la membrane lysosomale fonctionne comme une plateforme de recrutement pour plusieurs régulateurs de l'homéostasie cellulaire (Perera et Zoncu, 2016). mTORC1 (pour *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*), localisé à la membrane lysosomale par association à la petite GTPase lysosomale Rheb, est probablement le plus important de ces régulateurs (Perera et Zoncu, 2016). Il constitue le point de convergence de plusieurs voies de signalisation dépendantes des niveaux de nutriments. Il est notamment régulé par le niveau énergétique de la cellule et le ratio AMP/ATP via la kinase AMPK, par les récepteurs à l'insuline via IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) et la kinase Akt ou encore par le niveau d'acides aminés par le complexe Ragulator-Rag (Zheng *et al.*, 2016). En présence de nutriments, mTORC1 régule négativement l'autophagie ainsi que le facteur de transcription TFEB, régulateur clef de la biogenèse des lysosomes et de l'expression de plusieurs protéines de l'autophagie (Settembre *et al.*, 2011; Settembre et Medina, 2015; Napolitano et Ballabio, 2016).

3.4.3.2 La sécrétion du contenu des MVB et des lysosomes

Les endosomes tardifs sont capables de fusionner avec la membrane plasmique et de libérer ainsi leurs vésicules intraluminales, alors appelées exosomes, dans le milieu extracellulaire. Les exosomes sont impliqués dans la communication et l'échange de matériels entre cellules (Kowal, Tkach et Théry, 2014). De la même façon, cette fusion peut aboutir à la sécrétion non conventionnelle de protéines introduites dans la lumière des endosomes par autophagie médiée par des chaperonnes, telle que l'interleukine 1 β (Rabouille, 2017).

Les lysosomes sont aussi capables de fusion avec la membrane plasmique. Elle peut survenir dans des cas de lésions étendues de la membrane plasmique et joue un rôle dans la réparation (Jimenez et Perez, 2017). Le mécanisme par lequel cette sécrétion favorise la

réparation de la membrane plasmique est mal compris, mais il a été montré que l'activité protéolytique extracellulaire des hydrolases sécrétées y jouent un rôle primordial (Castro-Gomes *et al.*, 2016). Ce type de sécrétion est dépendant d'un relargage du calcium depuis la lumière du lysosome par la mucolipine et dépend de la synaptotagmine VII (Andrews, Almeida et Corrotte, 2014). Elle implique aussi SNAP23 (pour *synaptosome-associated protein of 23 kDa*) et, comme pour la fusion entre lysosomes et endosomes tardifs, la SNARE VAMP7 et la syntaxine 4 (Rao *et al.*, 2004).

3.4.3.3 Les compartiments associés aux lysosomes

Aux compartiments endosomaux ubiquitaires s'ajoutent tout un éventail de compartiments associés au lysosomes (LRO, pour *Lysosome Related Organelles*). Ce sont des compartiments dérivés des endosomes, mais, contrairement à ce que leur dénomination laisse penser, ils ne partagent parfois que peu de points communs avec les lysosomes (Delevoye, Marks et Raposo, 2019). De façon non exhaustive, il est possible de citer les mélanosomes dans les cellules pigmentaires, impliqués dans la pigmentation ; les compartiments du MHC classe II (MIIC, pour *Major Histocompatibility Complex II (MHCII) Compartment*) dans les lymphocytes, impliqués dans le chargement des complexes MHCII et la présentation d'antigènes ; les granules cytotoxiques des lymphocytes T et des cellules *Natural Killer* (NK), spécialisés dans la sécrétion de protéines cytotoxiques (Marks, Heijnen et Raposo, 2014; Delevoye, Marks et Raposo, 2019)...

4 Les voies de trafic des glycoprotéines de la membrane du lysosome

Une soixantaine de protéines insérées dans la membrane lysosomale (LMP, pour *Lysosomal Membrane Proteins*) a été identifiée (Schröder *et al.*, 2007, 2010). Cependant, le nombre de LMP est évalué à plus d'une centaine (Schröder *et al.*, 2007; Schwake, Schröder et Saftig, 2013). Parmi les protéines identifiées, se retrouvent les sous-unités de la v-ATPase, des transporteurs de sucres, d'acide aminés et de divers molécules, et plusieurs protéines de fonction inconnue (Schröder *et al.*, 2010). Malgré cette diversité, quatre glycoprotéines représentent plus de la moitié des protéines de la membrane lysosomale : LAMP1, LAMP2, CD63 et LIMP2 (Hunziker et Geuze, 1996; Schröder *et al.*, 2010). Ces quatre protéines sont aussi les premières LMP à avoir été identifiées (Hunziker et Geuze, 1996), et, en conséquence,

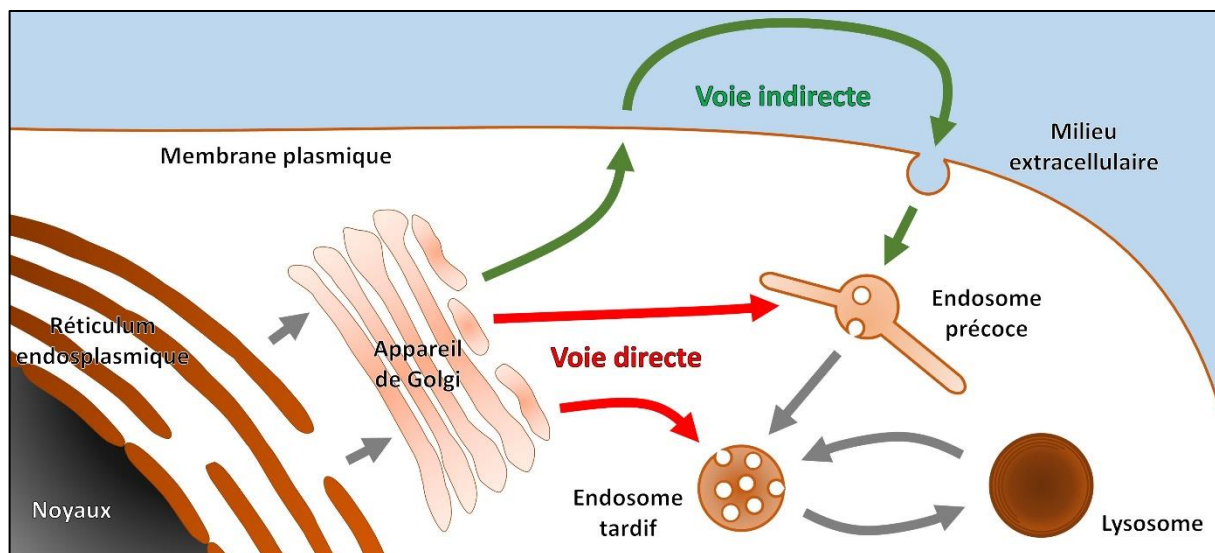


Figure 19. Voies de trafic des protéines de la membrane du lysosome.

celles dont le trafic a été le plus étudié. Leur étude, avec celle des MPR, a permis la description de deux voies de transport vers les endosomes (**Figure 19**). La voie dite « directe » par laquelle les LMP sont transportées directement de l'appareil de Golgi aux compartiments de la voie d'endocytose. La voie dite « indirecte » comprend le transport de la LMP vers la membrane plasmique, d'où la LMP accède aux endosomes par endocytose (Brault et Bonifacio, 2009). L'étude des voies de trafic des LMP s'accompagne souvent de leur comparaison à la voie de trafic directe suivie par les mannose-6-phosphate récepteurs, bien mieux caractérisée.

4.1 Présentation des principales glycoprotéines de la membrane du lysosome

4.1.1 Présentation de LAMP1 et LAMP2

4.1.1.1 Structures et fonctions des LAMP

Lysosome-Associated Membrane Protein 1 (LAMP1, aussi appelée CD107a et, anciennement, lgp107, lgp120, lgpA ou LEP100) est une protéine transmembranaire de type I exprimée de façon ubiquitaire. Son domaine luminal constitue la majeure partie de la protéine. Celui-ci s'organise en deux sous-domaines homologues, séparés d'une région charnière (**Figure 20a** ; Fukuda *et al.*, 1988; Carlsson et Fukuda, 1989, 1990). Son domaine cytosolique est composé de seulement 12 acides aminés (**Figure 27**). Le gène de la protéine LAMP2 (aussi appelée CD107b et, anciennement, lgp110, lgp96 ou lgpB) code pour trois isoformes d'épissage, LAMP2A-C, qui ne diffèrent que par leurs domaines transmembranaires et cytoplasmiques (**Figure 21** ; Eskelinen *et al.*, 2005). LAMP2A-C et LAMP1 partagent environ 57-

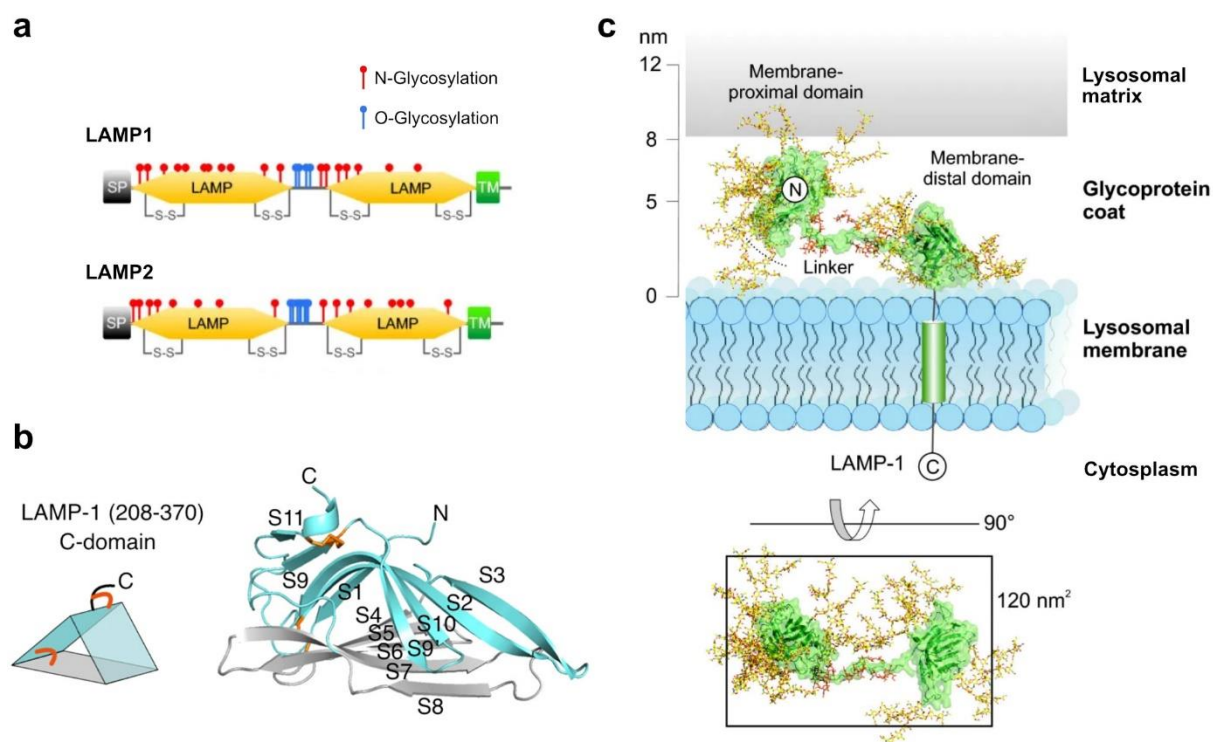


Figure 20. **Structure de LAMP1 et LAMP2.** (a) Représentation schématique de l'organisation des domaines au sein de LAMP1 et LAMP2. SP, Signal Peptide ; TM, domaine transmembranaire. Adapté d'après Wilke, Krausze et Büssow, 2012 . (b) Structure du domaine LAMP C-terminal de LAMP1, résolu par cristallographie (droite), et sa représentation schématique en forme de prisme triangulaire (gauche). Les liens orange représentent des ponts disulfures. Terasawa *et al.*, 2016. (c) Modèle hypothétique de la structure de LAMP1 développé *in silico* par Wilke, Krausze et Büssow, 2012, en se basant sur la structure du domaine LAMP de DC-LAMP. Dans ce modèle, LAMP1 adopte une configuration étendue, couvrant la membrane lysosomale. La chaîne polypeptidique est représentée en vert et les glycanes en jaune.

58% de similarité de séquence et ont des structures très proches (Wilke, Krausze et Büssow, 2012; Terasawa *et al.*, 2016). LAMP1 et LAMP2 sont les prototypes de la famille des protéines LAMP, caractérisée par la présence d'un domaine de type LAMP (ressemblant aux sous-domaines luminaux de LAMP1) adjacent au domaine transmembranaire (Wilke, Krausze et Büssow, 2012). Cette famille compte aussi DC-LAMP/LAMP3 (exprimée dans les cellules dendritiques et les pneumocytes de type II ; De Saint-Vis *et al.*, 1998; Salaun *et al.*, 2004), BAD-LAMP/UNC46 (exprimée dans les cellules dendritiques ; Defays *et al.*, 2011) et la macrosialine/CD68 (exprimée dans les macrophages ; Rabinowitz et Gordon, 1991). La structure du domaine LAMP a été résolue (Wilke, Krausze et Büssow, 2012; Terasawa *et al.*, 2016). Ce domaine forme une structure caractéristique de feuillet β agencés en forme de prisme triangulaire (**Figure 20b**).

Les protéines LAMP1 et LAMP2 sont massivement N-glycosylées, comme en témoigne l'écart entre la masse moléculaire apparente de ces protéines matures – environ 120 kDa – et celle des formes immatures déglycosylées par l'endoglycosidase H – environ 40-45 kDa (Chen

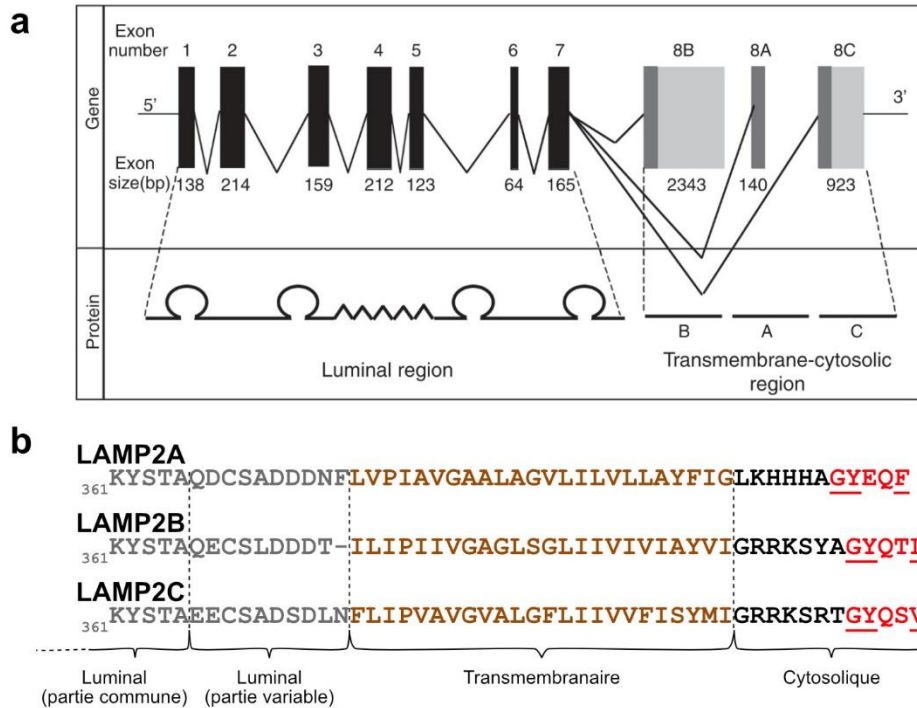


Figure 21. **Isoformes d'épissage de LAMP2.** (a) Représentation du gène *LAMP2* et de l'épissage de son ARN messager. Seuls les domaines transmembranaires et cytosoliques, ainsi qu'une dizaine d'acides aminés luminaux varient entre les différentes isoformes de LAMP2. Eskelinen *et al.*, 2005. (b) Les domaines cytosoliques des trois isoformes de LAMP2 ont une taille comparable et se terminent avec un signal de type GYXXΦ (en rouge, avec les résidus critiques soulignés).

et al., 1985; Carlsson *et al.*, 1988; Granger *et al.*, 1990). LAMP1 et LAMP2 portent, respectivement, 18 et 16 N-glycosylations (**Figure 20a**), largement complexifiées. Leurs glycosylation sont, notamment, riches en poly-N-acétyllactosamines (**Figure 22**) associés par des liaisons β 1-6 et en acides sialiques (Laferte et Dennist, 1989; Carlsson et Fukuda, 1990; Przybyło *et al.*, 2007). Les deux LMP possèdent aussi plusieurs site de O-glycosylation, tous réunis dans la région charnière (**Figure 20a** ; Carlsson, Lycksell et Fukuda, 1993).

Il a été proposé que ces glycosylations constituent un glycocalyx permettant la protection de la membrane ainsi que des protéines qui la composent contre les hydrolases luminales et le pH acide des endolysosomes (Hunziker et Geuze, 1996). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que le retrait des N-glycosylations portées par LAMP1 et LAMP2 entraîne leur dégradation en quelques heures (Kundra et Kornfeld, 1999). De plus, des lysosomes phagocytés sont rapidement dégradés, suggérant que la membrane lysosomale est bien sensible aux hydrolases (Henell, Ericsson et Glaumann, 1983). Dans ce contexte, Wilke *et al.* ont proposé un modèle théorique de la structure de LAMP1, basé sur la structure du domaine LAMP de DC-LAMP, dans laquelle la région charnière de LAMP1 permettrait à la

protéine d'adopter une conformation étendue, recouvrant la membrane lysosomale (**Figure 20c** ; Wilke, Krausze et Büssow, 2012).

Un rôle de protection de la membrane est aussi retrouvé dans un autre contexte. Lors de la dégranulation, les lymphocytes T (LT) et cellules *Natural Killers* (NK) surexposent LAMP1 à leur surface, du fait de la fusion des granules cytotoxiques avec la membrane plasmique (Betts *et al.*, 2003; Alter, Malenfant et Altfeld, 2004; Bryceson *et al.*, 2005). Il a été démontré que, dans ce contexte, la présence de LAMP1 à la surface cellulaire est importante pour la survie des cellules NK à leurs propres perforines et granzymes. Elle fonctionne en réduisant l'insertion des perforines dans la membrane des cellules NK (Cohnen *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que ce rôle de protection est dépendant des O-glycosylations portées par LAMP1 dans son domaine charnière (Cohnen *et al.*, 2013).

LAMP1 et LAMP2 sont aussi impliqués dans la fusion des phagosomes et des autophagosomes avec les lysosomes, avec une redondance partielle de ces deux gènes. Des mutations dans *LAMP2* sont responsables de la maladie de Danon, une myopathie et cardiomyopathie associée à des déficiences cognitives (Nishino *et al.*, 2000; Nishino, 2014). Au niveau cellulaire, elle se manifeste par l'accumulation d'autophagosomes dans les cellules musculaires et cardiaques (Nishino, 2014). Un modèle de souris dont le gène de *LAMP2* a été déplété a été généré (Tanaka *et al.*, 2000). La moitié de ces souris décèdent avant l'âge de 40 jours. Au niveau cellulaire, ces souris présentent une accumulation d'autophagosomes dans de nombreux tissus, incluant les muscles squelettiques, le myocarde ou les hépatocytes, associée à une dégradation par autophagie décrue (Tanaka *et al.*, 2000). Les lysosomes des

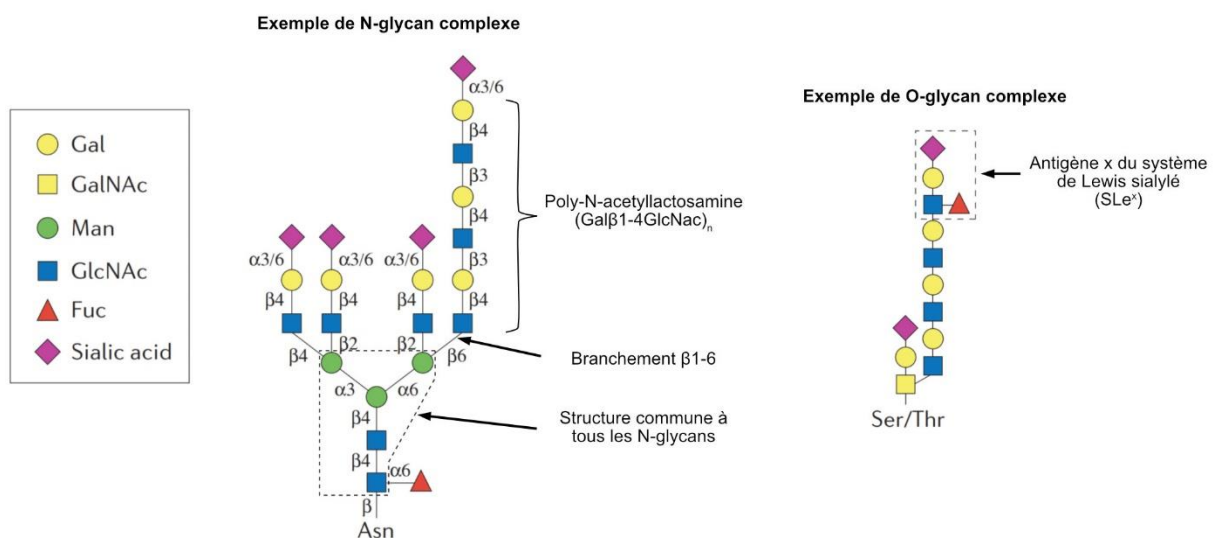


Figure 22. Exemples de N- et O-glycans complexes. Adapté d'après Pinho et Reis, 2015.

hépatocytes de ces souris présentent une morphologie normale, bien que certaines hydrolases lysosomales subissent des défauts de tri vers les lysosomes (Eskelinen *et al.*, 2002).

Des souris déficientes pour LAMP1 ont aussi été générées (Andrejewski *et al.*, 1999). Ces souris sont viables et ne présentent qu'une astroglie (accumulation d'astrocyte dans les tissus nerveux, généralement associée à une perte en neurones) modérée. De façon intéressante, ces souris présentent une surexpression de LAMP2 dans plusieurs tissus, notamment dans le myocarde, suggérant une redondance de LAMP1 et LAMP2 et des mécanismes de compensation (Andrejewski *et al.*, 1999). Cette hypothèse est validée par la génération de souris déficientes à la fois pour LAMP1 et LAMP2 (Eskelinen *et al.*, 2004). Ces souris meurent avant la naissance et, au niveau cellulaire, présentent aussi une accumulation d'autophagosomes dans plusieurs tissus. L'étude comparée de fibroblastes obtenus depuis ces embryons et de fibroblastes obtenus depuis les embryons déficients uniquement pour LAMP1 ou LAMP2 a permis de déterminer que l'accumulation d'autophagosomes est plus importante lorsque les deux gènes sont inactivés (Eskelinen *et al.*, 2004). Finalement, ces accumulations d'autophagosomes suite à la déplétion de LAMP2 ou LAMP1 + LAMP2 ont été imputées à un défaut de fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Gonzalez-Polo, 2005).

Après phagocytose, la maturation des phagosomes et leur fusion avec les lysosomes se déroulent correctement dans les cellules déplétées en LAMP1 ou LAMP2 (Huynh *et al.*, 2007). Mais lorsque les deux protéines sont déplétées, les phagosomes ne sont plus capables de mûrir et d'acquies Rab7 sur leur membrane (Huynh *et al.*, 2007). En conséquence, ils ne fusionnent pas non plus avec les lysosomes. De plus, les cellules déficientes pour les deux LMPs présentent des endolysosomes plus périphériques et moins mobiles (Huynh *et al.*, 2007). Les auteurs de ces études ont proposé que LAMP1 et LAMP2 sont impliqués dans l'interaction des endosomes avec les microtubules. Ainsi, selon cette hypothèse, l'absence de LAMP1 et LAMP2 impacterait la progression des phagosomes vers le centre cellulaire, et donc leur maturation. De la même manière, la probabilité de rencontre entre lysosomes et autophagosomes serait aussi diminuée (Huynh *et al.*, 2007; Schwake, Schröder et Saftig, 2013). En accord avec cette hypothèse, une étude a montré que, dans les cellules NK, LAMP1 est nécessaire pour le recrutement de p150^{glued}, sous-unité régulatrice du complexe dynéine/dynactine responsable du déplacement centripète des granules cytotoxiques (Mentlik *et al.*, 2010; Krzewski *et al.*, 2013).

Cependant, un rôle direct de LAMP2 dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes a été démontré très récemment (Zhang *et al.*, 2018). Dans cet article, les auteurs démontrent que la protéine GRASP55, qui participe au maintien de la structure golgienne (voir **2.2.1 Structure et fonctions de l'appareil de Golgi**), est mobilisée lors d'une déprivation en sucre pour participer à l'amarrage des autophagosomes aux lysosomes. Cette mobilisation est régulée par une GlcNAcylation portée par GRASP55. Lors d'une déprivation en glucose, la protéine est dé-GlcNAcylée et se relocalise aux autophagosomes par interaction avec LC3. Elle promeut l'amarrage aux lysosomes en interagissant avec LAMP2. De façon intéressante, la déplétion de GRASP55 mène, tout comme LAMP2, à l'accumulation d'autophagosomes non matures dans les cellules (Zhang *et al.*, 2018). Dans cette étude, GRASP55 dé-GlcNAcylée est capable d'immunoprécipiter LAMP2 mais pas LAMP1, ce qui pourrait expliquer l'asymétrie de la redondance de ces deux protéines dans la fusion entre autophagosomes et lysosomes.

Les protéines LAMP sont aussi impliquées dans les processus d'import à travers la membrane plasmique. Il a notamment été montré que LAMP1 et LAMP2 sont importantes pour la stabilisation à la membrane lysosomale de TAPL (pour *Transporter associated with Antigen Processing Like*), un complexe permettant l'import de polypeptides dans le lysosome (Demirel *et al.*, 2012). De plus, les isoformes A et C de LAMP2 sont au cœur des mécanismes de l'autophagie médiée par des chaperonnes.

4.1.1.2 LAMP2 et l'autophagie médiée par des chaperonnes

Contrairement à la macroautophagie ou la microautophagie, qui incorporent une partie du cytoplasme dans les endosomes, l'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA, pour *Chaperone-Mediated Autophagy*) permet une incorporation ciblée de protéines. Elle a lieu en réponse à des déprivations prolongées en nutriments ou à des stress oxydatifs (Catarino, Pereira et Girao, 2017). Elle fait intervenir, entre autres, des protéines chaperonnes et l'isoforme A de LAMP2.

Les protéines portant un motif KFERQ ou un motif biochimiquement similaire sont reconnues dans le cytoplasme par la chaperonne HSPA8 (Dice, 1990; Catarino, Pereira et Girao, 2017). Le complexe cible-chaperonne est recruté sur la membrane endosomale par interaction avec la queue cytoplasmique de LAMP2A (Cuervo et Dice, 1996). La protéine cible est transloquée à l'intérieur de l'endosome par un mécanisme mal compris qui requiert

l'oligomérisation de LAMP2A (Cuervo et Dice, 2000b). La chaperonne HSPA8, à la fois cytosolique et endosomale (Cuervo, Dice et Knecht, 1997), ainsi que HSP90, mais aussi d'autres chaperonnes, catalysent le dépliement de la protéine cible pendant sa translocation (Agarraberes, Terlecky et Dice, 1997; Salvador *et al.*, 2000; Agarraberes et Dice, 2001; Kiffin *et al.*, 2004; Catarino, Pereira et Girao, 2017)

La CMA est régulée notamment par la disponibilité de LAMP2A. Lorsque que la CMA n'est pas requise, LAMP2A est incorporée dans des radeaux lipidiques, d'où elle est clivée par la cathepsine A pour finalement être dégradée dans la lumière endolysosomale (Cuervo et Dice, 2000a; Cuervo *et al.*, 2003; Kaushik, Massey et Cuervo, 2006). Les mécanismes moléculaires permettant de rendre LAMP2A sensible à la cathepsine A ne sont pas déterminés. À l'inverse, en cas de déprivation nutritionnelle, la protéine GFAP (pour *Glial Fibrillary Acidic Protein*) interagit avec LAMP2A et la stabilise sous sa forme oligomérique, hors des radeaux lipidiques (Catarino, Pereira et Girao, 2017). Cette interaction est régulée par la phosphorylation de GFAP par la kinase Akt en réponse au niveau de GTP cellulaire (Catarino, Pereira et Girao, 2017).

De façon intéressante, la translocation d'ADN et d'ARN dans les endosomes a aussi été observée. Elle implique le transporteur SIDT2 (pour *Systemic RNA Interference Defective-1 Transmembrane family, member 2*), mais aussi l'isoforme C de LAMP2 (Aizawa *et al.*, 2017), qui agit comme un récepteur, liant les molécules d'ADN et d'ARN via son domaine cytosolique (Fujiwara, Furuta, *et al.*, 2013; Fujiwara, Kikuchi, *et al.*, 2013; Fujiwara *et al.*, 2015; Aizawa *et al.*, 2016, 2017). Cependant, les mécanismes de reconnaissance et de régulation sont encore mal compris.

4.1.2 Présentation de LIMP2

Lysosomal Integral Membrane Protein 2 (LIMP2), aussi appelée SCARB2 (*Scavenger Receptor B2*) est un membre de la superfamille des récepteurs éboueurs (*scavengers*) de classe B. Cette famille compte aussi SR-BI/SCARB1 et CD36/SCARB3, deux protéines jouant un rôle de transporteur de lipide depuis les lipoprotéines vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Abumrad *et al.*, 1993; Rigotti, Acton et Krieger, 1995; Acton *et al.*, 1996; Podrez *et al.*, 2000).

LIMP2 est une protéine transmembranaire de type III qui possède deux domaines transmembranaires. La majorité de la protéine est luminale, les domaines cytosoliques

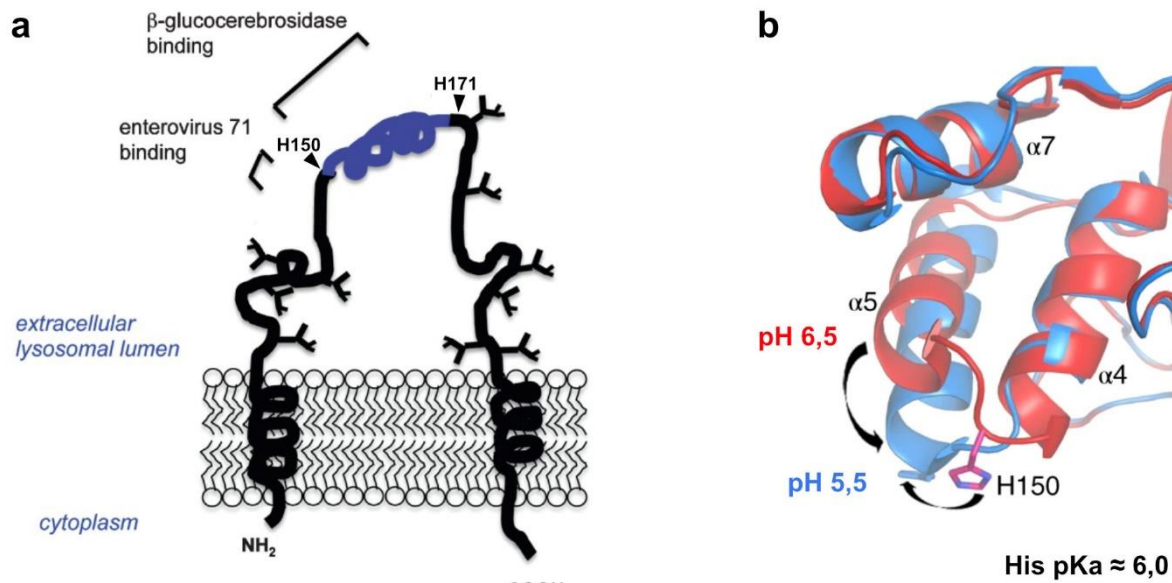


Figure 23. **Structure de LIMP2.** (a) Topologie de LIMP2. L'interaction avec la β-glucocérébroside est médiée par une hélice encadrée de deux histidines dont l'orientation et dépendante du pH. Adapté d'après Schwake, Schröder et Saftig, 2013. (b) Conformation des hélices α4-7 selon le pH. La protonation de l'histidine 150 déplace l'hélice α5. Adapté d'après Zhou *et al.*, 2019.

N-terminal et C-terminal de la protéine humaine ne possédant que 4 et 19 acides aminés, respectivement (**Figure 23a** ; Gonzalez *et al.*, 2014).

LIMP2 est fortement glycosylée. Avec 10 sites présumés de N-glycosylations, la protéine mature présente une masse apparente d'environ 85 kDa, alors que la forme immature déglycosylée par l'endoglycosidase H a une masse d'environ 55 kDa (Akasaki *et al.*, 1992).

LIMP2 fonctionne comme un récepteur pour le transport de l'enzyme β-glucocérébroside (βGC) vers les lysosomes (Reczek *et al.*, 2007; Malini *et al.*, 2015). La βGC est une hydrolase lysosomale dont des mutations sont à l'origine de la maladie de Gaucher, une maladie lysosomale (Gonzalez *et al.*, 2014). La βGC ne porte pas de mannose-6-phosphate pour son transport, mais s'associe à LIMP2 au niveau du réticulum endoplasmique (Reczek *et al.*, 2007). Des mutations dans le gène de LIMP2 sont responsables du syndrome de myoclonus d'action-insuffisance rénale (AMRF, pour *Action Myoclonus-Renal Failure*), une forme d'épilepsie myoclonique progressive dont plusieurs symptômes se recoupent avec ceux de la maladie de Gaucher (Gonzalez *et al.*, 2014).

Le relargage de la βGC dans les endolysosomes est régulée par le pH (Zachos *et al.*, 2012). La réduction du pH entraîne la protonation de deux résidus histidines critiques, His150 et His171, menant à un changement de conformation de LIMP2 et à une perte d'affinité pour βGC (**Figure 23** ; Zachos *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014).

Il a aussi été démontré que LIMP2 peut s'assembler sous forme d'homodimères (Conrad *et al.*, 2017). Sous sa forme dimérique, LIMP2 ne lie plus β GC mais s'associe à des lipides, dont notamment le cholestérol, la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine (Conrad *et al.*, 2017). De plus, LIMP2 semble important pour l'incorporation de phosphatidylsérine dans les membranes intracellulaires (Conrad *et al.*, 2017). Les auteurs de cette étude ont proposé que LIMP2 puisse agir à la membrane plasmique pour incorporer des lipides dans les membranes cellulaires, à l'image des fonctions de CD36 et SR-BI. Cela fait sens avec des données plus anciennes montrant que la surexpression de LIMP2 induit un élargissement des endosomes et un enrichissement du cholestérol dans les membranes endosomales (Kuronita *et al.*, 2002).

De façon intéressante, l'His150 est importante pour la dimérisation de LIMP2 (Conrad *et al.*, 2017), suggérant que la dimérisation de LIMP2 pourrait être dépendante du pH.

Il est aussi à noter qu'en plus de son rôle pathologique dans l'AMRF, LIMP2 joue aussi le rôle de récepteur pour plusieurs entérovirus, dont l'entérovirus 71 (EV71) et le virus Coxsackie (CV) A16 (Yamayoshi *et al.*, 2009, 2012; Zhou *et al.*, 2019). EV71 et CVA16 représentent les deux causes principales du syndrome pieds-mains-bouche (Yamayoshi *et al.*, 2012).

4.1.3 Présentation de CD63

La glycoprotéine CD63, (anciennement appelée LAMP3, LIMP1 ou encore Pltgp40) fait partie de la superfamille des tétraspanines, qui compte 33 membres chez l'humain (Maecker, Todd et Levy, 1997). Les tétraspanines sont caractérisées par la présence de quatre domaines transmembranaires, délimitant deux domaines luminaux/extracellulaires et deux domaines cytosoliques qui correspondent aux extrémités C et N-terminale (**Figure 24** ; Maecker, Todd et Levy, 1997). En plus de ces caractéristiques, les tétraspanines présentent aussi plusieurs résidus et motifs conservés, incluant plusieurs cystéines engagées dans des ponts disulfures structurant le second domaine luminal ; ainsi qu'un acide aminé polaire dans chacun des domaines transmembranaires 1, 3 et 4 (Hemler, 2003). Beaucoup de tétraspanines sont palmitoylées et s'agencent à la membrane plasmique en microdomaines (TEM, pour *Tetraspanin-Enriched Microdomain*). Cette organisation en TEM potentialise les fonctions des tétraspanines à la membrane plasmique, notamment dans l'adhérence cellulaire et la signalisation (Hemler, 2003; Levy et Shoham, 2005).

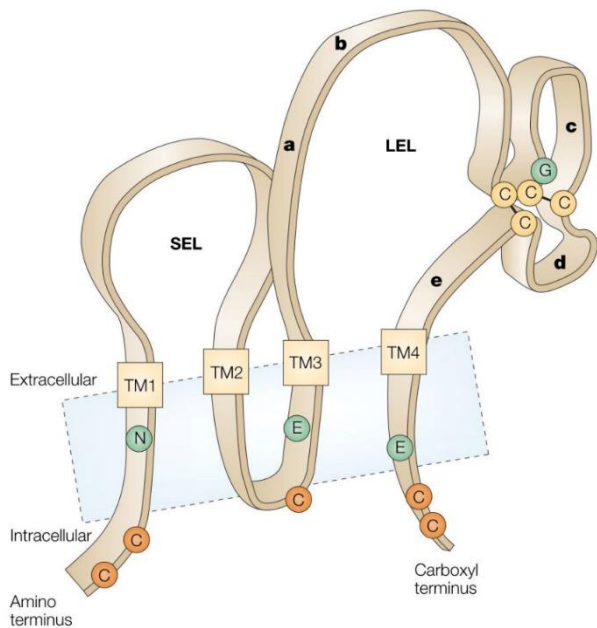


Figure 24. **Structure des tétraspanines.** Structure de la tétraspanine CD81. Les tétraspanines traversent la membrane à 4 reprises. Les résidus conservés parmi les tétraspanines sont représentés. SEL, *Small Extracellular Loop* ; LEL, *Large Extracellular Loop*. Levy et Shoham, 2005.

CD63 possède 3 sites présumés de N-glycosylations, tous présents dans son second domaine luminal (Metzelaars *et al.*, 1991). Il en résulte une forme mature de la protéine avec une masse apparente de 40-50 kDa, et une forme déglycosylée à environ 20-25 kDa. Comme plusieurs autres tétraspanines, CD63 porte aussi au moins une palmitoylation (Charrin *et al.*, 2002).

CD63 est environ 7 fois plus présente sur la membrane des ILV qu'à la membrane endosomale (**Figure 25** ; Escola *et al.*, 1998; Pols et Klumperman, 2009). En conséquence, CD63 est enrichie sur les exosomes sécrétés après fusion des MVB avec la membrane plasmique (Escola *et al.*, 1998). En plus de cette localisation, CD63 est aussi présente à la membrane plasmique, où elle peut éventuellement s'organiser en TEM avec d'autres tétraspanines (Rubinstein *et al.*, 1996). Certaines études suggèrent que cet équilibre entre CD63 à la membrane plasmique et dans les endosomes pourrait être régulé par plusieurs partenaires. CD63 interagit avec la protéine Synténine 1 (Latysheva *et al.*, 2006), une protéine régulant le trafic d'une multitude de protéines de la membrane plasmique (Beekman et Coffey, 2008). De plus, la surexpression de Synténine 1 enrichit CD63 à la surface cellulaire (Latysheva *et al.*, 2006). L'interaction entre les deux protéines a lieu via le domaine PDZ de Synténine 1 et la queue cytoplasmique C-terminale de CD63 (Latysheva *et al.*, 2006). Les auteurs de cette étude ont proposé que Synténine 1 agisse en masquant le signal d'endocytose de CD63 contenu dans cette région de la protéine (voir **4.3 Les voies de transport des protéines de la**

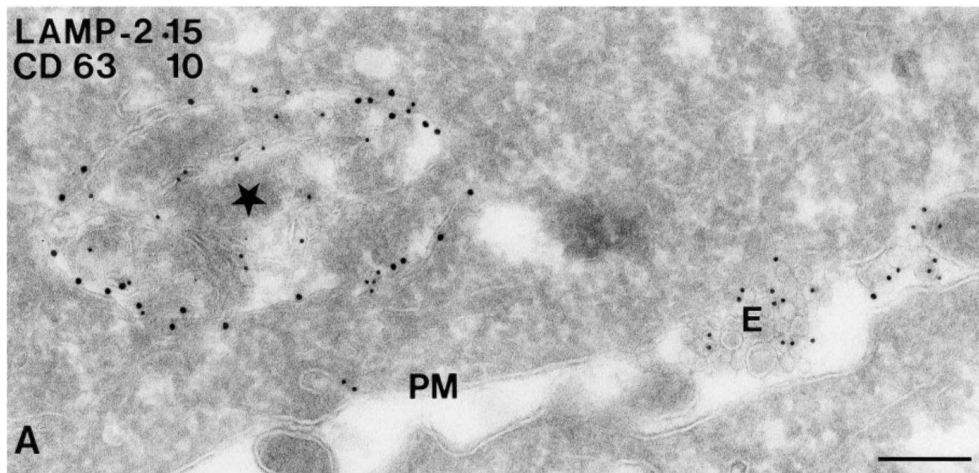


Figure 25. **Localisation de CD63 sur les vésicules intraluminales des endosomes et sur les exosomes.** Image de microscopie électronique à transmission de cellules RN (lymphocytes B) immunomarkée pour CD63 et LAMP2. CD63 localise sur des membranes intraluminales d'un compartiment MHCII (MIIC ; étoile noire) ainsi que sur des exosomes (E). PM, *Plasma Membrane* ; bar d'échelle : 200 nm. Escola *et al.*, 1998.

membrane du lysosome). D'autres régulateurs, comme la protéine L6-Ag/TM4SF1, recrutée aux TEM, semblent aussi impliqués dans la localisation de CD63 (Lekishvili *et al.*, 2008). Il a notamment été observé que la surexpression de L6-Ag diminue le niveau de CD63 en surface alors que la déplétion de L6-Ag par ARN interférent l'augmente (Lekishvili *et al.*, 2008).

CD63 interagit, directement ou indirectement, avec plusieurs sous-unités des intégrines, incluant $\beta 2$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et LFA-1, suggérant que cette tétraspanine participe activement au rôle d'adhérence cellulaire des TEM (Pols et Klumperman, 2009). De plus, comme d'autres tétraspanines, CD63 est aussi impliquée dans la transduction de signaux à partir de ces TEM (Levy et Shoham, 2005; Skubitz, 2019).

CD63 a aussi été impliquée dans la régulation du trafic de plusieurs cargos. Il a par exemple été montré que la localisation de la sous-unité β du complexe H,K-ATPase (HK β) est influencée par CD63 (Duffield *et al.*, 2003). HK β interagit avec CD63 et l'expression exogène de CD63 dans des cellules COS relocalise partiellement HK β de la membrane plasmique vers des endosomes (Duffield *et al.*, 2003). De la même manière, CD63 est aussi impliquée dans l'internalisation du récepteur de cytokines et corécepteur du VIH CXCR4 (Yoshida *et al.*, 2008). Les auteurs de cette étude ont montré que la déplétion de CD63 augmente les niveaux de CXCR4 en surface. De plus, l'expression exogène d'un mutant de délétion de CD63 (dont les domaines transmembranaires 1 et 2 et le domaine luminal 1 sont absents) relocalise CXCR4 aux endosomes (Yoshida *et al.*, 2008). La métalloprotéase MT1-MMP compte aussi parmi les

protéines affectées par CD63. CD63 lie directement MT1-MMP et favorise son transport vers les lysosomes, entraînant sa dégradation (Takino *et al.*, 2003).

Potentiellement en lien avec ces données, CD63 fonctionne aussi comme un régulateur de la biogenèse des ILV et de l'incorporation de protéines dans celles-ci (voir **3.3.4 L'incorporation des cargos dans les vésicules intraluminales**).

4.2 Les voies de trafic des récepteurs au mannose-6-phosphate et des hydrolases lysosomales

Les récepteurs au mannose-6-phosphate (MPR, pour *Mannose-6-Phosphate Receptor*) permettent le transport de la majorité des hydrolases lysosomales depuis le TGN jusqu'aux endosomes (Braulke et Bonifacio, 2009). Ils ne sont pas *stricto sensu* des LMP, puisqu'ils sont absents des endolysosomes et des lysosomes (Luzio, Pryor et Bright, 2007; Bright, Davis et Luzio, 2016). Cependant, leurs voies de trafic sont relativement bien décrites, offrant une référence de transport direct vers les endosomes à laquelle les voies de transport des LMP sont souvent comparées.

Deux récepteurs au mannose-6-phosphate ont été décrits. Le CD-MPR (pour *cation dependent-MPR*), avec une masse moléculaire de 46 kDa, et dont la liaison au mannose-6-phosphate dépend de la présence de cations divalents, est aussi appelé MPR46. Le CI-MPR (pour *cation independent-MPR*) a une masse d'environ 300 kDa et est aussi appelé MPR300 ou IGF2R (pour *Insulin-like Growth Fractor 2 Receptor*). Ces deux récepteurs sont des protéines transmembranaires de type I. CI-MPR fonctionne comme un dimère et contient deux sites de liaison au mannose-6-phosphate (M6P), alors que le CD-MPR contient un seul site de liaison au M6P mais fonctionne comme un homodimère (**Figure 26b** ; Ghosh, Dahms et Kornfeld, 2003). Ces deux protéines sont aussi palmitoylées (Ghosh, Dahms et Kornfeld, 2003).

Plus d'une cinquantaine d'hydrolases lysosomales ont été décrites. La majorité d'entre-elles s'associe aux MPR pour leur transport vers les endosomes. Pour ce faire, ces enzymes, glycosylées dans le RE, sont prises en charges dans le TGN par un couple d'enzymes permettant l'ajout d'un groupement phosphate sur la position 6 d'un ou plusieurs mannosyles. Cette réaction se fait en deux étapes (**Figure 26a**) : 1) ajout sur un mannosyle d'un GlcNAc-1-phosphate par une liaison α 1-6 (créant une liaison phosphodiester) par le complexe GlcNAc-1-phosphotransferase (N-acetylglycosaminyl-1-phosphotransferase) ; puis 2) retrait du

recrutement d'adaptateurs GGA (Puertollano *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Doray, Bruns, *et al.*, 2002).

De façon intéressante, la fonctionnalité du signal DXXLL est régulée par phosphorylation par la kinase de la caséine 2 (CK2, pour *Casein Kinase 2*) sur une sérine comprise dans le motif acide (₂₆₅EESEERDDHLL₂₇₅ pour CD-MPR et ₂₄₈₂DDSEEDLL₂₄₈₉ pour CI-MPR ; Méresse *et al.*, 1990; Braulkesii, 1993; Korner, Herzog et Weber, 1994; Kato *et al.*, 2002). Cette phosphorylation potentialise le recrutement de GGA (Kato *et al.*, 2002; Shiba *et al.*, 2004) et est importante pour l'export des MPR de l'appareil de Golgi (Méresse *et al.*, 1990; Chen, Yuan et Lobel, 1997).

En plus de ce signal, les MPR possèdent aussi plusieurs motifs d'interaction avec l'adaptateur AP1 (Höning *et al.*, 1997; Ghosh et Kornfeld, 2003, 2004a; Stöckli, Höning et Rohrer, 2004), incluant des signaux de type tyrosine YXXΦ, de type di-leucine (D/E)XXXL(L/I) ou de type acide (**Figure 27** ; Höning *et al.*, 1997; Ghosh et Kornfeld, 2003, 2004; Stöckli, Höning et Rohrer, 2004). Doray *et al.* ont montré que AP1 colocalise avec GGA2 et le CI-MPR au TGN. De plus, AP1 interagit avec les GGA via sa sous-unité γ (Doray, Ghosh, *et al.*, 2002). Ces observations ont mené les auteurs à proposer que AP1 et les GGA coopèrent pour le tri des MPR au TGN. Cependant, la déplétion de la sous-unité μ1A de AP1, ou la délocalisation du complexe AP1 sur les mitochondries, relocalise les MPR au niveau des endosomes, suggérant plutôt un rôle d'AP1 dans le retour des MPR à l'appareil de Golgi (Meyer *et al.*, 2000; Robinson, Sahlender et Foster, 2009). De plus, il a récemment été montré que la déplétion de l'adaptine γ n'empêche pas l'export du Golgi du CD-MPR inséré dans le système RUSH (Chen *et al.*, 2017). Le rôle exact de AP1 dans le trafic des MPR reste donc encore à définir. De façon intéressante, il a été montré que le CD-MPR est ségrégué d'autres cargos, comme le récepteur à la transferrine ou LAMP1, au niveau de l'appareil de Golgi. Ce résultat suggère que la formation des complexes MPR-hydrolases, ainsi que leur export, pourraient se faire dans des régions dédiées du TGN (Chen *et al.*, 2017).

Vraisemblablement, arrivées au niveau des endosomes, les vésicules voient leur manteau démantelé et fusionnent avec les endosomes. Cependant, les mécanismes d'amarrage et de fusion ne sont pas définis. De même, la nature exacte des endosomes avec lesquels ces vésicules fusionnent n'est pas claire. En contact avec l'acidité de la lumière endosomale, les hydrolases se dissocient des MPR (Braulke et Bonifacio, 2009). Le retour des MPR à l'appareil de Golgi est opéré avant que ceux-ci n'atteignent les endolysosomes et

lysosomes. Pour ce faire, le CI-MPR emprunte la voie dépendante du rétromère, la voie dépendante de Rab9/TIP47 ainsi que par celle dépendante de AP5, alors que le CD-MPR ne semble emprunter que la voie dépendante de Rab9/TIP47 (voir **3.3.2 La réorientation des cargos vers l'appareil de Golgi**).

Une faible proportion des MPR est aussi observée à la membrane plasmique (Braulke *et al.*, 1987; Geuze *et al.*, 1988; Breuer *et al.*, 1997), supposément due à un recyclage au niveau des endosomes ou à un tri incomplet au niveau de l'appareil de Golgi. En surface, le CI-MPR est capable de lier l'IGF2, et régule ainsi son endocytose et sa dégradation dans les lysosomes (Braulke et Bonifacino, 2009). La présence des MPR en surface permet aussi l'endocytose d'hydrolases qui auraient échappé aux MPR au niveau du TGN (Hasanagic, Waheed et Eissenberg, 2015). Pour leur endocytose, les MPR possèdent plusieurs signaux qui recrute le complexe adaptateur AP2 (**Figure 27** ; Johnson, Chan et Kornfeld, 1990; Jadot *et al.*, 1992; Denzer *et al.*, 1997; Höning *et al.*, 1997; Storch et Braulke, 2001).

D'autres hydrolases, dépourvues de mannose-6-phosphate, sont prises en charge par d'autres récepteurs, comme sortiline et SorLA (pour *Sortilin-Related receptor* ; Saftig et Klumperman, 2009). La sortiline, une protéine transmembranaire de type I d'environ 95 kDa, prend par exemple en charge la sphingomyélinase acide ou de la prosaposine (Lefrancois *et al.*, 2003; Ni et Morales, 2006). Il est aussi possible qu'elle participe au trafic des cathepsines D et H (Canuel *et al.*, 2008).

La sortiline et SorLA opèrent très probablement via les mêmes voies de trafic que les MPR. Elles possèdent elles aussi des motifs de liaison aux GGA (Nielsen, Madsen et Petersen, 2001; Nielsen *et al.*, 2007). De plus, la sortiline colocalise avec le CI-MPR dans les vésicules recouvertes de clathrine autour de l'appareil de Golgi (Mari *et al.*, 2008). Insérée dans le système RUSH, la sortiline quitte l'appareil de Golgi dans les mêmes vésicules que le CD-MPR RUSH et celles-ci sont positives pour GGA1 (Chen *et al.*, 2017). Pour son retour à l'appareil de Golgi, la sortiline est capable de suivre la voie rétrograde dépendante du rétromère et probablement celle dépendante de AP5 (voir **3.3.2 La réorientation des cargos vers l'appareil de Golgi**).

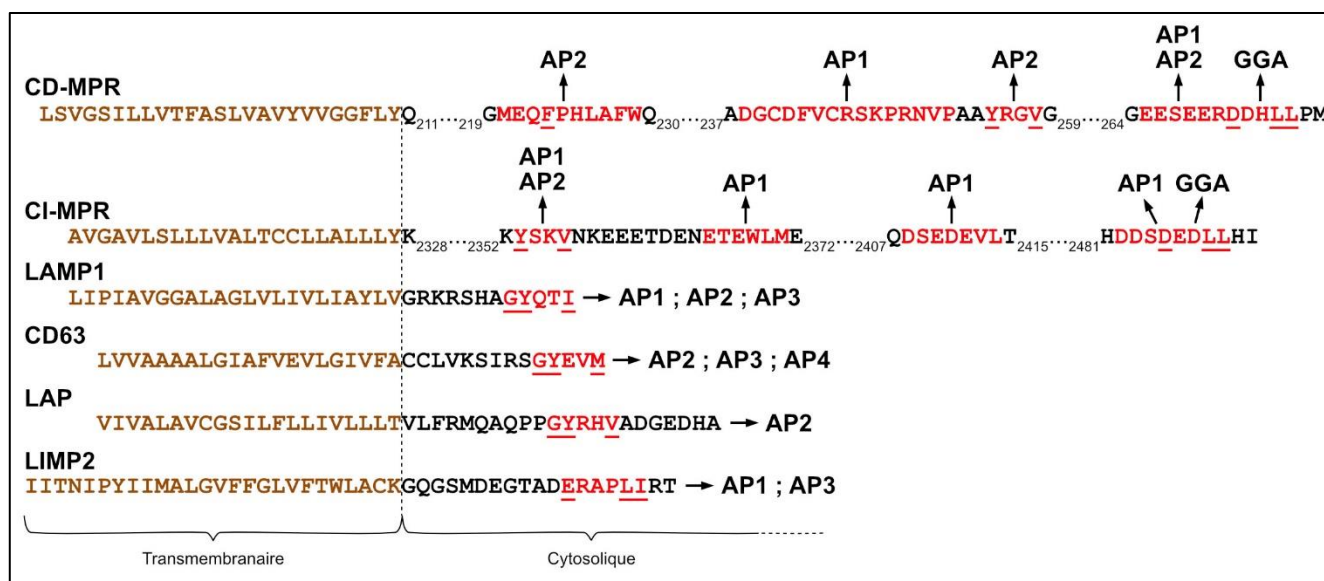


Figure 27. Signaux cytoplasmiques des récepteurs au mannose-6-phosphate et de quelques protéines de la membrane du lysosome. Les motifs de recrutement des différents adaptateurs sont présentés en rouge. Les résidus critiques sont soulignés.

4.3 Les voies de transport des protéines de la membrane du lysosome

4.3.1 La voie de transport de LIMP2

La voie de trafic de LIMP2 est supposée directe (Gonzalez *et al.*, 2014), du fait de l'impossibilité d'observer LIMP2 à la membrane plasmique au cours de son transport (Vega *et al.*, 1991; Obermüller *et al.*, 2002). Son transport vers les lysosomes est dépendant d'un signal de type di-leucine (D/E)XXXL(L/I) dans sa queue cytoplasmique C-terminale (Figure 27 ; Vega *et al.*, 1991; Ogata et Fukuda, 1994; Sandoval *et al.*, 1994, 2000; Tabuchi, Akasaki et Tsuji, 2000). De façon intéressante, plusieurs études ont montré que ce signal recrute AP1 et AP3, mais pas AP2 ni AP4 (Höning, Sandoval et Von Figura, 1998; Le Borgne *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1999; Janvier *et al.*, 2003). À la vue de ces données, il a été proposé que LIMP2 soit pris en charge par AP1 pour son export du Golgi dans des vésicules recouverte de clathrine, puis par AP3 au niveau des endosomes (Fujita *et al.*, 1999).

Cependant, il est à noter que récemment, Zhao *et al.* ont publié une structure du domaine luminal de LIMP2, définie par cristallographie, arborant un mannose-6-phosphate sur l'une de ses glycosylations. Ils ont aussi montré que le domaine luminal de LIMP2 est capable de s'associer au CI-MPR *in vitro* (Zhao *et al.*, 2014). Ces données contrastent avec une étude plus ancienne montrant que la β GC est toujours capable d'atteindre les lysosomes dans

des cellules déplétées pour les deux MPR (Reczek *et al.*, 2007). De plus, Blanz *et al.* ont montré, d'une part, que LIMP2 n'est pas immunoprécipité par un anticorps anti-mannose-6-phosphate et que, d'autre part, la déplétion des deux MPR ou l'inactivation de l'activité de la GlcNAc-1-phosphotransférase n'affecte pas la localisation lysosomale de LIMP2 ni n'augmente sa présence à la membrane plasmique (Blanz *et al.*, 2015). Blanz *et al.* proposent que le groupement mannose-6-phosphate observé par Zhao *et al.* soit un artéfact dû à la surexpression de la protéine (Blanz *et al.*, 2015).

4.3.2 Les voies de transport d'autres LMP à signal di-leucine

Le transport de plusieurs autres LMP dépend aussi d'un signal de type di-leucine. On peut notamment citer CLN3, qui possède un signal di-leucine associé à un motif acide (Kyttälä *et al.*, 2004; Storch, Pohl et Braulke, 2004). Il a été montré que son transport vers les lysosomes dépend d'AP1 et d'AP3 (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Braulke et Bonifacino, 2009).

Le transport de la protéine mucopolysaccharidase 1 (TRPML1) dépend aussi d'un signal di-leucine et de AP1 mais pas de AP3 (Miedel *et al.*, 2006; Vergara-Jauregui et Puertollano, 2006).

Le transport de la protéine tyrosinase vers les mélanosomes est aussi médié par un signal di-leucine (Blagoveshchenskaya, Hewitt et Cutler, 1999; Calvo *et al.*, 1999; Simmen *et al.*, 1999). Celui-ci recrute AP3 (Höning, Sandoval et Von Figura, 1998) et possiblement AP1 (Höning, Sandoval et Von Figura, 1998; Theos *et al.*, 2005). AP3 a été impliqué dans son trafic vers les mélanosomes (Huizing *et al.*, 2001).

De même, le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHCII, pour *Major Histocompatibility Complex II*) dépend aussi d'un signal de type di-leucine pour son accès aux MIIC (*MHCII Compartment*, un organelle associé aux lysosomes). Son trafic vers ce compartiment est indirect et dépend de AP2 mais pas de AP1 (Dugast *et al.*, 2005; McCormick, Martina et Bonifacino, 2005).

4.3.3 Les voies de transport de LAMP1 et LAMP2

La voie de transport empruntée par les LAMP, directe ou indirecte, a été sujette à controverse dès la découverte de ces protéines, dans les années 1980-1990, et la question n'est toujours pas tranchée. Un signal de type GYXXΦ (Φ désignant un acide aminé hydrophobe encombrant), présent dans la queue cytoplasmique des LAMP, est nécessaire pour leur transport jusqu'aux endosomes tardifs et lysosomes (₄₁₃GYQTI-COOH dans la séquence humaine de LAMP1 ; la séquence exacte dans LAMP2 diffère selon l'isoforme, voir **Figure 21b** ;

Williams et Fukuda, 1990; Hunziker *et al.*, 1991; Harter et Mellman, 1992; Guarnieri *et al.*, 1993; Honing et Hunziker, 1995). Des mutations dans ce signal relocalise LAMP1 à la membrane plasmique. De façon intéressante, la distance entre ce signal et la membrane plasmique est aussi importante (Williams et Fukuda, 1990). Le signal de LAMP1 est suffisant pour réorienter des protéines de la membrane plasmique vers les lysosomes (Mathews, Martinie et Fambrough, 1992; Guarnieri *et al.*, 1993; Le Borgne *et al.*, 1998). De plus, le domaine luminal de LAMP1, lorsqu'exprimé seul, est sécrété (Mathews, Martinie et Fambrough, 1992). Ces données suggèrent que le signal GYXXΦ porté par LAMP1 est l'unique déterminant de sa localisation lysosomale. Il a été montré que ce signal, dans LAMP1, permet le recrutement de AP1, AP2 et AP3 (Höning *et al.*, 1996; Le Borgne *et al.*, 1998).

Par microscopie électronique, LAMP1 a été localisée dans des vésicules adjacentes au TGN, couvertes de clathrine et positives pour la sous-unité γ de AP1, suggérant que AP1 pourrait être responsable de son export de l'appareil de Golgi (Höning *et al.*, 1996). Cependant, cette conclusion contraste avec une autre étude qui, en générant *in vitro* des vésicules dérivées du TGN, a déterminé que LAMP1 est localisée dans compartiments post-Golgi dépourvus d'adaptine γ ou du CD-MPR (Karlsson et Carlsson, 1998). De plus, LAMP1 est toujours capable d'atteindre les lysosomes dans des cellules déficientes en AP1 (Meyer *et al.*, 2000).

Si LAMP1 atteint la membrane plasmique après son départ du Golgi, ou s'il est directement transporté aux endosomes, n'est pas clair. Dans les années 1980-1990, plusieurs études ont fourni des données en faveur d'une voie directe pour LAMP1 (Green *et al.*, 1987; Harter et Mellman, 1992; Akasaki *et al.*, 1995). Ces études se basaient, notamment, sur l'absence d'apparition de LAMP1 en surface au cours de son transport, ainsi que sur sa cinétique, LAMP1 accédant rapidement aux lysosomes après néosynthèse. D'autres études ont proposé l'existence d'une voie indirecte. Ces études se basaient sur l'observation que, dans certaines cellules, LAMP1 peut effectivement être observée en surface, et, d'autre part, il est possible d'observer l'endocytose d'anticorps anti-LAMP1 (Lippincott-Schwartz et Fambrough, 1986, 1987; Furuno, Shinji, *et al.*, 1989). Il a aussi été démontré, par courte incubation des cellules en [³⁵S]-méthionine puis lavage (*pulse-chase*) et biotinylation de surface, que LAMP2, après néosynthèse, passe par la membrane basolatérale au cours de son transport vers les lysosomes dans des cellules MDCK (Nabi *et al.*, 1991). Harter et Mellman ont démontré, en utilisant cette même méthode, que la détection de LAMP1 en surface au

cours de son transport dépend grandement de son niveau d'expression (Harter et Mellman, 1992). Il est alors proposé que, dans des conditions de faible expression de LAMP1, celle-ci emprunterait une voie directe vers les endosomes, mais que dans certains types cellulaires une expression plus élevée de LAMP1 mènerait à un débordement du système de tri et un passage de LAMP1 par la membrane plasmique (Harter et Mellman, 1992; Braulke et Bonifacino, 2009). Que ce soit par voie directe ou indirecte, des expériences de *pulse-chase* ont mis en évidence que LAMP1 accède à la voie d'endocytose depuis les endosomes précoces (Niwa *et al.*, 2003; Cook, Row et Davidson, 2004).

À la membrane plasmique, LAMP1 est enrichi dans des puits à clathrine (Furuno, Ishikawa, *et al.*, 1989) et son endocytose est dépendante d'AP2, de la clathrine et de la dynamine (Janvier et Bonifacino, 2005). Le trafic de LAMP1 vers les endosomes tardifs et lysosomes est aussi dépendant d'AP3. Il a été montré que AP3 et LAMP1 colocalisent sur les tubulations des endosomes précoces. De plus, LAMP1 se voit recyclé à la membrane plasmique dans des cellules déficientes en AP3 (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Peden *et al.*, 2004), suggérant que AP3 est nécessaire pour la réorienter LAMP1 depuis les endosomes précoces vers les endosomes tardifs et/ou les lysosomes.

Curieusement, le dernier acide aminé du signal GYXXΦ de LAMP1 (l'Ile dans ⁴¹³GYQTI-COOH) semble important pour sa localisation aux lysosomes. La mutation de cette isoleucine en d'autres résidus hydrophobes encombrants (Met, Leu, Val ou Phe) n'empêche pas LAMP1 d'accéder aux endosomes, mais semble déplacer la population lysosomale de LAMP1 aux endosomes tardifs (Akasaki *et al.*, 2010, 2014). L'isoleucine terminale serait donc nécessaire pour que LAMP1 accède aux lysosomes terminaux. En lien avec cela, les 3 variants d'épissage de LAMP2, qui présentent un acide aminé C-terminal différent (**Figure 21**), localisent à des compartiments endosomaux différents, et ce, de façon dépendante du résidu C-terminal (Gough et Fambrough, 1997).

Récemment, deux études sont venues bousculer ces visions des voies de trafic de LAMP1. Pols *et al.* ont montré par une étude de microscopie électronique que LAMP1 et LAMP2, en plus de se localiser sur des vésicules recouvertes de clathrine à proximité du Golgi, sont aussi présentes dans des compartiments particuliers (Pols, van Meel, *et al.*, 2013). Ceux-ci ne possèdent pas de manteaux, sont positifs pour TGN46 mais négatifs pour le CI-MPR, et peuvent présenter des membranes intraluminales caractéristiques. Ces structures sont aussi positives pour Vps41, une sous-unité des complexes d'amarrage HOPS et CORVET, ainsi que

VAMP7. Ces compartiments sont aussi présents à proximité des endosomes tardifs et s'accumulent lorsque Vps41 ou VAMP7 sont déplétés. Dans cet article, les auteurs proposent que ces compartiments puissent être des intermédiaires de transport d'une voie directe TGN-endosomes (Pols, van Meel, *et al.*, 2013). Ces données contrastent avec une seconde étude, plus récente. Chen *et al.* ont incorporé la protéine LAMP1 de rat dans le système RUSH. Ils ont ainsi pu observer que, dans des cellules HeLa, LAMP1 RUSH quitte l'appareil de Golgi dans des structures tubulo-vésiculaires dépourvues du CD-MPR (Chen *et al.*, 2017). Ces structures contiennent aussi le VSV-G ou le récepteur à la transferrine et sont transportées vers la membrane plasmique avec laquelle elles fusionnent. L'export de LAMP1 du Golgi via ces structures est indépendant de son signal ou des adaptateurs AP1-4. Cependant, en absence d'AP2, ou lorsque LAMP1 est muté dans son signal, celui-ci s'accumule à la membrane plasmique. Ainsi, LAMP1 RUSH est transportée de façon indirecte et son signal ne semble indispensable que pour son endocytose.

4.3.4 La voie de transport de CD63

Le trafic de CD63 vers les endosomes dépend aussi d'un signal GYXXΦ dans son domaine cytosolique C-terminal (₂₃₄GYEVM-COOH, voir **Figure 27** ; Pols et Klumperman, 2009), sa mutation bloquant CD63 à la membrane plasmique (Rous *et al.*, 2002). La queue cytoplasmique de CD63 est suffisante pour sa localisation aux endosomes tardifs et lysosomes. En effet, lorsque celle-ci est greffée à CD8, une protéine principalement présente à membrane plasmique, la protéine chimère est relocalisée aux endosomes tardifs et lysosomes (Rous *et al.*, 2002). Ce signal permet le recrutement de AP2 et AP3 (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Hirst *et al.*, 1999; Rous *et al.*, 2002) mais ne semble pas être capable de lier la sous-unité μ1 de AP1 (Hirst *et al.*, 1999). De plus la déplétion par ARN interférent de μ1A n'altère pas le trafic de CD63 (Janvier et Bonifacino, 2005).

La déplétion de la sous-unité μ2 d'AP2 par interférence à ARN augmente la présence de CD63 à la membrane plasmique (Janvier et Bonifacino, 2005). Cet effet est aussi observé après synchronisation du trafic par incubation en bréfeldine A suivie de lavages, suggérant que CD63 suit une voie indirecte vers les lysosomes (Janvier et Bonifacino, 2005). Cependant, contrairement à LAMP1, une proportion de CD63 est toujours capable d'atteindre des compartiments intracellulaires malgré l'interférence à ARN (Janvier et Bonifacino, 2005; Pols et Klumperman, 2009). De façon intéressante, cela peut s'expliquer par le fait que CD63 peut

aussi être internalisée dans des cavéoles (Pols et Klumperman, 2009), donc de façon indépendante de la clathrine et d'AP2.

Le complexe AP3 est important pour le trafic de CD63. En son absence, CD63 se voit surexposée à la membrane plasmique (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Peden *et al.*, 2004).

De façon intéressante, la sous-unité $\mu 4$ de AP4 semble être capable de s'associer avec le signal de CD63 (Hirst *et al.*, 1999). Cependant, son rôle dans le trafic de CD63 est méconnu.

4.3.5 La voie de transport de LAP

La protéine LAP (pour *Lysosomal Acid Phosphatase*) est une enzyme lysosomale. Elle est cependant synthétisée comme une protéine membranaire de type I, dont le domaine luminal, qui porte l'activité enzymatique, est clivé lorsque la protéine atteint les endolysosomes (Waheed *et al.*, 1988; Hunziker et Geuze, 1996). LAP suit une voie de trafic indirecte : elle est transportée jusqu'à la membrane plasmique, d'où elle est rapidement endocytée (Braun, Waheed et von Figura, 1989; Obermüller *et al.*, 2002). Elle subit plusieurs cycles de recyclage à la membrane plasmique avant de pouvoir atteindre les endosomes tardifs (Braun, Waheed et von Figura, 1989; Obermüller *et al.*, 2002). LAP porte dans son domaine cytosolique un signal de type GYXX Φ (₄₁₂GYRHHV₄₁₆ pour la protéine humaine, voir **Figure 27**), qui, contrairement à LAMP1, ne constitue pas l'extrémité C-terminale de la protéine (Peters *et al.*, 1990; Lehmann *et al.*, 1992). Ce signal permet le recrutement de AP2, mais pas AP1 ni AP3 (Sosa *et al.*, 1993; Höning *et al.*, 1996; Le Borgne *et al.*, 1998; Obermüller *et al.*, 2002). Le mode de transport de LAP depuis les endosomes précoces jusqu'aux lysosomes n'est pas défini. Une possibilité est que le clivage de la protéine a lieu dans les endosomes précoces et que la partie luminale atteint les endosomes tardifs et endolysosomes au gré de la maturation des endosomes précoces.

4.3.6 D'autres voies menant les LMP aux endosomes

D'autres LMP dépendent de mécanismes de transport originaux. Par exemple, le transport de la protéine LPTM5 vers les endosomes est médié par l'interaction avec la ligase de l'ubiquitine Nedd4 via un motif (L/P)PXY (Pak *et al.*, 2006). Le complexe alors formé recrute GGA3 après que ce dernier ait été ubiquitinylé, via un motif d'interaction à l'ubiquitine (UIM, pour *Ubiquitin-Interacting Motif*) dans LPTM5 (Pak *et al.*, 2006). Les auteurs de cette étude ont proposé que ce mécanisme permette l'inclusion de LPTM5 dans des vésicules

recouvertes de clathrine dérivées du TGN et le transport direct de LAPT5 vers les compartiments endosomaux.

Il a récemment été montré dans les mélanocytes que, curieusement, des mécanismes permettent de dérouter la voie de sécrétion vers les mélanosomes (Patwardhan *et al.*, 2017). ELKS est recrutée sur les mélanosomes et conduit à l'amarrage des vésicules post-Golgi contenant Rab6 aux mélanosomes. En conséquences, plusieurs protéines mélanosomales, dont MART-1 et TYRP2, sont délivrées ainsi de façon directe aux mélanosomes (Patwardhan *et al.*, 2017).

4.4 Les LMP à la surface cellulaire : rôles dans les cancers

Les protéines lysosomales jouent de nombreux rôles clefs dans la transformation tumorale et dans l'agressivité des tumeurs (Davidson et Heiden, 2017). De façon intéressante, plusieurs LMP voient leur trafic modifié dans certains cancers.

CD63 en est un exemple. Cette LMP a été observée comme étant fortement exprimée à la surface cellulaire de cellules de mélanomes de stade précoce (Atkinson *et al.*, 1984, 1985; Hotta *et al.*, 1988). Cependant, les niveaux de CD63 en surface sont ensuite réduits dans les stades plus avancés et métastatiques (Kondoh *et al.*, 1993). De façon intéressante, la surexpression de façon exogène de CD63 dans ces cellules de mélanome diminue leur capacité métastatique (Radford, Thome et Hersey, 1997). À l'inverse, la déplétion de CD63 dans ces cellules augmente la mobilité des cellules ainsi que leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire (Jang et Lee, 2003). Cette corrélation négative entre les niveaux de CD63 en surface et la capacité métastatique a aussi été observée dans d'autres types de cancers (Sordat *et al.*, 2002; Sauer *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2007; Zhijun, Shulan et Zhuo, 2007). Ces données font sens avec un rôle de CD63 en surface, associée aux TEM, dans la régulation des intégrines et de l'adhérence cellulaire (voir **Présentation de CD63**). Elles font aussi écho au rôle de CD63 dans l'endocytose et la dégradation de MT1-MMP (Takino *et al.*, 2003 ; voir **Présentation de CD63**), une métalloprotéase impliquée dans l'invasion tumorale (Knapinska et Fields, 2019). De façon intéressante, L6-Ag, dont la surexpression réduit les niveaux de CD63 en surface (voir **Présentation de CD63**), est fortement exprimée à la surface de cellules de cancers du poumon, du sein, du colon ou des ovaires (Hellström *et al.*, 1986). Sa surexpression est associée à une mobilité cellulaire et une capacité métastatique accrues (Pols et Klumperman, 2009).

LAMP1 et LAMP2 présentent, elles aussi, une localisation modifiée dans certains cancers. Les glycoprotéines LAMP1 et/ou LAMP2 se voient surexprimées à la surface des cellules dans de nombreux types de cancer. Chez l'humain, cela a notamment été observé dans des lignées cellulaires de leucémies myélomonocytaires, de mélanomes métastatiques, de fibrosarcomes et de cancers colorectaux (Mane *et al.*, 1989; Saitoh *et al.*, 1992; Sarafian *et al.*, 1998). La transformation cellulaire s'accompagne d'une modification des polysaccharides en surface des cellules avec, notamment, une augmentation des sialylations ainsi que des N-glycosylations complexes branchées par des liaisons β 1-6 (Dennis *et al.*, 1987). Ces polysaccharides sont impliqués dans l'interaction avec des lectines endothéliales comme la galectine 3 ou la sélectine E, et sont associées à une forte activité métastatique (Dennis *et al.*, 1987; Saitoh *et al.*, 1992; Krishnan *et al.*, 2005; Przybyło *et al.*, 2007; Dange *et al.*, 2014).

Plusieurs études convergent et suggèrent que l'expression de LAMP1 et/ou LAMP2 en surface contribue fortement aux modifications des glycosylations de surface (Laferte et Dennist, 1989; Sawada, Lowe et Fukuda, 1993; Sawada, Tsuboi et Fukuda, 1994; Sarafian *et al.*, 1998; Krishnan *et al.*, 2005; Przybyło *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que LAMP1 en surface lie la sélectine E via ses SLe^x (voir **Figure 22** pour le détail du SLe^x ; Sawada, Lowe et Fukuda, 1993; Sawada, Tsuboi et Fukuda, 1994). De même, LAMP1, isolée d'une lignée B16F10 de mélanome métastatique de souris, est aussi capable de lier *in vitro* la galectine 3 via ses poly-N-acetyllactosamine branchés en β 1-6 (Krishnan *et al.*, 2005).

Cette interaction entre LAMP1 et la galectine 3 semble particulièrement critique pour la capacité métastatique de ces cellules. Il a été montré que la liaison de ces cellules à cette lectine augmente leur expansion ainsi que leur capacité migratoire, mais induit aussi l'expression de la métalloprotéase MMP9 (Dange *et al.*, 2014; Dange, Agarwal et Kalraiya, 2015). Lorsque les cellules B16F10 sont injectées à des souris, le blocage de LAMP1 par un anticorps réduit fortement la capacité métastatique des B16F10 (Agarwal *et al.*, 2015). De plus, la déplétion de cette LMP diminue les effets d'induction de l'expression de MMP9 par la galectine 3 (Dange, Agarwal et Kalraiya, 2015). Ainsi, les LAMP en surface participent pleinement à l'agressivité tumorale via leur interaction avec les lectines endothéliales.

L'expression des LAMP à la surface cellulaire pourrait aussi permettre aux tumeurs de lutter contre l'acidité du milieu extérieur. Aux stades précoces de la formation des tumeurs solides, l'absence de vascularisation est associée à une hypoxie locale, induisant une glycolyse

par fermentation dans les cellules cancéreuses (Hashim *et al.*, 2013; Damaghi *et al.*, 2015). Cela résulte en une acidification du milieu extracellulaire, potentiellement néfaste pour les cellules (Hashim *et al.*, 2013). Afin d'étudier les mécanismes d'adaptation des cellules cancéreuses à cette acidité, Damaghi *et al.* ont cultivé des cellules MCF-7 de cancer du sein humain en milieu acide (pH 6,7) pendant plus de deux mois (Damaghi *et al.*, 2015). En comparant leur protéome à celui de cellules cultivées à pH 7,4, ils ont démontré que ces cellules surexprimaient LAMP1 et LAMP2. De plus, LAMP2 était massivement relocalisée à la membrane plasmique. La surexpression de LAMP2 a aussi été observée *in vivo* dans des tumeurs de souris. Dans ces tumeurs, les niveaux d'expression de LAMP2 sont corrélés avec les zones les plus acides des tumeurs (Damaghi *et al.*, 2015).

Finalement, la surexposition de LAMP1/2 en surface pourrait aussi participer à la défense des cellules cancéreuses contre le système immunitaire. Il a été montré que la surexposition transitoire de LAMP1 à la surface des cellules NK faisant suite à la dégranulation protège ces cellules contre leurs propres granzymes et perforines (voir **4.1.1 Présentation de LAMP1 et LAMP2** ; Cohnen *et al.*, 2013). De la même manière, la surexpression de LAMP1 à la surface de cellules cancéreuses réduit leur mortalité lorsque celles-ci sont ciblées par les cellules NK (Cohnen *et al.*, 2013).

Dans tous ces cas, le mécanisme moléculaire induisant cette surexposition des LAMP en surface n'est pas clairement établi. Bien sûr, une très forte surexpression de LAMP1 pourrait suffire à surcharger les mécanismes régulant le trafic de LAMP1. Cependant, LAMP1 est aussi exprimée à la surface cellulaire dans plusieurs contextes physiologiques. C'est notamment le cas dans les lymphocytes T et les cellules NK au niveau de la synapse immunologique (Betts *et al.*, 2003; Alter, Malenfant et Altfeld, 2004; Cohnen *et al.*, 2013), dans les ostéoclastes au niveau des zones de contacts avec l'os (Akamine *et al.*, 1993), ou à la membrane plasmique de la cellule-œuf (McCormick, Finneran et Bonventre, 1998). Les cellules cancéreuses pourraient donc aussi faire appel à des mécanismes indépendants de la surexpression globale de LAMP1 pour induire la présence de cette protéine à la surface cellulaire.

RESULTATS

La glycoprotéine LAMP1 est très régulièrement utilisée comme marqueur des compartiments endosomaux matures. Paradoxalement, la biologie de LAMP1 n'est que très peu élucidée. D'une part, ses fonctions sont mal comprises, et, d'autre part, la nature de sa voie de transport vers les endosomes fait l'objet de débats. En effet, plusieurs études se contredisent concernant la voie, directe ou indirecte, empruntée par LAMP1. De même, le rôle exact du signal tyrosine porté par LAMP1 dans sa voie de transport est mal compris. Ce signal est manifestement nécessaire pour l'endocytose de LAMP1. Cependant, il n'est pas clair si celui-ci joue aussi un rôle dans la sortie de LAMP1 de l'appareil de Golgi et/ou au niveau des endosomes.

Fait intéressant, LAMP1 s'avère surexposée à la surface cellulaire dans de nombreux cancers. Cette localisation aberrante place LAMP1 au cœur de mécanismes favorisant l'agressivité tumorale. De ce fait, LAMP1 est une cible de choix pour le développement d'outils thérapeutiques. Des immunoconjugués ciblant LAMP1 ont ainsi récemment été développés (Baudat *et al.*, 2014).

C'est dans ce contexte, et dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut Curie et Sanofi, que nous avons entrepris l'étude des mécanismes responsables de la localisation intracellulaire de LAMP1 et des LMP.

Le récent développement du système RUSH permet une observation directe des voies de transport empruntées par les protéines qui suivent la voie de sécrétion. Nous avons ainsi utilisé le système RUSH pour étudier le trafic intracellulaire de LAMP1. Au cours de nos travaux, Chen *et al.* ont publié une étude démontrant que LAMP1, inséré dans le système RUSH, suit une voie indirecte vers les endosomes (Chen *et al.*, 2017). Ils montrent aussi que le signal tyrosine de LAMP1 n'est pas impliqué dans sa sortie de l'appareil de Golgi. En plus de confirmer ces résultats, nous nous sommes aussi intéressés aux voies suivies par d'autres LMP. Nous avons étudié l'export de ces protéines au niveau de l'appareil de Golgi ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ces travaux font l'objet d'un article en passe d'être soumis pour publication (partie 1 **Manuscrit d'article : *Lysosomal membrane proteins LAMP1 and LIMP2 are segregated and sorted in the Golgi apparatus independently of their clathrin adaptor binding motif.***).

Avec l'objectif d'appréhender les mécanismes mis en jeux dans la surexposition de LAMP1 à la surface cellulaire dans le cancer, nous avons monté un protocole de criblage génétique d'envergure (partie **2 Réalisation d'un crible d'inactivation de gènes : à la recherche de régulateurs du trafic de LAMP1**). La méthode utilisée reposait sur la technologie CRISPR-Cas9 et visait à identifier des gènes dont l'inactivation décroît ou accroît la présence de LAMP1 à la membrane plasmique. Nous avons démontré que la méthode utilisée permet bien d'identifier des régulateurs de la localisation de LAMP1. Cependant, les listes de gènes obtenues sont encore à l'étude.

1 Manuscrit d'article

Lysosomal membrane proteins LAMP1 and LIMP2 are segregated and sorted in the Golgi apparatus independently of their clathrin adaptor binding motif.

**Jason Ecard^{1,2}, Séverine Divoux¹, Zélia Gouveia¹, Emmanuelle Vigne²,
Gaelle Boncompain¹ and Franck Perez¹**

¹ Dynamics of Intracellular Organization Laboratory, Institut Curie, PSL Research University, Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 144, Paris, France.

² Global Biotherapeutics, Sanofi R&D Centre, Vitry-sur-Seine, France.

Abbreviations

CLEM:	Correlative Light-Electron Microscopy
EGFP:	Enhanced Green Fluorescence Protein
ER:	Endoplasmic Reticulum
LE/Lys.:	Late Endosomes and Lysosomes
LMP:	Lysosomal Membrane Protein
RUSH:	Retention Using Selective Hooks
SBP:	Streptavidin Binding Peptide
TIRF:	Total Internal Fluorescence Microscopy
MPR:	Mannose-6-Phosphate Receptors

Introduction

Lysosomes are membrane-bound organelles ensuring multiple functions necessary to cellular homeostasis such as degradation of molecules. Lysosomes are composed of soluble enzymes contained in their lumen and of membrane integral proteins. For their delivery to late endosomes and lysosomes (LE/Lys.), neosynthesized lysosomal membrane proteins (LMPs) are translocated into the endoplasmic reticulum (ER) and transported to the Golgi apparatus. From there, LMP can follow a direct Golgi-to-endosome transport route, referred as the direct pathway. Alternatively, they can be targeted to the plasma membrane and reach the endosomes by endocytosis, this pathway being called the indirect pathway (Braulke and Bonifacino, 2009).

Lysosomal Integral Membrane Protein 2 (LIMP2) is a type III LMP, which spans the membrane twice. It functions as a receptor for the transport of the lysosomal enzyme β -cerebrosidase to lysosomes (Reczek *et al.*, 2007; Malini *et al.*, 2015). In addition, LIMP2 seems to work as a lipid transporter (Kuronita *et al.*, 2002; Conrad *et al.*, 2017). LIMP2 follows a direct

pathway to reach LE/Lys after transit through the Golgi apparatus (Vega *et al.*, 1991; Obermüller *et al.*, 2002). The [D/E]XXXL[L/I] signal (X referring to any amino acid) in its cytoplasmic tail interacts with clathrin adaptor complexes AP1 and AP3 and was shown to be important for its trafficking (Vega *et al.*, 1991; Ogata and Fukuda, 1994; Sandoval *et al.*, 1994, 2000; Höning, Sandoval and Von Figura, 1998; Le Borgne *et al.*, 1998; Fujita *et al.*, 1999; Tabuchi, Akasaki and Tsuji, 2000; Janvier *et al.*, 2003). For its Golgi exit, LIMP2-AP1 interaction was proposed to mediate the incorporation of LIMP2 within clathrin-coated vesicles at the TGN (Fujita *et al.*, 1999).

Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 (LAMP1) trafficking pathway is more controversial. Depending on the cell model, LAMP1 was shown to appear at the cell surface during its transport in some studies (Lippincott-Schwartz and Fambrough, 1986, 1987; Furuno, Shinji, *et al.*, 1989) but not in others (Green *et al.*, 1987; Akasaki *et al.*, 1995). These differences were imputed to variable LAMP1 expression levels. It was proposed that high LAMP1 expression would lead to an overflow of the direct pathway and appearance at the cell surface (Harter and Mellman, 1992). LAMP1 bears a GYXXΦ signal (Φ referring to a bulky hydrophobic amino acid) in its cytoplasmic tail whose mutation abolishes its trafficking to lysosome and redirects LAMP1 to the plasma membrane (Williams and Fukuda, 1990; Hunziker *et al.*, 1991; Harter and Mellman, 1992; Guarnieri *et al.*, 1993; Höning and Hunziker, 1995). This signal was shown to bind AP1, AP2 and AP3 (Höning *et al.*, 1996; Le Borgne *et al.*, 1998). Although AP1 was proposed to participate in the Golgi export of LAMP1 (Höning *et al.*, 1996), LAMP1 still reaches lysosomes in AP1-depleted cells (Meyer *et al.*, 2000). LAMP1 was detected in clathrin-coated pits at the plasma membrane by electron microscopy (Furuno, Ishikawa, *et al.*, 1989). Its endocytosis is dependent on clathrin, dynamin and AP2 (Janvier and Bonifacino, 2005). LAMP1 is overexposed at the cell surface in AP3-depleted cells due to an increased recycling, suggesting a role for AP3 in the targeting of LAMP1 from early endosomes to LE/Lys.

Recently, Chen *et al.* implemented rat LAMP1 into the Retention Using Selective Hooks (RUSH) system (Chen *et al.*, 2017). This secretory assay allows the synchronization of the trafficking of proteins of interest along the secretory pathway (Boncompain *et al.*, 2012). The tagging of the protein of interest with Streptavidin Binding Peptide (SBP) and the co-expression of an ER-resident streptavidin-tagged protein maintains the protein of interest in the ER until biotin is added to the medium. Chen *et al.* have shown that RUSH-synchronised rat LAMP1 exits the Golgi apparatus in tubulovesicular compartments, which fuse with the

plasma membrane. These tubulovesicular compartments also contained plasma membrane-fated proteins, such as the transferrin receptor and VSV-G. In addition, none of the four APs complexes appeared to be necessary for LAMP1 export from the Golgi apparatus (Chen *et al.*, 2017).

Here, we study the trafficking pathway of human LAMP1 using the RUSH system and we go further in the demonstration that RUSH-synchronised LAMP1 follows an indirect pathway to the LE/Lys. independently of its adaptor binding signal. The synchronized transport of other LMPs was analysed and compared to the transport pathway of LAMP1. Our results show that LAMP1 and LIMP2 are segregated and sorted in the Golgi apparatus, LIMP2 being incorporated into punctate structures before being exported from the Golgi apparatus. These LIMP2-containing post-Golgi intermediates were shown to be clathrin-free and to not rely neither on its adaptor binding signal nor on its C-terminal cytoplasmic domain.

Results

Newly synthesized LAMP1 is transported from the Golgi apparatus to the plasma membrane before reaching the lysosomes.

The anterograde transport of newly synthesized human LAMP1 was analysed using the RUSH system (Boncompain *et al.*, 2012). LAMP1 was fused to a Streptavidin Binding Peptide (SBP) and a fluorescent protein in its luminal domain. In the absence of biotin, SBP-mCherry-LAMP1 was retained in the ER thanks to the co-expression of the ER-resident Steptraavidin-KDEL (**Fig. S1**). Synchronous release of SBP-mCherry-LAMP1 was induced by addition of the non-toxic vitamin biotin. 35 min after addition of biotin, SBP-mCherry-LAMP1 was detected in the Golgi apparatus as shown by the colocalization with the Golgi marker GM130. 2h after addition of biotin, SBP-mCherry-LAMP1 reached the late endosomes/lysosomes (LE/Lys.), as evidenced by the colocalization with LAMTOR4 (**Fig. S1**). An immunostaining on non-permeabilised cells using an anti-GFP antibody revealed that newly synthesized SBP-EGFP-LAMP1 was detected at the plasma membrane 35 min and 60 min after the addition of biotin (**Fig. 1a**). Flow cytometry was used to quantify the kinetics of cell surface appearance of SBP-EGFP-LAMP1. The presence of SBP-EGFP-LAMP1 at the cell surface 30 min after its release from the ER was confirmed. Its cell surface presence peaked after 45 min and then decreased to reach the basal level after 90 min. The basal level of SBP-EGFP-LAMP1 at the cell surface was assessed by the condition in which biotin was added at the time of transfection (no

interaction between SBP and Streptavidin occurs) (**Fig. 1b**). Using Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy, fusion events of SBP-EGFP-LAMP1 carriers with the plasma membrane were observed (**Fig. 1c, d**). Quickly after fusion has occurred, SBP-EGFP-LAMP1 was trapped in dotted structures identified as clathrin-coated pits. The signal intensity of SBP-EGFP-LAMP1 in clathrin-coated pits then decreased suggesting its internalization through endocytosis. TIRF microscopy also showed that carriers containing LAMP1 and fusing with the plasma membrane were positive for RAB6 (**Fig. 1 e-g**). RAB6 is a Ras-related small GTPase involved in the regulation of trafficking pathways from the Golgi apparatus (Girod *et al.*, 1999; White *et al.*, 1999; Grigoriev *et al.*, 2007, 2011; Patwardhan *et al.*, 2017; Fourriere *et al.*, 2019). Previous studies have shown that RAB6 is a major player in the formation of post-Golgi carriers (Miserey-Lenkei *et al.*, 2010, 2017) and their delivery to the exocytic sites (Grigoriev *et al.*, 2011; Fourriere *et al.*, 2019). Taken together, our results demonstrate that newly synthesized human LAMP1 is transported from the Golgi apparatus to the plasma membrane before being internalised via clathrin coated pits and transported to its final endosomal destination.

Golgi-to-plasma membrane transport of LAMP1 is not dependent on its GYXXΦ motif.

The clathrin adaptors complexes AP1, AP2, AP3 and AP4 were shown to recognise GYXXΦ motifs contained in the cytosolic tail of proteins (Robinson, 2004). The motif ⁴¹⁴YQTI₄₁₇ of LAMP1 (**Fig. 3a**) was suggested to be involved in its direct Golgi-to-endosome transport pathway (Höning *et al.*, 1996; Obermüller *et al.*, 2002; Cook, Row and Davidson, 2004). To address this issue, we mutated the critical tyrosine residue Tyr₄₁₄ to Alanine (Y414A). 2 h after release from the ER, RUSH-synchronised LAMP1^{Y414A} was localized at the plasma membrane whereas LAMP1 wild type reached LE/Lys. (**Fig. 2a**). No fluorescent signal of LAMP1 Y414A was detected in intracellular compartments. The appearance and persistence of SBP-EGFP-LAMP1^{Y414A} at the cell surface was confirmed by flow cytometry using anti-GFP immunostaining on non-permeabilised cells (**Fig. 2b**). Interestingly, LAMP1^{Y414A} and wild type LAMP1 were not sorted at the Golgi apparatus and exited the Golgi in the same tubulovesicular intermediates (**Fig. 2c, d**). TIRF microscopy showed that LAMP1 wild type and LAMP1^{Y414A} containing carriers fuse with the plasma membrane in the same exocytic events indicating that LAMP1 wild type and LAMP1^{Y414A} were not sorted in post-Golgi steps (**Fig. 2e-g**). According to the role of ⁴¹⁴YQTI₄₁₇ motif in the recruitment of AP2 at clathrin-coated pits, SBP-mCherry-LAMP1^{Y414A} was not enriched in dotted structures at the plasma membrane but

diffused in the plasma membrane (**Fig. 2g**). Taken together, these results show that LAMP1 wild type and LAMP1^{Y414A} follow the same Golgi-to-plasma membrane transport route. The absence of sorting of LAMP1 wild type and LAMP1^{Y414A} at the Golgi argues against the existence of a direct Golgi-to-endosome transport route at least in our conditions.

LAMP1 and LIMP2 are sorted at the Golgi apparatus.

The anterograde transport of other lysosomal membrane proteins (LMPs) was then analysed using the RUSH system and compared to the trafficking of LAMP1. LAMP2, Lysosomal Acid Phosphatase (LAP) and LIMP2 were retained in the ER in the absence of biotin and upon co-expression of an ER-resident hook. After the addition of biotin, RUSH-synchronized LAMP2, LAP and LIMP2 were detected in the Golgi apparatus. 2 h after their release from the ER, they reached LE/Lys. as confirmed by immunostaining of LAMP2 (**Fig. S2**). High-resolution microscopy showed that both LAMP2 and LAP were fully colocalized with LAMP1 in the Golgi apparatus (**Fig. S3a, b** and **Fig. S4a, b**). In addition, time-lapse microscopy showed that LAMP2 and LAP left the Golgi apparatus in the same tubulovesicular carriers than LAMP1 (**Fig. S3c, d** and **Fig S4c, d**), indicating that no sorting of these LMPs occurred at the Golgi apparatus. Interestingly, RUSH-synchronized LIMP2 was segregated from LAMP1 at the Golgi apparatus as highlighted by high-resolution microscopy. In addition to a diffuse localisation in the Golgi apparatus, similar to LAMP1, LIMP2 was detected in dots with higher fluorescence intensity (**Fig. 3b, c**). Time-lapse imaging showed that LIMP2 was first diffusely localised at the Golgi apparatus and then enriched in bright dots (**Fig. 3d, e**). After appearance, these dots stayed associated to the Golgi apparatus for several minutes before leaving it (**Fig. 3d, e**). LAMP1 tubulovesicular carriers and LIMP2 vesicular carriers were distinct and described spatially independent Golgi exit pathways (**Fig. 3f**). To get better insight of the structures underlying the segregation of LAMP1 and LIMP2 at the Golgi apparatus, correlative light-electron microscopy (CLEM) experiments were performed. Whereas SBP-mCherry-LAMP1 fluorescence overlaps the entire Golgi stack, SBP-EGFP-LIMP2 bright dots were localised in regions rich in vesicles with a diameter of 50-70 nm (**Fig. 3h-j**), fitting with the size of Golgi-associated clathrin-coated vesicles (Klumperman *et al.*, 1993; Doray, Ghosh, *et al.*, 2002).

Our data demonstrated that LAMP1, LAMP2 and LAP are not sorted and follow the same transport pathway to the plasma membrane. In contrast, LAMP1 and LIMP2 are segregated at the level of the Golgi complex.

The di-Leucine based motif of LIMP2 is not involved in its export from the Golgi apparatus.

LIMP2 was previously suggested to follow a direct Golgi-to-endosome transport pathway (Vega *et al.*, 1991; Obermüller *et al.*, 2002) with a crucial role for its di-leucine-like motif ([D/E]XXXL[L/I]) to reach lysosomes (Ogata and Fukuda, 1994). LIMP2 [D/E]XXXL[L/I] motif was demonstrated to induce binding to AP3 and to be involved in its transport to lysosomes (Höning, Sandoval and Von Figura, 1998; Le Borgne *et al.*, 1998). We addressed the role of this motif in LIMP2 transport route by mutating the critical leucine 475 and isoleucine 476 residues (**Fig. 3a**) to alanine, hereafter named LIMP2^{AA} for the sake of simplicity. RUSH-synchronized LIMP2^{AA} displayed an increased presence at the plasma membrane compared to LIMP2 wild type. However, LIMP2^{AA} reached the same intracellular destination compartments than LIMP2 wild type as highlighted by the condition in which biotin was added at the time of transfection (**Fig. 4a**). Interestingly, the mutation of the [D/E]XXXL[L/I] motif of LIMP2 did not prevent the formation of LIMP2 bright dots at the Golgi apparatus, LIMP2^{AA} and LIMP2 wild type being enriched in the same dots (**Fig. 4b**). Moreover, LIMP2^{AA} and LIMP2 wild type left the Golgi apparatus in the same post-Golgi transport intermediates (**Fig. 4c, d**). As LIMP2 was shown to be able to dimerise (Zhou *et al.*, 2019), we verified that LIMP2^{AA} trafficking was not due to its interaction with LIMP2 wild type. When expressed alone, LIMP2^{AA} and LIMP2 wild type displayed the same localisation as when being co-expressed. When the biotin is added at the transfection, LIMP2^{AA} is present at the plasma membrane and at LE/Lys. and LIMP2 wild type at LE/Lys. only (**Fig. S5a, b**). At the Golgi apparatus, LIMP2^{AA} expressed alone were very similar to LIMP2 WT, with appearance of bright dots (**Fig S5c, d**). Finally, using high-resolution fluorescence microscopy we showed that LIMP2-containing bright dots did not appear colocalised with exogenously expressed mCherry-clathrin light chain (**Fig. 4e-g**). In conclusion, the clathrin adaptor binding motif [D/E]XXXL[L/I] of LIMP2 is not involved in the segregation of LIMP2 at the Golgi complex nor in its export from the Golgi.

LIMP2 C-terminal cytosolic domain is not involved in its segregation at the Golgi apparatus.

We next investigated whether LIMP2 Golgi export could rely on another yet unidentified cytosolic signal. As a type III protein, LIMP2 spans the membrane twice and has two cytosolic domains. Its N-terminal cytosolic domain comprises only 4 residues, including the initiating methionine residue. We therefore focused on its C-terminal cytosolic domain. Domain

swapping experiments between LAMP1 and LIMP2 cytosolic domains were conducted. Chimeras where the LAMP1 cytosolic domain was replaced by the LIMP2 C-terminal cytosolic domain (LAMP1^{LIMP2C}) and the LIMP2 C-terminal cytosolic domain replaced by the LAMP1 cytosolic domain (LIMP2^{LAMP1C}) were generated (Fig. 5a). A deletion mutant of LIMP2 missing the whole C-terminal cytosolic domain was also generated (LIMP2^{ΔC}). Among these constructs, only RUSH-synchronized LIMP2^{LAMP1C} and LIMP2^{ΔC} displayed a punctate localization at the Golgi in contrast to LAMP1^{LIMP2C} (Fig. 5b). In conclusion, LIMP2 C-terminal cytosolic domain is neither sufficient nor necessary to induce the enrichment of LMPs in these dotted structures at the Golgi apparatus.

Discussion

Our present study demonstrates that human LAMP1 reach the LE/Lys after transiting through the plasma membrane, thus following the indirect pathway. Moreover, mutating LAMP1 signal does not change the nature of its post-Golgi carriers. Our data confirm previous results from Chen *et al.* who used RUSH-synchronised rat LAMP1 (Chen *et al.*, 2017). In addition, we show that RUSH-synchronised wild type LAMP1 and LAMP1^{Y414A} were fully colocalised in post-Golgi intermediates. This suggests that a direct pathway for LAMP1 dependent on its APs binding signal does not exist in our conditions, or if it does, it is very minor. Pols *et al.* have shown that LAMP1 and LAMP2 localise in post-Golgi uncoated compartments devoid of cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-MPR) in several cell lines, including HeLa cells (Pols, van Meel, *et al.*, 2013). These structures were positive for the CORVET/HOPS subunit Vps41 as well as for the SNARE VAMP7 and were proposed to mediate direct trafficking to endosomes (Pols, van Meel, *et al.*, 2013). However, we and others (Chen *et al.*, 2017) were not able to visualise such a pathway using the RUSH system, suggesting that either this pathway is very minor, or that the tagging of LAMP1 with SBP prevents its manifestation.

LAMP1 endocytosis was shown to be clathrin and AP2-dependant (Furuno, Ishikawa, *et al.*, 1989; Janvier and Bonifacino, 2005). Here, when reaching the plasma membrane, LAMP1 is quickly trapped in clathrin-positive areas. The incorporation of LAMP1 in clathrin-coated structures is dependent on its GYXXΦ motif. Such efficiency might explain why it is difficult to detect endogenous LAMP1 at the surface in some cells.

Our data show that LAMP1, LAMP2 and LAP follow the same pathway for their export from the Golgi apparatus and targeting to the lysosomes via the plasma membrane, in accordance with previous studies (Braun, Waheed and von Figura, 1989; Nabi *et al.*, 1991; Obermüller *et al.*, 2002).

As LIMP2 was proposed to follow a direct pathway from the Golgi apparatus to endosomes (Vega *et al.*, 1991; Obermüller *et al.*, 2002), one could expect LIMP2 to be sorted at the Golgi apparatus from LAMP1/LAMP2/LAP. Consistently, although LAMP1 and LIMP2 are colocalized when they reach the Golgi apparatus, LIMP2 then concentrate in dotted structures from which LAMP1 is absent. Chen *et al.* have shown sorting of RUSH-synchronised LAMP1 and cation-dependent (CD)-MPR within the Golgi apparatus (Chen *et al.*, 2017). Our results suggest that CD-MPR and LIMP2 do not follow the same pathways. Indeed, LIMP2 post-Golgi intermediates were not colocalised with exogenously expressed mCherry-clathrin light chain while MPRs recruit clathrin through binding to Golgi-localised Gamma ear-containing, Arf-binding adaptors (GGAs) for their Golgi exit (Puertollano *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Doray, Bruns, *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2017).

Both LAMP1 and LIMP2 recruit AP1 via their cytosolic signals (Höning *et al.*, 1996; Fujita *et al.*, 1999). Moreover, LAMP1 was shown to be present in clathrin-coated vesicles in close proximity of the Golgi apparatus (Höning *et al.*, 1996). However, the depletion of AP1 does not prevent LAMP1 to reach LE/Lys. (Meyer *et al.*, 2000). Here, we show that mutating their APs binding signal does not modify LAMP1 and LIMP2 Golgi export. In this context, one could wonder whether AP1 is actually involved in the Golgi exit of these proteins. AP1 also interacts with MPRs and was also proposed to be involved in their Golgi export (Höning *et al.*, 1997; Doray, Ghosh, *et al.*, 2002; Ghosh et Kornfeld, 2003, 2004; Stöckli, Höning and Rohrer, 2004). However, AP1 depletion or knock-sideway (i.e. docking AP1 on mitochondria membranes) does not result in a blockage of MPRs at the Golgi apparatus, but rather in an enrichment of MPRs in endosomes (Meyer *et al.*, 2000; Robinson, Sahlender and Foster, 2009). This led to the proposal that AP1 could be involved in the retrograde endosome-to-Golgi pathway (Meyer *et al.*, 2000; Robinson, Sahlender and Foster, 2009). Whether AP1 could have such a role for LAMP1 or LIMP2 is an intriguing question, still open. As LIMP2 functions as a receptor for β -glucocerebrosidase, it is not unlikely that this protein can cycle between the Golgi and LE/Lys.

LIMP2-containing post-Golgi intermediates colocalise with vesicular regions of the Golgi apparatus, as evidenced by our CLEM experiments, but are devoid of clathrin. The

mechanisms involved in LIMP2 concentration and in the formation of these intermediates require further investigation. Interestingly, LIMP2-containing dots remain associated to the Golgi apparatus for several minutes before leaving, which could indicate maturation processes might be required for their Golgi exit. As mutating the adaptor-binding signal in LIMP2 did not modify its Golgi exit, we investigated whether another motif in its C-terminal cytoplasmic domain could be involved in the formation of LIMP2 post-Golgi intermediates. However, this domain of LIMP2 appeared neither sufficient nor essential for the formation LIMP2 bright dots.

Materials and Methods

Immunofluorescence and flow cytometry

Cell fixation was performed by incubation in 3% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences; cat. no. 15710) for 10 min and permeabilised by incubation in 0.5 g/L saponin in PBS supplemented with 2 g/L bovine serum albumin. Primary antibodies used in this study were anti-GM130 (BD Transduction Laboratories; cat. no. 610823; dilution 1:1000), anti-LAMTOR4 (Cell Signaling Technology; cat. no. 13140 dilution 1:1000), anti-PDI isoform A3 (Sigma-Aldrich; cat. no. AMAB90988; 1:250). Fluorochrome conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch. Coverslips were mounted in Mowiol containing DAPI. In **Fig. S5**, cells were stained with HCS CellMask Blue Stain (ThermoFisher Scientific; cat. no. H32720; diluted at 1:5000 in the mounting medium). For cell surface staining, cells were transferred in ice-cold PBS and incubated with an Alexa Fluor® 647-coupled anti-GFP antibody (BD Pharmingen; cat. no. 565197; dilution 1:150), for 40 min prior to fixation with 2% paraformaldehyde. Signal intensity was analysed by flow cytometry using a BD Accuri™ C6 cytometer. Median anti-GFP intensity of GFP-positive cells normalized to the maximum value is depicted on the graph.

Correlative light-electron microscopy

HeLa cells expressing RUSH cargos were live stained for 1 h with SiR-lysosome (Spirochrome) and SiR-DNA (Spirochrome) at 1 μ M each. The cells were then incubated with biotin for 27 min and fixed with 3% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences; cat. no. 15710) for 10 min. Fluorescence images were then acquired using an Eclipse 80i microscope (Nikon) equipped with a CSU-X1 Yokogawa spinning-disk head and an Ultra897 iXon EMCCD camera (Andor). The cells were then post-fixed with glutaraldehyde 2.5% in cacodylate buffer

0,1 M, pH 7.2 and then with 1% (w/v) OsO₄ supplemented with 1.5% (w/v) potassium ferrocyanide, dehydrated in increasing concentration of ethanol (50%, 70%, 90%, 96%, 100%). Cells were embedded in epon 812 (TAAB Laboratories Equipment) and processed for serial ultrathin sectioning with a Reichert Ultracut S ultramicrotome (Leica). Sections were counter-stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Transmission Electron Microscope (TEM; Tecnai G2 Spirit; FEI) equipped with a Quemesa 4k CCD camera (Olympus).

Fluorescence and EM images were correlated based on the SiR-lysosome staining and using the eC-CLEM software (Paul-Gilloteaux *et al.*, 2017).

RUSH constructs and other plasmids

All RUSH constructs were expressed using bicistronic plasmids coding for both SBP-FP-tagged LMP and the hook. SBP-FP-LAMP1 (LAMP1 sequence from NM_005561.3 generated from cDNA from GE Dharmacon, Clone ID 3872778), its mutants, SBP-FP-LAMP2 (isoform B, nucleotide sequence NM_013995.2, generated from a plasmid kindly given by Y. Baudat, Sanofi R&D Centre, Vitry sur Seine, France) and SBP-FP-LAP (isoform 1, nucleotide sequence NM_001357016.1 generated from a cDNA from GE Dharmacon, Clone ID 30332133) were used with the luminal hook Streptavidin-KDEL (Boncompain *et al.*, 2012). SBP-FP-LIMP2 (isoform 1, nucleotide sequence NM_005506.3, generated from cDNA from GE Dharmacon, Clone ID 3872778) and its mutants were cytosolically tagged and co-expressed with either Streptavidin-HA-Endo-KKXX or Mini-li-streptavidin. Streptavidin-HA-Endo-KKXX consists in the fusion of streptavidin to the HA-tag, the endocytic signal of LAMP1 (AGYQTI) and the COPI recruitment signal of the *Saccharomyces cerevisiae* WBP1 (KKTN). Mini-li-streptavidin is composed of the sequence coding for the 46 first amino acids of human CD74/li upstream of Streptavidin. All plasmids generated for the present study were verified by sequencing. The EGFP-RAB6 plasmid was a gift from Jamie White (White *et al.*, 1999). The mCherry-clathrin light chain plasmid was a gift from Guillaume Montagnac (Gustave Roussy, Villejuif, France).

Cells culture, transection and RUSH assay

HeLa cells were grown at 37 °C with 5% CO₂ in DMEM, high glucose, GlutaMAX (ThermoFischer Scientific) supplemented with 5% FCS (Biosera), 1 mM sodium pyruvate (ThermoFischer Scientific) and 100 U/mL penicillin and streptomycin (ThermoFischer Scientific). HeLa cells were transfected 24h before fixation or observation using calcium phosphate method as previously described (Jordan, Schallhorn and Wurm, 1996). To release

RUSH cargos, D-biotin (Sigma-Aldrich; cat. no. B4501) was added to the culture medium at a final concentration of 80 μ M.

Fluorescence image acquisition and analysis

Widefield microscopy images were acquired using a Leica DM6000 equipped microscope with a CoolSnap HQ2 (Photometrics) CCD camera. Confocal images of fixed cells were acquired with an Eclipse Ti-E microscope (Nikon) equipped with a CSU-X1 Yokogawa spinning-disk head and a Prime 95B sCMOS camera (Photometrics). High-resolution images were acquired with this same set-up complemented with a Live-SR super-resolution module (Gataca Systems; Roth and Heintzmann, 2016). For time-lapse imaging, cells were transferred in the CO₂-independent Leibovitz's medium (ThermoFischer Scientific) and were acquired at 37°C in a thermostat-controlled chamber. Confocal live-cell images were acquired with an Eclipse 80i microscope (Nikon) equipped with a CSU-X1 Yokogawa spinning-disk head and an Ultra897 iXon EMCCD camera (Andor). TIRF live-cell images were acquired with an Eclipse Ti-E microscope (Nikon) equipped with a TIRF module (Nikon), a 100x CFI Apo TIRF objective and an Evolve EMCCD camera (Photometrics). All acquisitions were driven by the MetaMorph software (Molecular Devices). Pixel intensity linescans, kymographs (**Fig. 1g**) and temporal projections were performed thanks to Fiji software (Schindelin *et al.*, 2012) built-in functions *Plot Profile*, *Multi Kymograph* and *Temporal-Color Code*, respectively.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBiSA), Institut Curie. We also thank Yves Baudat for furnishing the plasmid coding for LAMP2B.

References

- Akasaki, K. *et al.* (1995) 'Biosynthetic transport of a major lysosomal membrane glycoprotein, lamp-1: Convergence of biosynthetic and endocytic pathways occurs at three distinctive points', *Experimental Cell Research*, pp. 464–473. doi: 10.1006/excr.1995.1338.
- Boncompain, G. *et al.* (2012) 'Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells', *Nature Methods*, 9(5), pp. 493–498. doi: 10.1038/nmeth.1928.
- Le Borgne, R. *et al.* (1998) 'The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins', *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), pp. 29451–29461. doi: 10.1074/jbc.273.45.29451.
- Braulke, T. and Bonifacino, J. S. (2009) 'Sorting of lysosomal proteins', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1793(4), pp. 605–614. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.

- Braun, M., Waheed, A. and von Figura, K. (1989) 'Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface.', *The EMBO Journal*, 8(12), pp. 3633–3640. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08537.x.
- Chen, Y. *et al.* (2017) 'Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers', *Journal of Cell Biology*, 216(12), pp. 4141–4151. doi: 10.1083/jcb.201707172.
- Conrad, K. S. *et al.* (2017) 'Lysosomal integral membrane protein-2 as a phospholipid receptor revealed by biophysical and cellular studies', *Nature Communications*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-02044-8.
- Cook, N. R., Row, P. E. and Davidson, H. W. (2004) 'Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes', *Traffic*, 5(9), pp. 685–699. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00212.x.
- Doray, B., Ghosh, P., *et al.* (2002) 'Cooperation of GGAs and AP-1 in Packaging MPRs at the Trans-Golgi Network', 297(September), pp. 1700–1704.
- Doray, B., Bruns, K., *et al.* (2002) 'Interaction of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor with GGA proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), pp. 18477–18482. doi: 10.1074/jbc.M201879200.
- Fourriere, L. *et al.* (2019) 'RAB6 and microtubules restrict protein secretion to focal adhesions', *Journal of Cell*, 218(7), pp. 2215–2231. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201805002>.
- Fujita, H. *et al.* (1999) 'In vitro binding study of adaptor protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-motif)', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(1), pp. 54–58. doi: 10.1006/bbrc.1998.0140.
- Furuno, K., Shinji, Y., *et al.* (1989) 'Biochemical Analysis of the Movement of a Major Lysosomal Membrane Glycoprotein in the Endocytic Membrane System', *The Journal of Biochemistry*, 106(4), pp. 717–722.
- Furuno, K., Ishikawa, T., *et al.* (1989) 'Morphological Glycoprotein Localization in the Endocytic of a Major Lysosomal', *The Journal of Biochemistry*, 716, pp. 708–716.
- Ghosh, P. and Kornfeld, S. (2003) 'AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation', *Journal of Cell Biology*, 160(5), pp. 699–708. doi: 10.1083/jcb.200211080.
- Ghosh, P. and Kornfeld, S. (2004) 'The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426(2), pp. 225–230. doi: 10.1016/j.abb.2004.02.011.
- Girod, A. *et al.* (1999) 'Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum.', *Nature Cell Biology*, 1(7), pp. 423–430. doi: 10.1038/15658.
- Green, S. A. *et al.* (1987) 'Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins', *Journal of Cell Biology*, 105(3), pp. 1227–1240. doi: 10.1083/jcb.105.3.1227.
- Grigoriev, I. *et al.* (2007) 'Rab6 Regulates Transport and Targeting of Exocytotic Carriers', *Developmental Cell*, 13(2), pp. 305–314. doi: 10.1016/j.devcel.2007.06.010.
- Grigoriev, I. *et al.* (2011) 'Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers', *Current Biology*, 21(11), pp. 967–974. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.030.
- Guarnieri, F. G. *et al.* (1993) 'The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1', *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), pp. 1941–1946.

- Harter, C. and Mellman, I. (1992) 'Transport of the Lysosomal Membrane Glycoprotein 1gp120 (IgpA) to Lysosomes Does Not Require Appearance on the Plasma Membrane', *The Journal of Cell Biology*, 120.
- Höning, S. *et al.* (1996) 'The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles.', *The EMBO journal*, 15(19), pp. 5230–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Höning, S. *et al.* (1997) 'The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor contains multiple binding sites for clathrin adaptors', *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), pp. 19884–19890. doi: 10.1074/jbc.272.32.19884.
- Honing, S. and Hunziker, W. (1995) 'Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-I) in MDCK cells', *Journal of Cell Biology*, 128(3), pp. 321–332. doi: 10.1083/jcb.128.3.321.
- Höning, S., Sandoval, I. and Von Figura, K. (1998) 'A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3', *EMBO Journal*, 17(5), pp. 1304–1314. doi: 10.1093/emboj/17.5.1304.
- Hunziker, W. *et al.* (1991) 'Basolateral Sorting in MDCK Cells Requires a Distinct Cytoplasmic Domain Determinant', *Cell*, 66, pp. 907–920.
- Janvier, K. *et al.* (2003) 'Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 γ - σ 1 and AP-3 δ - σ 3 hemicomplexes', *Journal of Cell Biology*, 163(6), pp. 1281–1290. doi: 10.1083/jcb.200307157.
- Janvier, K. and Bonifacino, J. S. (2005) 'Role of the Endocytic Machinery in the Sorting of Lysosome-associated Membrane Proteins', *Molecular Biology of the Cell*, (16), pp. 4231–4242. doi: 10.1091/mbc.E05.
- Jordan, M., Schallhorn, A. and Wurm, F. M. (1996) 'Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation.', *Nucleic Acids Research*, 24(4), pp. 596–601. doi: 10.1093/nar/24.4.596.
- Klumperman, J. *et al.* (1993) 'Differences in the Endosomal Distributions of the 2 Mannose 6-Phosphate Receptors', *J. Cell Biol.*, 121(5), pp. 997–1010. doi: 10.1083/jcb.121.5.997.
- Kuronita, T. *et al.* (2002) 'A role for the lysosomal membrane protein LGP85 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology'. doi: 10.1242/jcs.00075.
- Lippincott-Schwartz, J. and Fambrough, D. M. (1986) 'Lysosomal Membrane Dynamics : Structure and Interorganellar Movement of a Major Lysosomal Membrane Glycoprotein', *The Journal of Cell Biology*, 102(May), pp. 1593–1605.
- Lippincott-Schwartz, J. and Fambrough, D. M. (1987) 'Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: Kinetic and morphological analysis', *Cell*, 49(5), pp. 669–677. doi: 10.1016/0092-8674(87)90543-5.
- Malini, E. *et al.* (2015) 'Role of LIMP-2 in the intracellular trafficking of β -glucosidase in different human cellular models', *FASEB Journal*, 29(9), pp. 3839–3852. doi: 10.1096/fj.15-271148.
- Meyer, C. *et al.* (2000) ' μ 1A-adaptin-deficient mice: Lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors', *EMBO Journal*, 19(10), pp. 2193–2203. doi: 10.1093/emboj/19.10.2193.
- Miserey-Lenkei, S. *et al.* (2010) 'Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the golgi complex', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(7), pp. 645–654. doi: 10.1038/ncb2067.

- Miserey-Lenkei, S. *et al.* (2017) 'Coupling fission and exit of RAB6 vesicles at Golgi hotspots through kinesin-myosin interactions', *Nature Communications*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01266-0.
- Nabi, I. R. *et al.* (1991) 'An Endogenous MDCK Lysosomal Membrane Glycoprotein Is Targeted Basolaterally before Delivery to Lysosomes', *The Journal of Cell Biology*, 115(6).
- Obermüller, S. *et al.* (2002) 'The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes.', *Journal of cell science*, 115(Pt 1), pp. 185–94. doi: 10.1074/jbc.M010591200.
- Ogata, S. and Fukuda, M. (1994) 'Lysosomal targeting of limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu- Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail', *Journal of Biological Chemistry*, 269(7), pp. 5210–5217.
- Patwardhan, A. *et al.* (2017) 'Routing of the RAB6 secretory pathway towards the lysosome related organelle of melanocytes', *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/ncomms15835.
- Paul-Gilloteaux, P. *et al.* (2017) 'eC-CLEM : flexible multidimensional registration software for correlative microscopies', *Nat Methods*. doi: 10.1038/nmeth.4170.
- Pols, M. S. *et al.* (2013) 'HVps41 and VAMP7 function in direct TGN to late endosome transport of lysosomal membrane proteins', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(May 2012), pp. 1312–1361. doi: 10.1038/ncomms2360.
- Puertollano, R. *et al.* (2001) 'Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs', *Science*, 292(5522), pp. 1712–1716. doi: 10.1126/science.1060750.
- Reczek, D. *et al.* (2007) 'LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase', *Cell*, 131(4), pp. 770–783. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.018.
- Robinson, M. S. (2004) 'Adaptable adaptors for coated vesicles', *Trends in Cell Biology*, 14(4), pp. 167–174. doi: 10.1016/j.tcb.2004.02.002.
- Robinson, M. S., Sahlender, D. A. and Foster, S. D. (2009) 'Rapid Inactivation of Proteins by Rapamycin-Induced Rerouting to Mitochondria', *Developmental Cell*. Elsevier, 18(2), pp. 324–331. doi: 10.1016/j.devcel.2009.12.015.
- Roth, S. and Heintzmann, R. (2016) 'Optical photon reassignment with increased axial resolution by structured illumination', *Methods and Applications in Fluorescence*. IOP Publishing, 4(4), p. 045005. doi: 10.1088/2050-6120/4/4/045005.
- Sandoval, I. V. *et al.* (1994) 'The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes', *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), pp. 6622–6631.
- Sandoval, I. V. *et al.* (2000) 'Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP II and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4', *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), pp. 39874–39885. doi: 10.1074/jbc.M006261200.
- Schindelin, J. *et al.* (2012) 'Fiji : an open-source platform for biological-image analysis', *Nature Methods*, 9(7). doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Stöckli, J., Höning, S. and Rohrer, J. (2004) 'The acidic cluster of the CK2 site of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (CD-MPR) but not its phosphorylation is required for GGA1 and AP-1 binding', *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), pp. 23542–23549. doi: 10.1074/jbc.M313525200.
- Tabuchi, N., Akasaki, K. and Tsuji, H. (2000) 'Two acidic amino acid residues, Asp(470) and Glu(471), contained in the carboxyl cytoplasmic tail of a major lysosomal membrane protein, LGP85/LIMP II, are important for its accumulation in secondary lysosomes', *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications, 270(2), pp. 557–563. doi: 10.1006/bbrc.2000.2448.
- Vega, M. A. *et al.* (1991) 'Targeting of Lysosomal Integral Membrane Protein LIMP II', The Journal of Biological Chemistry, pp. 16269–16272.
- White, J. *et al.* (1999) 'Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells.[erratum appears in J Cell Biol 2000 Jan 10;148(1):followi]', Journal of Cell Biology, 147(4), pp. 743–760.
- Williams, M. A. and Fukuda, M. (1990) 'Accumulation of Membrane Glycoproteins in Lysosomes Requires a Tyrosine Residue at a Particular Position in The Cytoplasmic Tail', The Journal of Cell Biology, 111(September), pp. 955–966.
- Zhou, D. *et al.* (2019) 'Unexpected mode of engagement between enterovirus 71 and its receptor SCARB2', Nature Microbiology. Springer US, 4(3), pp. 414–419. doi: 10.1038/s41564-018-0319-z.
- Zhu, Y. *et al.* (2001) 'Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor', Science, 292(5522), pp. 1716–1718. doi: 10.1126/science.1060896.

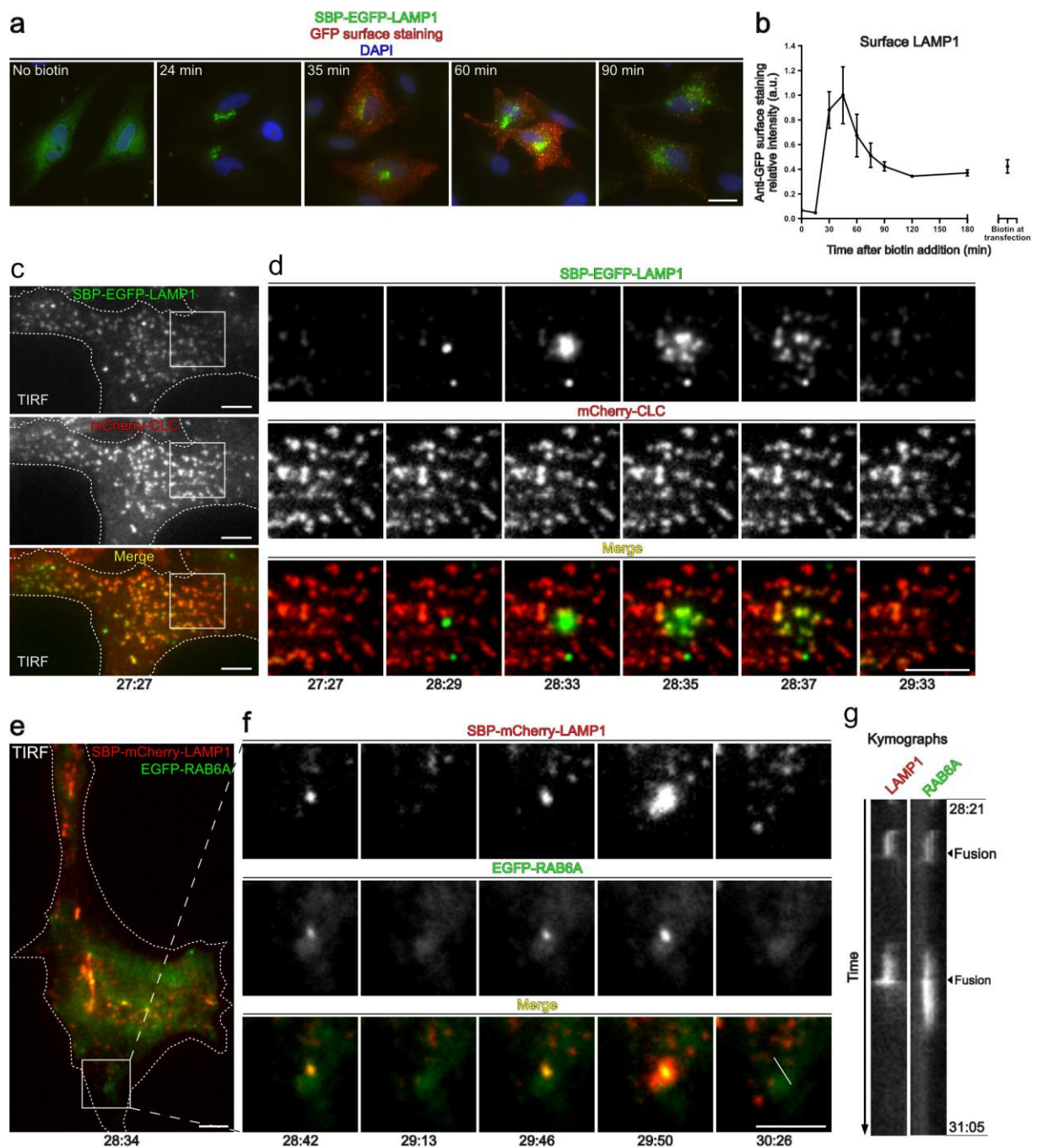


Figure 1. RUSH-synchronised LAMP1 is transported from the Golgi apparatus to the cell surface before being internalized from clathrin-coated pits.

(a) Widefield microscopy images of HeLa cells transiently expressing SBP-EGFP-LAMP1 and Streptavidin-KDEL. Cells were incubated with biotin for the indicated times, stained with an anti-GFP antibody without permeabilization. Scale bar: 5 μ m. (b) Flow cytometry measurement of the surface anti-GFP surface signal intensity of cells treated as in (a). Median anti-GFP intensity of GFP-positive cells normalized to the maximum value is shown. $n = 3$ independent experiments. Error bars: SEM. (c-d) TIRF images of living HeLa cells transiently expressing SBP-EGFP-LAMP1, Streptavidin-KDEL and mCherry-clathrin light chain (CLC) acquired at the indicated times after the addition of biotin. Scale bars: 5 μ m. (d) Enlargement of the boxed area depicted in (c). (d) Time-lapse acquisition of a fusion event magnified from the boxed region in (c). (e-f) TIRF images of living HeLa cells transiently expressing SBP-mCherry-LAMP1, Streptavidin-KDEL and EGFP-RAB6A. Scale bars: 5 μ m. (f) Fusion events magnified from the boxed region in (e). (g) Kymographs along the line in (f) between the two indicated times. Dotted lines highlight the cell contour. Time in min:s.

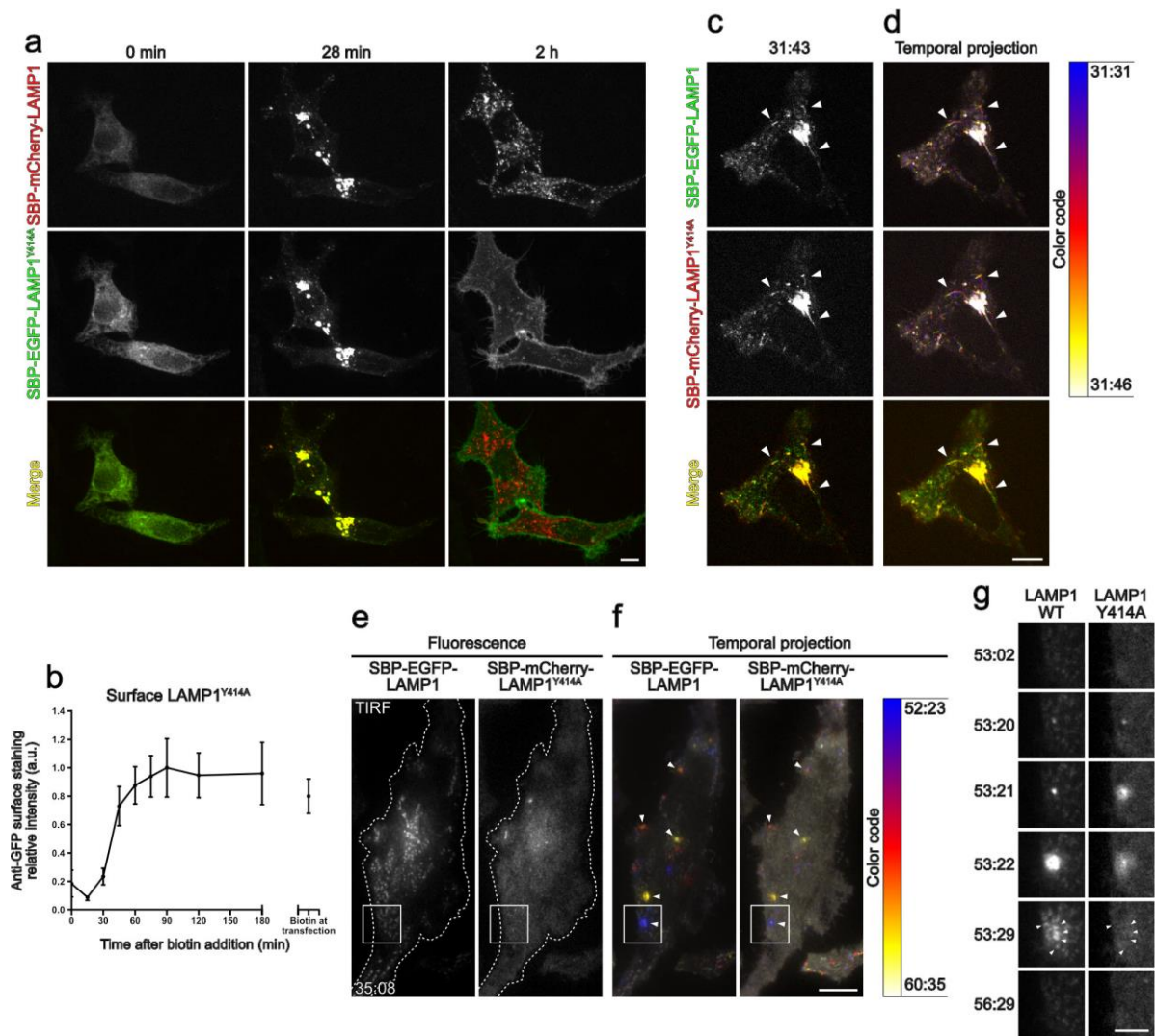


Figure 2. LAMP1^{Y414A} is blocked at the cell surface but follows the same Golgi-to-plasma membrane route than LAMP1 wild type.

(a) Living HeLa cells transiently expressing both SBP-mCherry-LAMP1 (WT) and SBP-EGFP-LAMP1^{Y414A} and Streptavidin-KDEL. The same cells were imaged at different times after the addition of biotin. Images correspond to maximum Z projections of several slices acquired with a spinning disk microscope. Scale bar: 10 μ m. (b) Flow cytometry quantification of the presence of SBP-EGFP-LAMP1^{Y414A} at the plasma membrane. HeLa cells transiently expressing SBP-EGFP-LAMP1^{Y414A} and Streptavidin-KDEL were incubated with biotin for different times, stained with an anti-GFP antibody without permeabilization. Median anti-GFP intensity of GFP-positive cells normalized to the maximum value is shown. n = 3 independent experiments. Error bars: SEM. (c-d) Living HeLa cells transiently expressing both SBP-EGFP-LAMP1 and SBP-mCherry-LAMP1^{Y414A} and Streptavidin-KDEL were acquired every second. Scale bar: 10 μ m. (c) Single Z-slice acquired with a spinning-disk microscope at the indicated time after biotin addition. Arrowheads indicate Golgi exit events. (d) Color-coded temporal projections between the two indicated times. (e-f) TIRF images of living HeLa cells transfected as in (c) and acquired every second. Scale bar: 10 μ m. (f) Color-coded temporal projections between the indicated times. Arrowheads indicate fusion events with the plasma membrane. (g) Magnified view of boxed areas in (e-f). Arrowheads indicate the retention of LAMP1 retention points in clathrin-coated pits. Scale bar: 5 μ m. Time in min:s.

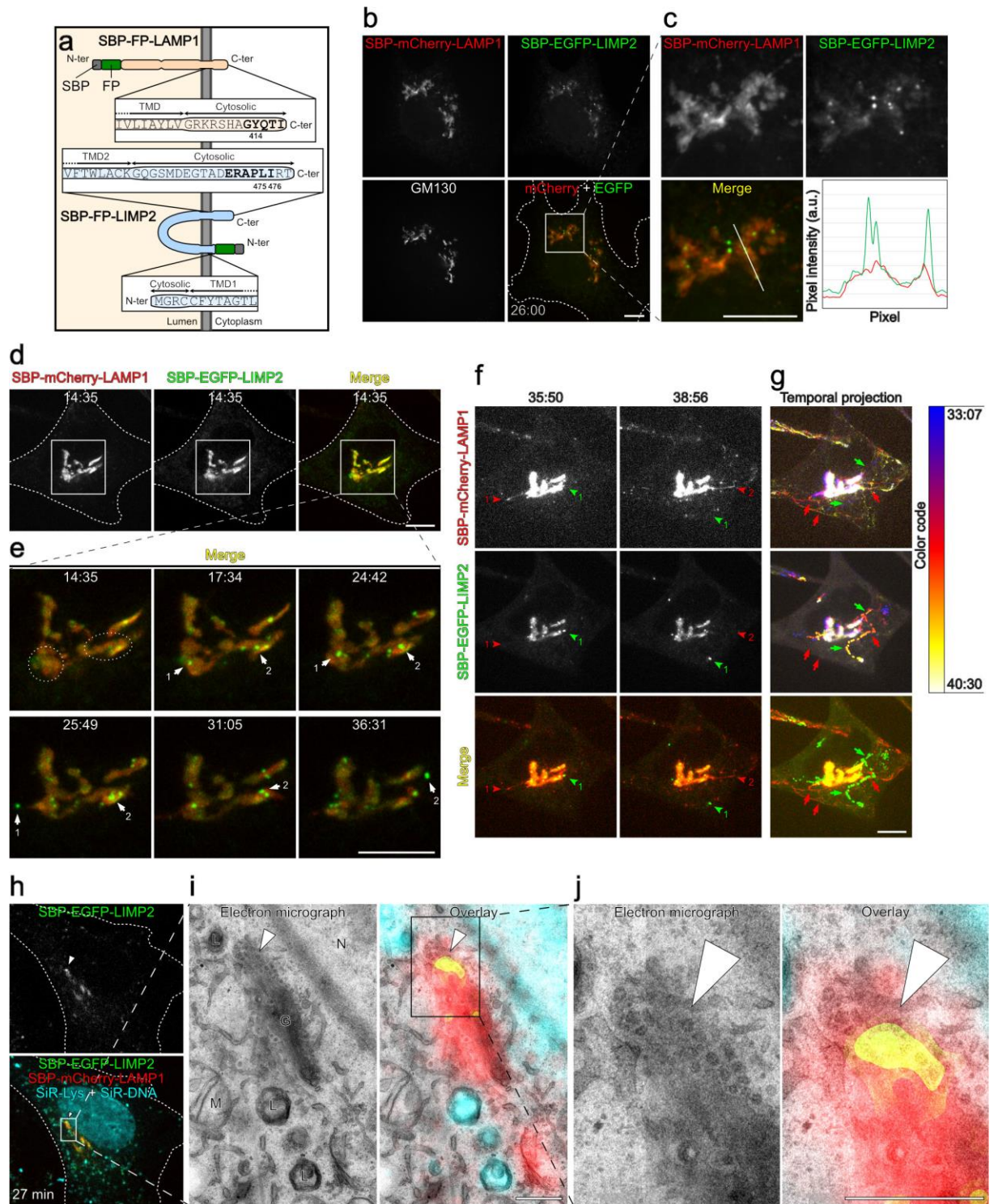


Figure 3. LAMP1 and LIMP2 are segregated and sorted at the Golgi apparatus.

(a) Schematic representations of LAMP1 and LIMP2 topologies, tagging and cytosolic motifs. Clathrin adaptors recruitment signals are shown in bold. (b-c) High-resolution images of HeLa cells transiently transfected to express Streptavidin-KDEL, SBP-mCherry-LAMP1, Streptavidin-HA-Endo-KKXX and SBP-EGFP-LIMP2. Cells were incubated with biotin for 26 min, fixed and stained for GM130. The images correspond to maximum Z projection of high-resolution image stacks. Scale bars: 10 μ m. (c) Magnified view of the boxed area in (b). Linescan of pixel intensities along the line normalised on the Golgi mean intensity. (d-f) Living HeLa cells transfected to express streptavidin-KDEL, SBP-mCherry-LAMP1, mini-Ii-Streptavidin and SBP-EGFP-LIMP2 acquired every two seconds.

Images correspond to maximum Z projection of spinning-disk stacks acquired at indicated times after biotin addition. Scale bars: 10 μm . **(e)** Magnified view of the boxed area in **(d)**. Arrows track two dots from their appearance to their Golgi exit. The dotted ovals highlight the appearance area of the two tracked dots. **(f)** Same cells as in **(d-e)**. Red and green arrowheads indicate carriers that exit the Golgi apparatus for SBP-mCherry-LAMP1 and SBP-EGFP-LIMP2, respectively. **(g)** Color-coded temporal projection between the two indicated times. Arrows track the carriers leaving the Golgi apparatus. Scale bar: 10 μm . **(h-j)** Correlative light-electron microscopy of SBP-EGFP-LIMP2 and SBP-mCherry-LAMP1. HeLa cells were transfected like in **(b-c)** and were live stained using SiR-lysosome (SiR-Lys) and SiR-DNA, incubated with biotin for 27 min, fixed, acquired for fluorescence, and then prepared for TEM. The arrowhead indicates a SBP-EGFP-LIMP2 bright dot at the Golgi apparatus. **(h)** Images are confocal spinning-disk Z slices. Scale bar: 10 μm . **(i-j)** TEM images and fluorescence-EM correlation. The SiR-lysosome staining was used for the correlation. L, lysosome; M, mitochondria; N, nucleus; G, Golgi stack. Scale bar: 1 μm . Time in min:s.

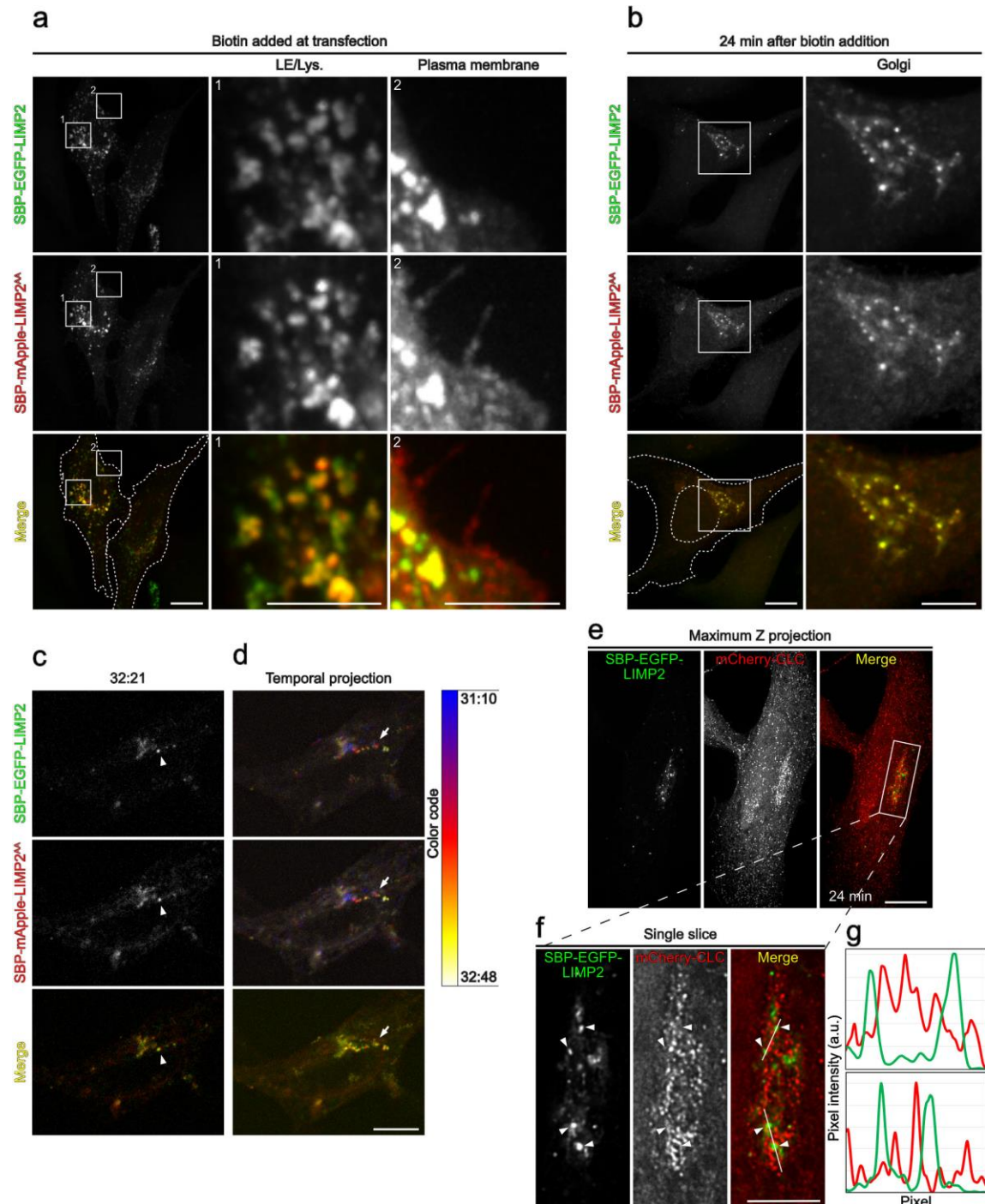


Figure 4. LIMP2 [D/E]XXXL[L/I] motif is not involved in its sorting at the Golgi apparatus.

(a-b) HeLa cells transiently expressing mini-li-Streptavidin, SBP-EGFP-LIMP2 WT, streptavidin-HA-Endo-KKXX and SBP-mApple-LIMP2AA. Images correspond to maximum Z projection of spinning disk confocal stacks. Scale bars: 10 μ m, magnified views: 5 μ m. (b) Cells were incubated with biotin for 24 min and fixed. (c-d) HeLa cells were transfected to express mini-li-Streptavidin, SBP-EGFP-LIMP2 WT and SBP-mApple-LIMP2AA. Pictures were acquired every two seconds to follow the Golgi exit events. Scale bar: 10 μ m. (c) Arrowheads point out a compartment exiting the Golgi apparatus. (d) Color-coded temporal projection between the two indicated times. Arrows indicate a track exiting the Golgi apparatus. (e-f) High resolution image of HeLa cells transiently expressing mini-li-Streptavidin, SBP-EGFP-LIMP2 and mCherry-clathrin light chain (CLC). The cells were incubated with biotin for 24 min and fixed. Images correspond to maximum Z projections (e) or single slices (f) of high-resolution image stacks and deconvolved. (e) Scale bar: 10 μ m. (f) Arrowheads indicate LIMP2 bright dots at the Golgi apparatus. Scale bar: 5 μ m. (g) Linescans of pixel intensity along the two lines in (f), normalised to the maxima. Time in min:s.

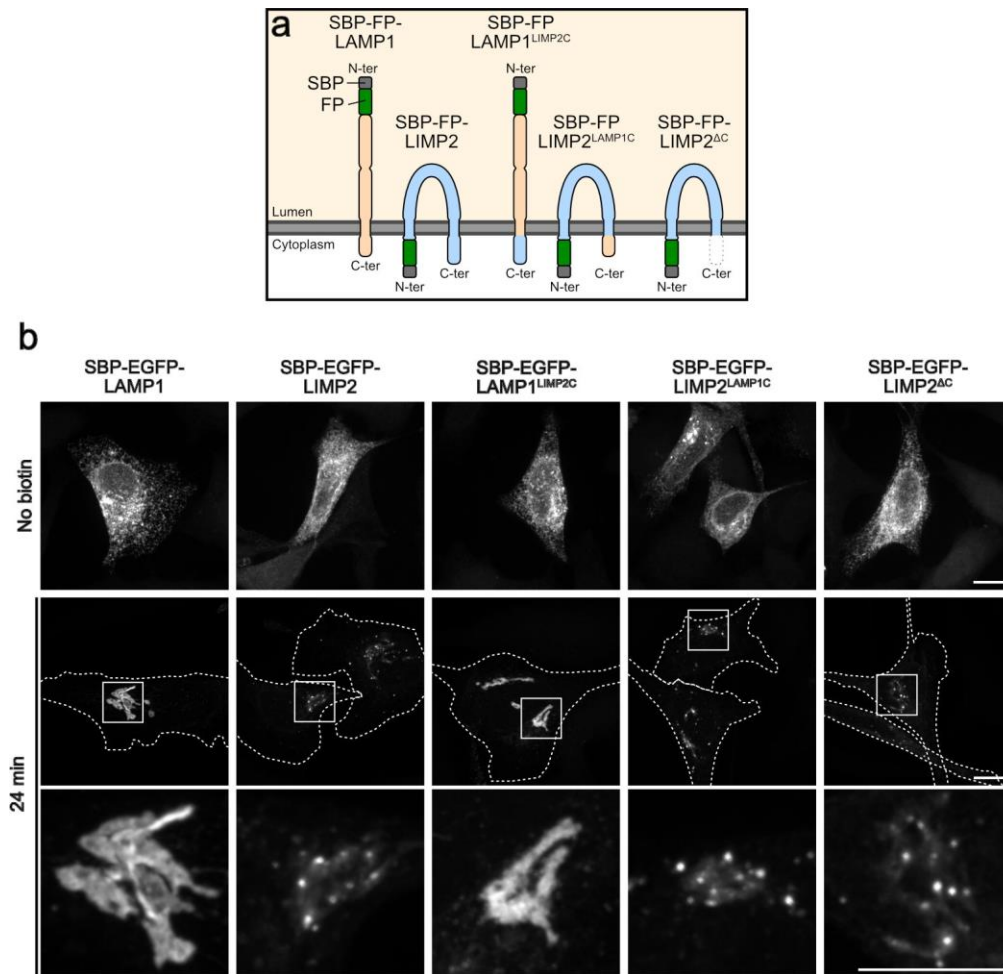
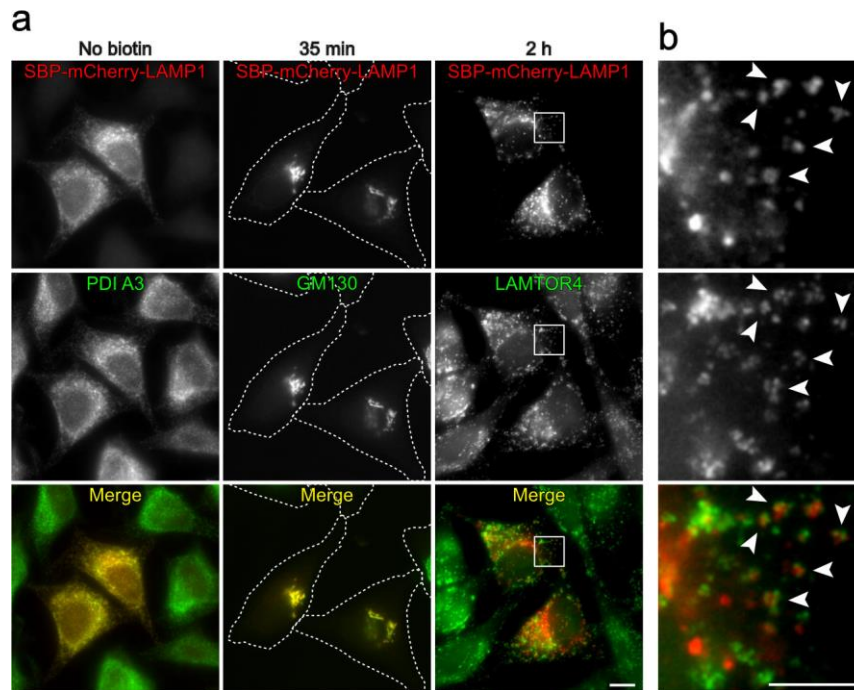


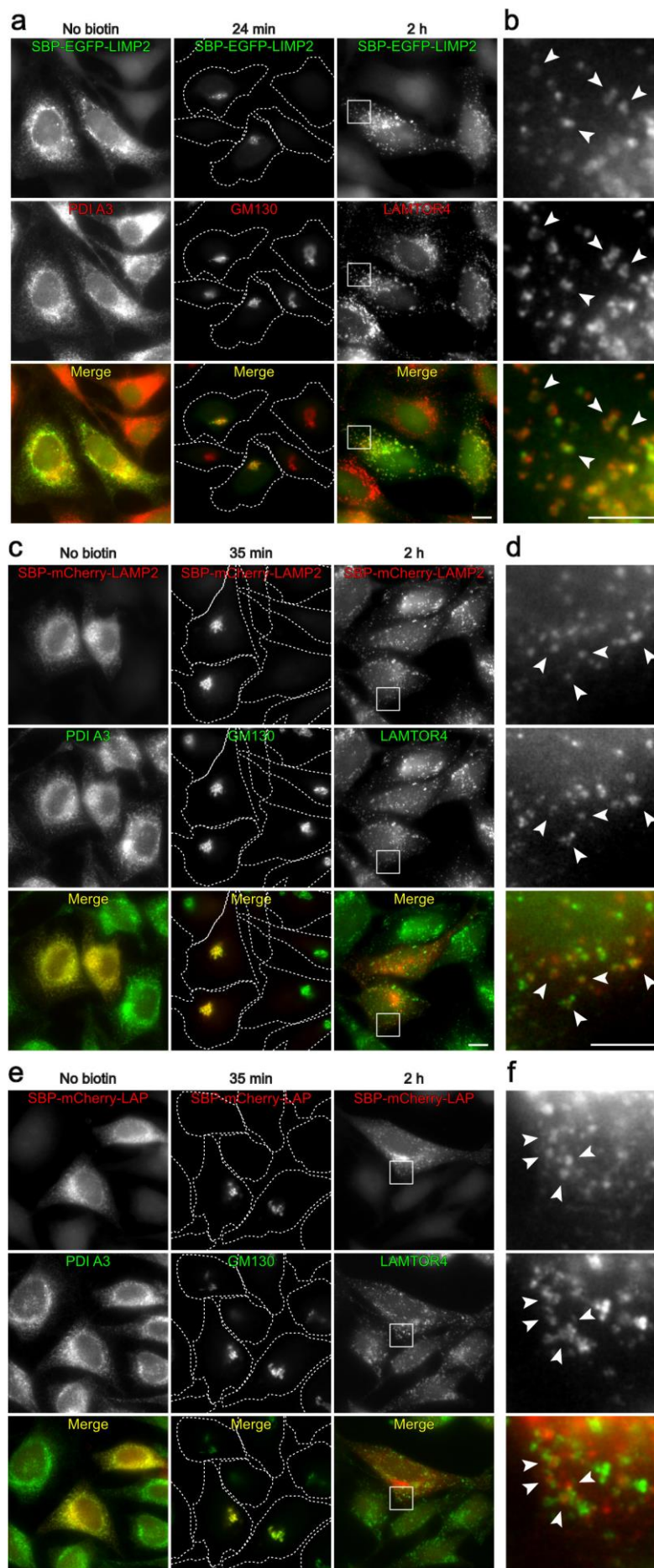
Figure 5. LIMP2 C-terminal cytosolic domain is not involved in its sorting at the Golgi apparatus.

(a) Schematic representation of the LAMP1/LIMP2 chimeras and LIMP2 deletion mutant. **(b)** HeLa cells were transfected to express Streptavidin-KDEL (for SBP-EGFP-LAMP1 or SBP-EGFP-LAMP1^{LIMP2C}) or mini-Ii-Streptavidin (for SBP-EGFP-LIMP2, SBP-EGFP-LIMP2^{LAMP1C} or SBP-EGFP-LIMP2^{ΔC}) treated or not with biotin for 24 min and fixed. Images correspond to maximum Z projection of spinning disk confocal image stacks. Dotted lines indicate cells contour. Bottom panel correspond to enlargement of the Golgi region boxed in upper lane. Scale bars: 10μm.



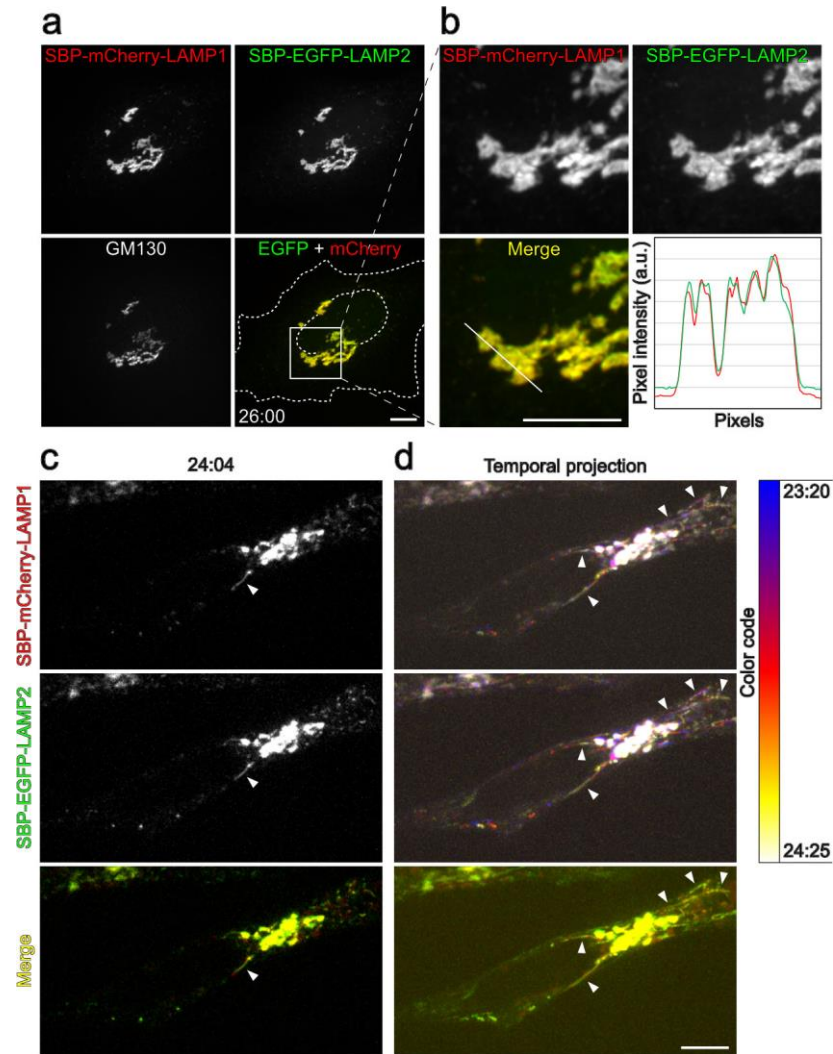
Supplementary figure 1. **RUSH-synchronised LAMP1 reaches late endosomes/lysosomes.**

(a-b) Widefield microscopy images of HeLa cells expressing SBP-mCherry-LAMP1 and Streptavidin-KDEL. The cells were incubated with biotin for the indicated times, fixed and stained for the ER marker PDI isoform A3, the Golgi marker GM130 and or the lysosome marker LAMTOR4. **(a)** Scale bar: 10 µm. **(b)** Magnified views of boxed areas. Arrowheads point SBP-mCherry-LAMP1 positive compartments decorated with LAMTOR4. Scale bars: 5 µm.



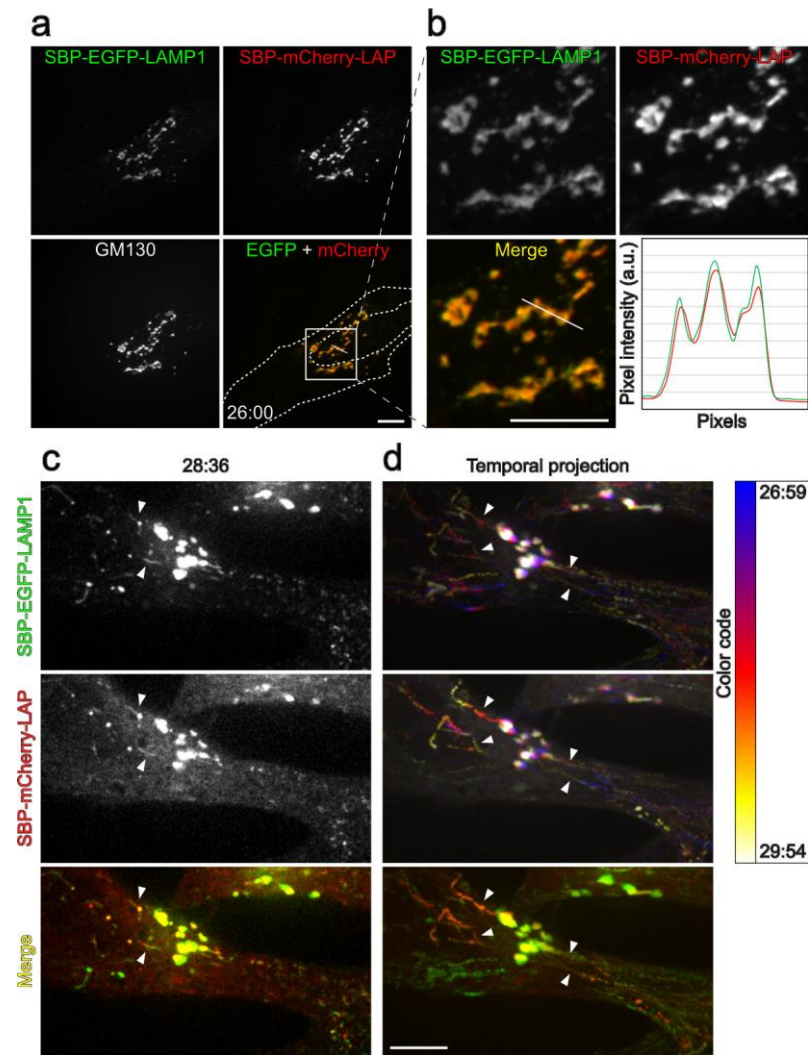
Supplementary figure 2. **RUSH synchronised LIMP2, LAMP2 and LAP reach late endosomes/lysosomes.**

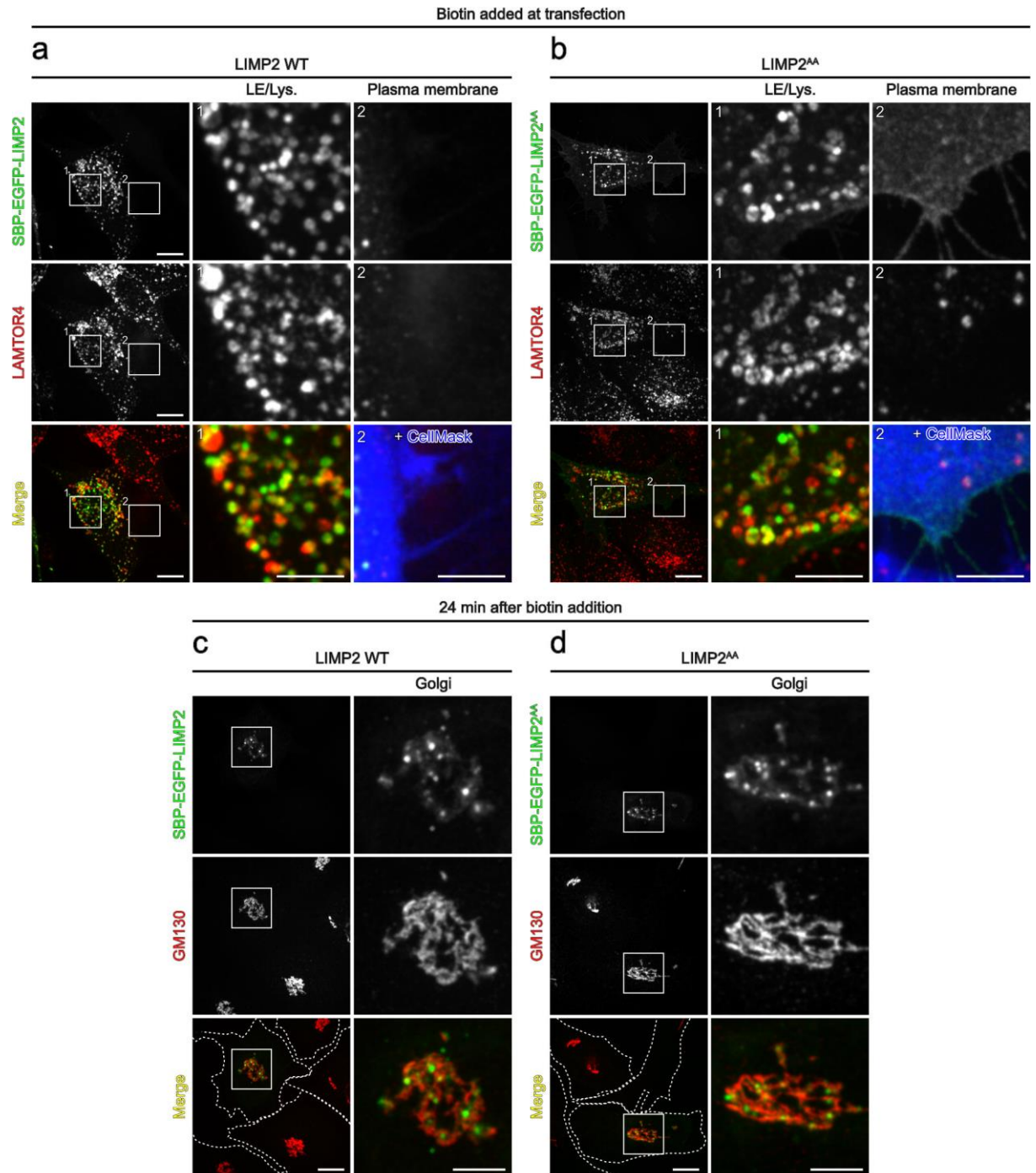
(a-f) Widefield microscopy images of HeLa cells transfected to express the mini-li-Streptavidin (a-b) or Streptavidin-KDEL (c-f) and indicated cargos. The cells were incubated with biotin for the indicated times, fixed and stained for PDI isoform A3 or GM130 and LAMTOR4. (a, c, e) Scale bars: 10 µm. (b, d, f) Magnified views of boxed areas. Arrowheads point out compartments colocalising with LAMTOR4. Scale bars: 5 µm.



Supplementary figure 3. **LAMP1 and LAMP2 are not sorted at the Golgi apparatus.**

(a-b) HeLa cells were transfected to express Streptavidin-KDEL, SBP-mCherry-LAMP1 and SBP-EGFP-LAMP2. Cells were incubated with biotin for 26 min and fixed. The images are maximum Z projection of high-resolution images stacks. Scale bars: 10 μ m. **(b)** Magnified view of the boxed area in (a). The curves show the pixel intensities along the white line normalised to the Golgi mean intensity. **(c-d)** The cells were transfected like in **(a-b)** and were acquired live. Scale bar: 10 μ m. **(c)** Images are maximum Z projection of spinning-disk confocal stacks acquired at indicated time after biotin addition. The arrowheads point out Golgi exit events. **(d)** Color-coded temporal projection between indicated times. Arrowheads point out Golgi exit tracks. Time in min:s.





Supplementary figure 5. **LIMP2 [D/E]XXXL[L/I] motif is not involved in the formation of LIMP2 bright dots at the Golgi apparatus.**

(a-b) HeLa cells transiently expressing mini-li-Streptavidin and SBP-EGFP-LIMP2 **(a)** or SBP-LIMP2-LIMP2^{AA} **(b)**. Biotin was added at the time of transfection. The cells were fixed the day after and stained with anti-LAMTOR4 and HCS CellMask. Images are maximum projection of confocal Z stacks. Scale bars: 10 μ m, magnified views: 5 μ m. **(c-d)** HeLa cells were transfected like in **(a-b)**. The day after transfection, cells were incubated with biotin for 24 min, fixed and stained for GM130. Images are maximum projection of confocal Z stacks. Scale bars: 10 μ m, magnified views: 5 μ m.

2 Réalisation d'un crible d'inactivation de gènes : à la recherche de régulateurs du trafic de LAMP1

Contexte

La glycoprotéine LAMP1 est surexprimée à la surface cellulaire dans plusieurs types de cancer. Cela a notamment été montré dans des lignées humaines de cancers colorectaux, de leucémies myélomonocytaires, de mélanomes métastatiques, et de fibrosarcomes (Mane *et al.*, 1989; Saitoh *et al.*, 1992; Sarafian *et al.*, 1998). À la surface cellulaire, LAMP1 semble jouer plusieurs rôles en lien avec l'agressivité tumorale. Elle a par exemple été impliquée dans la capacité des cellules cancéreuses à migrer et former des métastases (Saitoh *et al.*, 1992; Krishnan *et al.*, 2005; Agarwal et Kalraiya, 2014; Agarwal, Gude et Kalraiya, 2014; Agarwal *et al.*, 2015). Une étude a également montré que LAMP1 à la surface cellulaire joue un rôle protecteur face aux perforines sécrétées par les cellules NK (Cohnen *et al.*, 2013). De façon intéressante, ces deux rôles ont été associés aux glycosylations portées par LAMP1 : d'une part, ses N-glycosylations sont impliquées dans sa liaison à la galectine 3, lui conférant ses

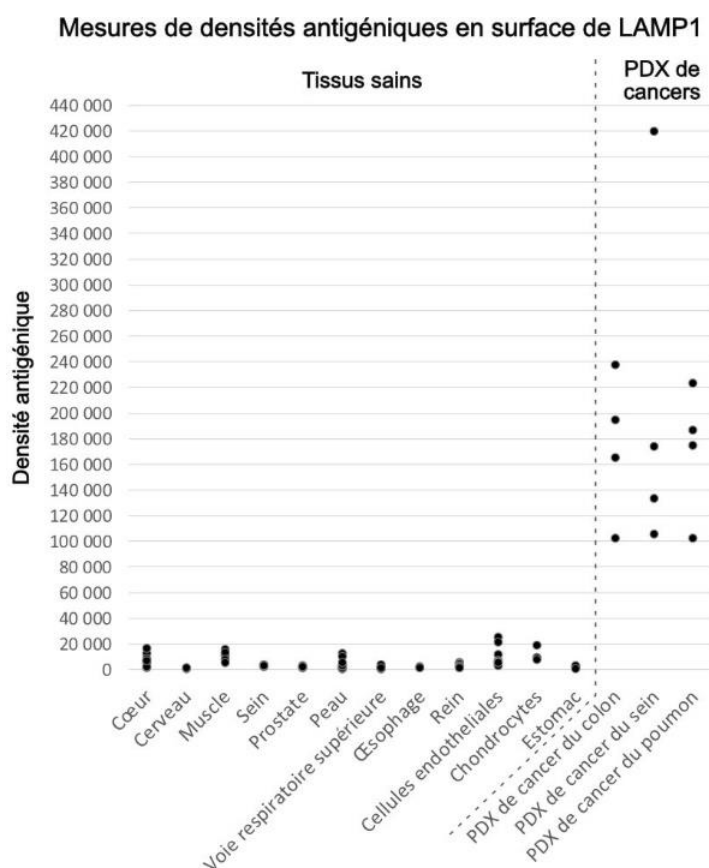


Figure 1. **LAMP1 est fortement surexprimée à la surface de certaines PDX.** Mesures de densités antigéniques de la protéine LAMP1 à la surface des cellules de tissus sains ou de xénogreffes cancéreuses dérivées de patients (PDX, pour *Patient Derived Xenografts*). Données produites et fournies par l'équipe de Yves Baudat (Centre de Recherche de Sanofi-Vitry, Vitry-sur-Seine, Paris).

fonctions dans la migration cellulaire et la formation de métastases (Sarafian *et al.*, 1998; Agarwal et Kalraiya, 2014; Agarwal, Gude et Kalraiya, 2014; Agarwal *et al.*, 2015) ; et d'autre part ses O-glycosylations sont décisives dans son rôle de protection face aux cellules NK (Cohnen *et al.*, 2013).

En accord avec ces informations, des données internes à Sanofi montrent des niveaux très importants de LAMP1 en surface de certaines xénogreffes cancéreuses dérivées de patients (PDX, pour *Patient Derived Xenograft*) (**Fig. 1** ; données fournies par l'équipe d'Yves Baudat, Centre de Recherche de Sanofi-Vitry, Vitry-sur-Seine). De façon intéressante, cette surexposition en surface n'est pas associée à une amplification génique de LAMP1 (données non montrées) suggérant l'existence de mécanismes moléculaires sous-jacents dans certains cancers.

Dans ce contexte, et pour faire suite à notre étude sur les voies de trafic de LAMP1 (**Manuscrit d'article : *Lysosomal membrane proteins LAMP1 and LIMP2 are segregated and sorted in the Golgi apparatus independently of their clathrin adaptor binding motif***), nous avons établi un protocole de criblage génétique avec deux objectifs :

- 1) identifier des nouveaux régulateurs du trafic de LAMP1 ;
- 2) identifier des mécanismes moléculaires mis en œuvre dans la surexposition de LAMP1 à la surface cellulaire dans les cancers.

Ainsi, nous avons entrepris la réalisation d'un crible d'inactivation de gènes basé sur la technologie CRISPR-Cas9.

Brièvement, la technologie CRISPR-Cas9 correspond à l'adaptation d'un système immunitaire adaptatif présent chez certaines espèces de bactéries et d'archées (le système CRISPR-Cas ; pour plus de détails, voir la revue Hille *et al.*, 2018). Ce système peut être détourné dans un contexte eucaryote pour une édition ciblée du génome et la génération de cellules ayant perdu l'expression d'un gène d'intérêt. Un ARN dit "guide" et la nucléase Cas9 (provenant le plus souvent de *Streptococcus pyogenes*) sont insérés dans la cellule eucaryote. L'ARN guide permet la reconnaissance par appariement de la région ciblée du génome. La nucléase Cas9, associée à l'ARN guide, permet le clivage de l'ADN double brin dans la région ciblée. Après coupure, les mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN peuvent entraîner des mutations ponctuelles ou des changements de cadre de lecture, ce qui peut mener à l'inactivation du gène ciblé. Pour plus de détails sur la technique, voir la revue Adli, 2018.

Réalisation du crible

Une lignée cellulaire humaine de cancer du sein T47D transduite 1) pour exprimer la nucléase Cas9 de façon inducible par la doxycycline ; et 2) par une banque d'ARN guides a été utilisée. La banque est composée d'environ 168 000 ARN guides différents, le tout ciblant environ 18 000 gènes, avec une moyenne de 9,3 ARN guides différents par gène. La stratégie a consisté à générer des cellules mutantes par édition du génome et sélectionner par cytométrie en flux 1) les cellules qui surexposent LAMP1 à la surface cellulaire d'une part et 2) les cellules dont la présence de LAMP1 en surface a été réduite. Dans un premier temps, nous avons confirmé que les cellules T47D expriment LAMP1 à leur surface à des niveaux comparables aux cellules HeLa, et à la lignée cellulaire non transformée hTERT-RPE1 (**Fig. 2a**). Nous avons aussi vérifié que des variations de la quantité de LAMP1 en surface étaient détectables en cytométrie en flux. La déstabilisation du complexe adaptateur de la clathrine AP2 déplace LAMP1 à la membrane plasmique (Janvier et Bonifacino, 2005). Nous avons donc ciblé la sous-unité α de AP2 par ARN interférence pour induire une augmentation de LAMP1 en surface. Nous avons aussi ciblé *LAMP1* pour induire une diminution de LAMP1 en surface. La mesure par cytométrie en flux permet effectivement de visualiser des populations cellulaires avec une quantité différente de LAMP1 à leur surface en fonction du traitement (**Fig. 2b**). Cependant, les différentes populations se chevauchent, compliquant le tri d'une

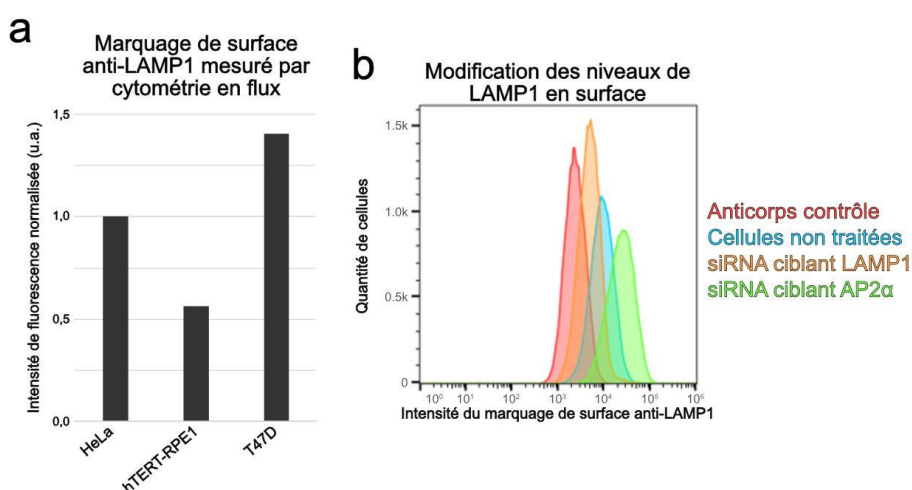


Figure 2. **Quantification de la présence de LAMP1 à la surface des cellules T47D.** (a) Évaluation de la quantité de LAMP1 en surface des cellules T47D, comparés aux cellules HeLa et à la lignée non transformée hTERT-RPE1. Les cellules ont été sujettes à un marquage de surface anti-LAMP1 et l'intensité de fluorescence des cellules a été mesurée par cytométrie en flux. Le graphique représente l'intensité médiane au sein des populations, normalisées sur les cellules HeLa. (b) Trois jours après transfection avec les siRNA indiqués, des cellules T47D non perméabilisées ont été marquées avec un anticorps antiLAMP1 et l'intensité de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux.

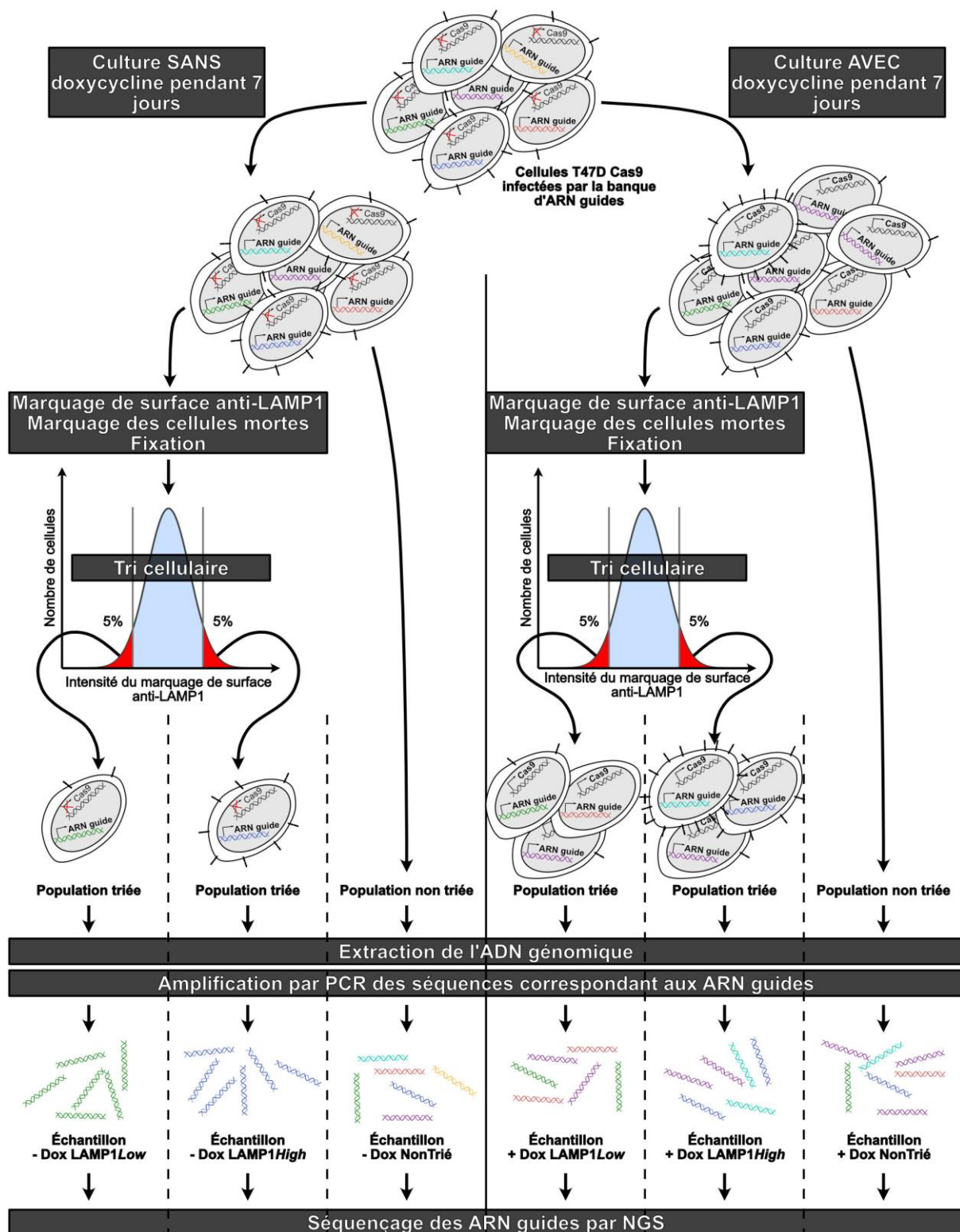


Figure 3. Représentation des étapes principales du crible.

population unique. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de ne pas trier des populations distinctes de la population non éditée, mais de trier une proportion de la population éditée totale, comme réalisé dans d'autres cribles similaires (Parnas *et al.*, 2016; Potting *et al.*, 2018; Pusapati *et al.*, 2018). Il est alors nécessaire d'avoir une approche

statistique robuste pour exclure les contaminants. Quatre répliques de notre crible ont donc été réalisés.

Les grandes étapes du crible sont présentées dans la **Fig. 3**. Brièvement, les cellules ont été cultivées avec de la doxycycline pendant 7 jours pour induire l'expression de Cas9 et l'édition du génome. Un marquage avec un anticorps dirigé contre LAMP1 a ensuite été réalisé sur cellules non perméabilisées.

Un marquage des cellules mortes et/ou perméabilisées a été également réalisé pour les exclure de l'analyse. Les cellules présentant les niveaux de LAMP1 en surface les plus faibles et les plus élevés, de part et d'autre de la population, ont été sélectionnées (**Fig. 3**). Les seuils pour chacun de ces tris ont été fixés à 5% de la population totale. Les populations résultantes sont notées "+Dox LAMP1*Low*" et "+Dox LAMP1*High*". L'ADN génomique de ces populations a été extrait et les séquences d'ADN correspondant aux ARN guides ont été amplifiées par PCR. Finalement, les amplicons purifiés, ont été analysés par séquençage à haut débit. La population +Dox LAMP1*Low* permettra l'identification de gènes dont la déplétion diminue la quantité de LAMP1 en surface. À l'inverse, la population -Dox LAMP1*High* permettra l'identification de ceux dont la déplétion entraîne une surexposition de LAMP1 en surface.

En parallèle, plusieurs populations témoins ont aussi été préparées (**Fig. 3**) :

- Une population sans doxycycline pour chacune des populations triées, notées "-Dox LAMP1*Low*" et "-Dox LAMP1*High*". Sans doxycycline, l'expression de Cas9 n'est pas induite et l'édition du génome n'a pas lieu. La comparaison des populations +Dox et -Dox permet d'évaluer l'enrichissement des ARN guides réellement liés aux niveaux de LAMP1 en surface dans les populations d'intérêts.
- Une population +Dox non triée et -Dox non triée. La comparaison des populations +Dox NonTrié et -Dox NonTrié permet d'exclure les contaminants enrichis dans les populations d'intérêt du fait de la doxycycline mais indépendamment du niveau de LAMP1 en surface (par exemple, les gènes dont la déplétion accélèrent le cycle cellulaire).

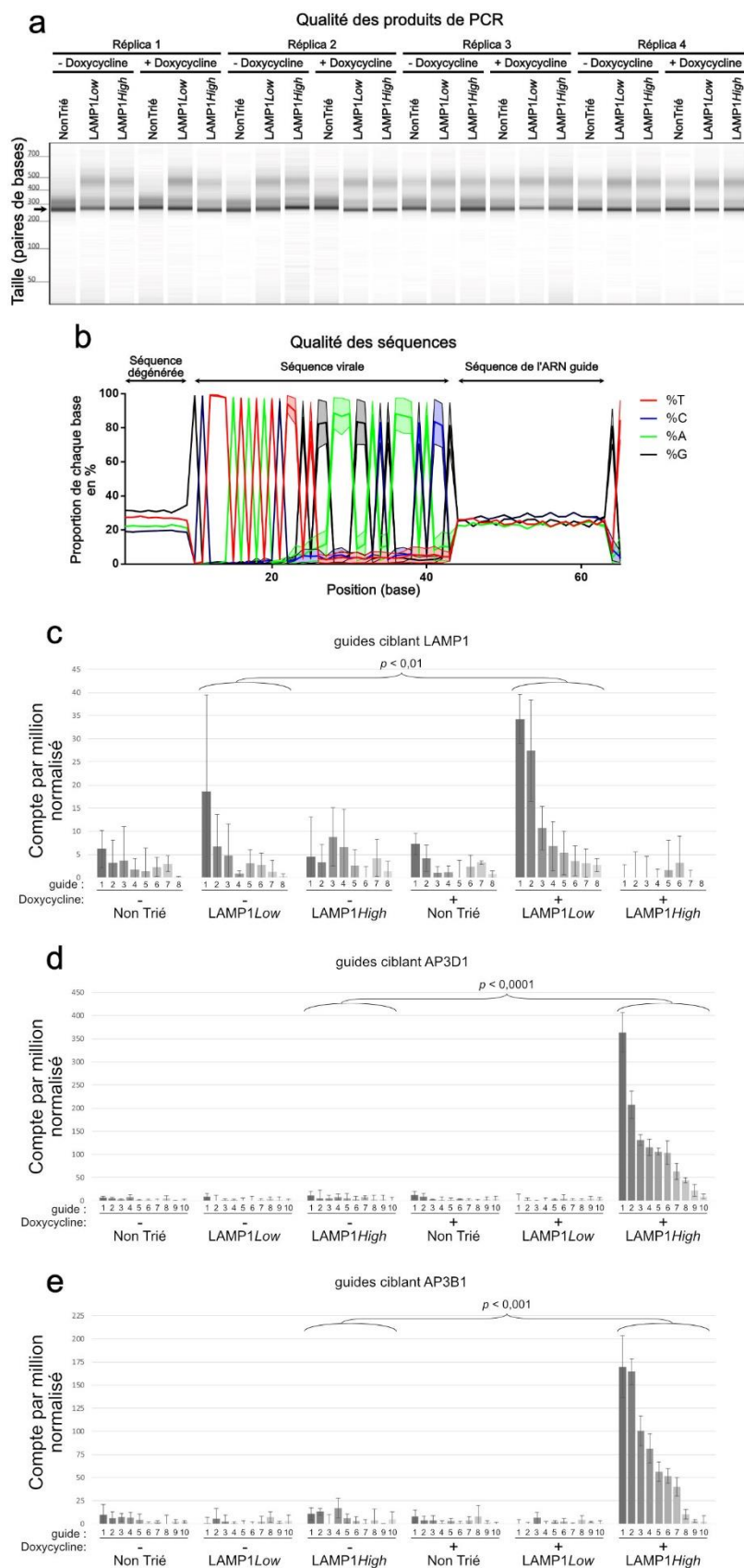


Figure 4. Qualité des séquences et contrôles du crible. (a) Migration des produits de PCR purifiés avant séquençage. La taille attendue est de 260 pb (flèche). Migration de 0,4 ng de produit de PCR sur un système Agilent 4200 TapeStation. (b) Proportions de chaque base à chaque position moyennées pour les 24 échantillons (moyenne +/- écart-type). (c-e) Proportions de *reads* correspondant aux ARN guides ciblant les gènes contrôles. Barres d'erreur : écarts-types. Valeurs p indiquées : valeurs p générales après agrégation des guides.

Résultats et discussion

Validation de la méthode

Après séquençage, parmi les 167 957 ARN guides et 18 065 gènes théoriques de la banque, 121 283 ARN guides (72,2%), ciblant 17 818 gènes (98,6%) ont été retrouvés (avec une moyenne de 6,8 ARN guide par gène). Des gènes témoins ont été définis pour valider la technique et calibrer la méthode d'analyse statistique. Le complexe AP2 étant essentiel à la survie cellulaire, AP2 α n'a pas été choisi comme témoin. Le complexe AP3 a été décrit comme nécessaire pour le trafic de LAMP1 vers les lysosomes (Le Borgne *et al.*, 1998). La déplétion de ses sous-unités δ ou β 3A déplace LAMP1 en surface sans être létal pour la cellule (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Peden *et al.*, 2004). Pour cette raison, les gènes *AP3D1* et *AP3B1*, codant pour δ et β 3A, ont été choisis comme témoins pour l'enrichissement dans la population +Dox LAMP1*High*. Le gène *LAMP1* a été choisi comme témoin pour l'enrichissement dans la population +Dox LAMP1*Low*. Les ARN guides ciblant *LAMP1* sont significativement enrichis (valeur p générale < 0,01 ; agrégation statistique de la comparaison des 8 ARN guides (voir **Matériels et Méthodes**)) dans la population LAMP1*Low* (**Fig. 4c**). De façon intéressante, ces ARN guides sont aussi significativement déplétés dans la population +Dox LAMP1*High* (valeur p pour la déplétion < 0,01) (**Fig. 4c**), confirmant que la population de cellules est bien déplacée vers des niveaux plus faibles de LAMP1 en surface. À l'opposé, les ARN guides ciblant les gènes *AP3D1* et *AP3B1* (gène de la sous-unité β 3 de AP3) sont significativement enrichis dans la population +Dox LAMP1*High* (respectivement, valeur p < 0,0001 et p < 0,001 ; **Fig. 4c, d**). Ensemble, ces résultats démontrent la validité de la méthode de criblage.

ARN guides significativement enrichis

Après exclusion des contaminants (voir **Matériels et Méthodes**), les listes des gènes dont les guides sont significativement enrichis comptent 568 gènes pour la population LAMP1*Low* et 514 gènes pour la population LAMP1*High*. Ceux présentant les valeurs p les plus basses et les taux d'enrichissement les plus élevés sont indiqués dans la **Fig. 5**.

Ces listes de gènes obtenues sont toujours en cours d'analyse. Il est évidemment nécessaire de confirmer les gènes d'intérêt par des techniques de déplétion différentes pour pouvoir conclure sur leur implication dans la localisation de LAMP1. Cependant, du fait de la grande redondance de certaines fonctions cellulaires dans ces listes, il est déjà possible de tirer quelques conclusions.

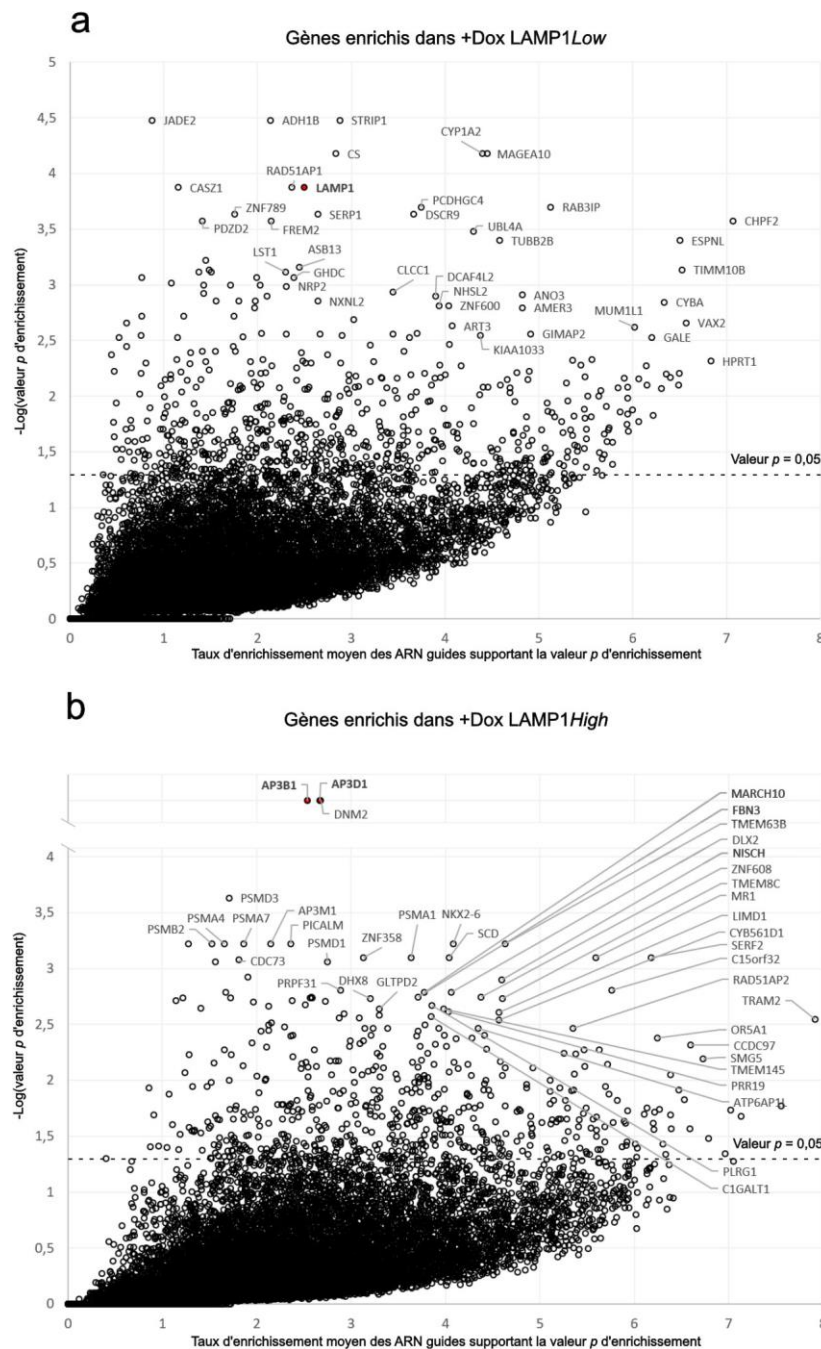


Figure 5. **Représentation de l'ensemble des gènes selon leur enrichissement.** (a-b) Les graphiques représentent la totalité des gènes de la banque retrouvés après séquençage selon leur valeur p d'enrichissement et le taux d'enrichissement. Ces valeurs ont été calculées en comparant les populations +Dox et -Dox pour chacune des populations LAMP1^{High}, LAMP1^{Low} et NonTrié. Le taux d'enrichissement est calculé en moyennant par gène les taux d'enrichissement des guides qui supportent la valeur p d'enrichissement (voir **Matériels et méthodes**). Les gènes témoins apparaissent en rouge. (b) Dans le cas de AP3B1, AP3D1 et DNM2, les points ont été manuellement ajoutés au graphique. Ces gènes présentant une valeur p d'enrichissement de 0, il n'est pas possible de calculer leur Log. Leur position sur l'axe x correspond bien aux valeurs réelles.

Un élément intéressant est l'abondance dans les gènes enrichis dans LAMP1^{High} de gènes codant pour des sous-unités du protéasome (gènes « PSMxx » ; **Fig. 5b, Tableau 1**). Plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes d'ubiquitinylation sont aussi enrichis dans LAMP1^{High} (**Tableau 2**). Cela pourrait signifier que LAMP1 est dégradée par la voie du protéasome. Une défaillance du système d'ubiquitinylation ou du protéasome entrainerait alors une surexpression globale de LAMP1, et ainsi une surexposition en surface. LAMP1 a déjà été montré comme étant la cible d'ubiquitynylations, mais celles-ci semblent plutôt associées à une dégradation par autophagie (Yoshida *et al.*, 2017). Le complexe

d'ubiquitylation impliqué dans ce processus a été identifié et se compose de SKP1, CUL1 et FBXO27 (Yoshida *et al.*, 2017). Mais les ARN guides ciblant les gènes codant pour ces protéines ne sont pas significativement enrichis dans LAMP1*High*. De façon intrigante, la majorité des gènes de cette liste code pour des ligases E3 de l'ubiquitine (**Tableau 2**, *TRIM68*, *MARCH8*, *MYCBP2*, *UBE3C*, *PPIL2*, *SHPRH*, *RNF34* et *KLHL11*). Si elles sont toutes impliquées dans l'ubiquitylation de LAMP1, on pourrait s'attendre à ce que leurs fonctions soient redondantes, et de fait, qu'elles soient difficilement identifiées au cours d'un crible d'inactivation de gène comme celui-ci. Un mécanisme indirect pourrait être mis en jeu. Le système ubiquitine/protéasome prend en charge, entre autres, la dégradation de protéines mal repliées (Nandi *et al.*, 2006). Des dysfonctions dans le système ubiquitine/protéasome entraîne une accumulation d'agrégats dans la cellule (Junn *et al.*, 2002; Bennett *et al.*, 2005; Chhangani *et al.*, 2014; Kitajima *et al.*, 2014). L'accumulation d'agrégats dans le cytosol mobilise la macroautophagie pour leur dégradation (Hytinen *et al.*, 2014). Or, l'activation de la macroautophagie est étroitement liée à l'activité du facteur de transcription TFEB (Settembre *et al.*, 2011; Napolitano et Ballabio, 2016). TFEB régule la biogenèse des lysosomes en régulant l'expression de nombreuses protéines lysosomales, incluant LAMP1 (Palmieri *et al.*, 2011; Napolitano et Ballabio, 2016). Dans ce contexte, il est facile d'imaginer qu'une accumulation d'agrégats due à une défaillance du système ubiquitine/protéasome pourrait induire une surexpression globale de LAMP1.

De nombreuses protéines liées aux mécanismes d'ubiquitylation sont aussi retrouvées dans la liste des guides enrichis dans LAMP1*Low* (**Tableau 2**). Dans ce cas, leur présence est peut-être à mettre en lien avec les rôles de l'ubiquitine dans l'endocytose et dans le tri des cargos au sein de la voie d'endocytose. Ces protéines feront l'objet d'une attention particulière lors de la validation des gènes d'intérêt.

De nombreux gènes enrichis dans LAMP1*High* comme dans LAMP1*Low* sont des régulateurs du trafic membranaire (**Tableau 3**). Comme attendu pour la liste LAMP1*High*, plusieurs protéines sont impliquées dans l'endocytose (*DNM2*, *PICALM*, *AP2M1* et *DBNL*). À noter que parmi ceux-ci, *DNM2*, le gène codant pour la dynamine 2, est enrichi avec une valeur *p* similaire aux deux témoins *AP3D1* et *AP3B1* dans LAMP1*High* (**Fig. 5b**).

D'autres gènes impliqués dans la régulation du trafic membranaire, mais, *a priori*, sans lien avec l'endocytose, sont aussi enrichis (**Tableau 3**). Cela suggère que la méthode utilisée

Tableau 1. **Sous-unités du protéasome parmi les gènes enrichis dans +Dox LAMP1High.**

Gène	Valeur <i>p</i> d'enrichissement	Enrichissement	ARN guides supportant la valeur <i>p</i> d'enrichissement	Significativement déplété dans LAMP1Low
PSMA1	< 0,001	5,6	3/6	
PSMA4	< 0,001	5,4	4/10	X
PSMD8	< 0,001	2,8	3/9	X
PSMB2	< 0,001	1,5	2/10	X
PSMD7	< 0,001	0,9	2/10	X
PSMB4	< 0,01	3,1	2/10	X
PSMA5	< 0,01	3,1	2/10	
PSMA2	< 0,01	2,2	7/9	
PSMD6	< 0,01	1,1	9/17	X
PSMB6	< 0,05	3,1	7/9	
PSMC4	< 0,05	2,1	4/10	X
PSMD14	< 0,05	1,8	2/9	X
PSMD11	< 0,05	1,5	4/9	X
PSMD12	< 0,05	1,1	2/9	

Tableau 2. **Listes non exhaustives de gènes liés à l'ubiquitinylation parmi les gènes enrichis dans +Dox LAMP1Low ou +Dox LAMP1High.**

Gènes dont les ARN guides sont enrichis dans +Dox LAMP1Low					Gènes dont les ARN guides sont enrichis dans +Dox LAMP1High				
Gène	Valeur <i>p</i> d'enrichissement	Enrichissement	ARN guides supportant la valeur <i>p</i> d'enrichissement	Significativement déplété dans LAMP1High	Gène	Valeur <i>p</i> d'enrichissement	Enrichissement	ARN guides supportant la valeur <i>p</i> d'enrichissement	Significativement déplété dans LAMP1Low
UBL4A	< 0,001	4,3	2/6		USP1	< 0,01	4,3	2/5	
ASB13	< 0,001	2,4	4/8		BRCC3	< 0,01	2,7	6/8	
COPS6	< 0,01	5,5	1/2		TRIM68	< 0,01	1,8	4/7	
RANBP10	< 0,01	5,4	1/4		MARCH8	< 0,01	1,7	5/8	
COPS2	< 0,01	4,5	2/10		MARCH10	< 0,01	0,5	3/8	
DCAF4L2	< 0,01	3,9	2/6		MYCBP2	< 0,05	2,6	2/6	
SIMC1	< 0,01	3,9	2/7		COPS7B	< 0,05	2,5	2/6	
KLHL32	< 0,01	3,6	2/8		HERC2	< 0,05	2,5	2/4	
FBXL8	< 0,01	2,4	4/10		UBA7	< 0,05	2,4	4/10	
USP36	< 0,01	1,8	3/8		OTULIN	< 0,05	2,2	1/1	
SUMO4	< 0,05	5,7	1/4		UBE3C	< 0,05	2,1	4/7	
CSN2	< 0,05	4,0	1/1		PPIL2	< 0,05	2,0	5/7	
MAGEL2	< 0,05	3,6	2/7		SHPRH	< 0,05	1,9	2/10	X
MARCH6	< 0,05	2,8	2/7	X	RNF34	< 0,05	1,9	3/10	
LTN1	< 0,05	2,3	2/9		KLHL11	< 0,05	1,8	6/10	X
RNFT2	< 0,05	2,0	2/10		NEURL4	< 0,05	1,0	6/10	
RNF123	< 0,05	1,5	5/10						
RNF40	< 0,05	0,7	2/10						

permettra bien d'identifier de nouveaux régulateurs du trafic de LAMP1. *RAB8A* ainsi que *RAB3IP* et *DENND1C* se trouvent dans ces listes. Rab8 est une petite GTPase qui joue un rôle majeur dans la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique (Grigoriev *et al.*, 2011). Les protéines Rab sont régulées positivement par des facteurs d'échange de la guanine (GEF, pour *Guanine Exchange Factor* ; Stenmark, 2009). Dans le cas de Rab8, *RAB3IP*/Rabin8 a été identifiée comme GEF (Hattula *et al.*, 2002) et *DENND1C* comme GEF potentielle (Yoshimura *et al.*, 2010). De façon surprenante, les guides ciblant *RAB8A* sont enrichis dans *LAMP1High*, alors que ceux ciblant *RAB3IP* et *DENND1C* sont enrichis dans la liste *LAMP1Low*. Si l'implication de ces protéines dans la localisation de LAMP1 se confirme, il sera intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. De nombreuses protéines impliquées dans diverses voies de signalisation ont aussi été retrouvées. Il sera intéressant d'examiner plus en détails les liens qui peuvent exister entre certaines de ces voies de signalisation et les

Tableau 3. Liste non exhaustive de gènes régulateurs du trafic membranaire parmi les gènes enrichis dans +Dox LAMP1_{Low} ou +Dox LAMP1_{High}.

Gènes dont les ARN guides sont enrichis dans +Dox LAMP1 _{Low}					Gènes dont les ARN guides sont enrichis dans +Dox LAMP1 _{High}				
Gène	Valeur <i>p</i> d'enrichissement	Enrichissement	ARN guides supportant la valeur <i>p</i> d'enrichissement	Significativement déplété dans LAMP1 _{High}	Gène	Valeur <i>p</i> d'enrichissement	Enrichissement	ARN guides supportant la valeur <i>p</i> d'enrichissement	Significativement déplété dans LAMP1 _{Low}
RAB3IP	< 0,001	5,1	2/9		DNM2	< 0,0001	3,8	4/10	
SGSM1	< 0,01	3,8	2/7		AP3B1	< 0,0001	2,2	7/10	
EPN1	< 0,01	2,1	5/9		AP3D1	< 0,0001	0,7	6/10	
VPS29	< 0,01	1,4	5/7		AP3M1	< 0,001	3,5	6/8	
STX8	< 0,01	1,4	6/9		PICALM	< 0,001	2,8	6/7	
RAB10	< 0,01	1,1	5/7	X	GGA1	< 0,01	3,0	4/9	
ATP6V0E2	< 0,01	1,0	4/10		TRAPPC5	< 0,01	2,7	4/5	
SNX18	< 0,05	4,6	1/2		ATP6AP1L	< 0,01	2,4	3/5	
SFT2D2	< 0,05	4,2	2/3		RAB7A	< 0,01	2,1	5/5	
KIAA1107	< 0,05	4,0	1/4		TRAPPC8	< 0,01	2,1	2/6	
VPS52	< 0,05	3,6	2/8		VPS53	< 0,01	0,8	3/8	
DENND1C	< 0,05	3,4	2/5		SNX12	< 0,01	0,1	5/5	
RAB41	< 0,05	2,9	2/3		ATP6V1C2	< 0,05	5,7	6/8	
RAB18	< 0,05	2,9	2/2		GOSR2	< 0,05	3,7	2/9	
SNX13	< 0,05	2,8	2/3		MVB12A	< 0,05	3,5	6/10	
VPS13B	< 0,05	1,7	5/10		GOLIM4	< 0,05	3,4	5/6	X
ANKRD13D	< 0,05	1,6	3/6		ATP6V1F	< 0,05	3,3	2/4	
RABAC1	< 0,05	1,5	4/7		AVL9	< 0,05	3,0	5/6	
RAB40C	< 0,05	1,0	6/10	X	LYST	< 0,05	2,6	4/9	
AP1G1	< 0,05	0,8	2/10	X	SYNGR3	< 0,05	2,6	2/9	
SBF1	< 0,05	0,7	6/10		TRIM3	< 0,05	2,4	2/10	
AP1M2	< 0,05	0,6	3/10		CLVS2	< 0,05	2,2	6/7	
COPZ1	< 0,05	0,5	2/10		VPS51	< 0,05	2,1	4/7	X
					ATP6V1B2	< 0,05	2,0	3/9	
					AP2M1	< 0,05	2,0	4/9	
					TRAPPC11	< 0,05	1,8	2/7	
					DBNL	< 0,05	1,8	6/8	
					ANKRD13B	< 0,05	1,7	2/3	X
					RHOBTB3	< 0,05	1,7	2/9	
					RAB8A	< 0,05	1,5	4/8	
					FLCN	< 0,05	1,5	3/10	X
					SYNGR2	< 0,05	1,4	3/4	
					EHD4	< 0,05	1,3	3/10	
					TBC1D21	< 0,05	1,0	4/9	
					CCDC132	< 0,05	0,9	4/4	
					HPS1	< 0,05	0,7	4/10	
					SEC61B	< 0,05	0,6	2/6	
					STXBPSL	< 0,05	0,6	4/5	
					ALS2CL	< 0,05	0,5	2/10	

voies de trafic de LAMP1. De même, plusieurs enzymes de glycosylation ont été retrouvées parmi les gènes ciblés par les ARN guides significativement enrichis, que ce soit dans la population +Dox LAMP1_{Low} (*TUSC3*, *LARGE*, *B4GALT2* et *TMTC1*) ou +Dox LAMP1_{High} (*ST8SIA3*, *ST3GAL3*, *C1GALT1*, *FUT7*, *FUT5* et *MAN2A1*). Il a été suggéré que la nature des glycosylations portées par LAMP1 puisse influencer sa localisation (Agarwal et Kalraiya, 2014). Ces enzymes feront donc aussi l'objet d'une attention particulière lors des validations.

Matériels et méthodes

Lignée cellulaire et banque d'ARN guides

La lignée T47D doublement transduite pour exprimer stablement Cas9 de façon inductible par la doxycycline (système Tet-On) et par la banque d'ARN guides a été établie et nous a été généreusement donnée par Karine Berthelot (Centre de Recherche de Sanofi-Vitry, Vitry-sur-Seine, France). La banque d'ARN guides utilisée a été achetée auprès de

ThermoFisher Scientific. Elle comporte un nombre théorique de 174 088 ARN guides et 18 278 gènes ciblés. Après retrait des doublons, des ARN guides qui s'alignent avec plusieurs régions différentes du génome et ceux qui ne s'alignent avec aucun gène, ces nombres descendent à 167 957 ARN guides et 18 065 gènes ciblés. Chaque gène est ciblé par 1 à 10 ARN guides, avec une moyenne de 9,30 ARN guides et un écart-type de 1,86.

Culture des cellules

Les cellules T47D ont été cultivées en DMEM GlutaMAX™ (ref. 31966-021 ; ThermoFischer Scientific) supplémenté avec 10% de serum de veau fœtal certifié sans tétracycline (ref. P30-3602 ; Pan Biotech), 100 U/mL pénicilline et streptomycine (ThermoFischer Scientific), 1 nM d'œstradiol (ref. E2758 ; Sigma-Aldrich), 0,5 mg/mL de généticine (ref. 10131-019 ; ThermoFischer Scientific) qui permet le maintien de la Cas9 et de 1 µg/mL de puromycine (ref. A11138-02 ; ThermoFischer Scientific) qui permet le maintien de l'ADN viral (et donc des ARN guides). Pour l'induction de l'expression de la Cas9, 0,3 µg/mL de doxycycline (ref. 9891 ; Sigma-Aldrich) a été ajouté au milieu de culture ; la généticine et la puromycine ont été retirées. Les décongélations des cellules, passages et séparations en différentes population (+ ou - doxycycline) ont toujours été faits de façon à conserver une couverture minimum de 1000X, soit environ $200 \cdot 10^6$ cellules.

Marquage, fixation des cellules et tri cellulaire

Pour détacher les cellules, celles-ci ont été lavées une fois en Cell Dissociation Buffer (ref. 13151-014 ; ThermoFischer Scientific) puis incubées pendant 15-20 min en Cell Dissociation Buffer. Les cellules ont ensuite été transférées en PSB 1% BSA (ref. A7906 ; Sigma-Aldrich) pré-incubé à 4°C. Pour le marquage, une suspension cellulaire de $10 \cdot 10^6$ cellules/mL en PBS 1% BSA a été préparée et incubée sur glace avec 12 µg/mL d'anticorps anti-LAMP1 (produits de Sanofi ; Baudat *et al.*, 2014) et de Fixable Viability Dye eFluo450 dilué à 1/1500 (ref. 65-0863-14 ; eBioscience) pendant 1 h. Les cellules ont ensuite été lavées, fixées pendant 10 min avec 4% de paraformaldéhyde dilué dans du PBS froid. Les cellules sont ensuite lavées, reprises en PBS 1% BSA à une concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules et incubées avec 1 µg/mL d'anticorps secondaire anti-Humain couplé à la phycoérythrine (ref. 709-116-098 ; Jackson ImmunoResearch) pendant 45 min. Enfin, les cellules sont lavées et placées en PBS 1% BSA, 25 mM Hepes 2 mM EDTA à une concentration de $15 \cdot 10^6$ cellules/mL pour le tri cellulaire. Les cellules ont été triées avec un cytomètre BD FACSAria™ (BD Biosciences). Les populations

d'intérêt ont été triées de façon à exclure les cellules mortes et perméabilisées (cellules positives pour le marquage Fixable Viability Dye eFluo450).

Extraction et concentration de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait en utilisant le kit DNeasy Blood & Tissue (ref. 69504 ; Qiagen). Ce kit a été choisi après comparaison avec les kits Blood & Cell Culture Maxi 500/G et 20/G (ref. 13362 et 13323 ; Qiagen) car il présentait un meilleur rendement sur cellules fixées (données non montrées). L'ADN génomique de $10 \cdot 10^6$ cellules a été extrait par colonne, les colonnes ne présentant pas de saturation à ces quantités (données non montrées). Pour pouvoir les concentrer, les ADN génomique extraits ont été précipités par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 3 volumes d'éthanol 100%, suivi d'une incubation pendant une nuit à -20 °C. L'ADN a ensuite été culotté par centrifugation à 20 000 g pendant 20 min à 4 °C, le culot est alors lavé en éthanol 70%, séché et repris en tampon 10 mM Tris-Cl 10 mM, EDTA 0,5 mM.

Amplification des ARN guides et purification des amplicons

Les ARN guides ont été amplifiés en une seule étape de PCR. Dans 30 µL total, 1,8 µg d'ADN génomique a été mélangé avec le tampon 5X Phusion Green Buffer (ref. F534 ; ThermoFisher Scientific) à 1X final, 0,2 mM de dNTP (ref. 10610851 ; ThermoFisher Scientific), 0,5 µM d'amorce sens et 0,5 µM d'amorce antisens, 3% de DMSO et 0,02 U/µL d'enzyme Phusion (ref. F534 ; ThermoFisher Scientific). Après 3 min de dénaturation à 98 °C, les PCR se sont effectuées en 30 cycles (dénaturation : 98 °C, 10 s ; appariement : 66 °C, 30 s ; élongation : 72 °C, 20 s) suivis de 10 min d'élongation (72 °C). 12 couples d'amorces indexés différents ont été utilisés afin de permettre le multiplexage des 24 échantillons en deux mélanges :

	Séquence P5	Illumina Read1	Dégénéré	Complémentaire à l'ADN viral
Sens	AATGATACGGCGACCAACGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTNNNNNNNNNGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC			
	Séquence P7	Index	Illumina Read2	Complémentaire à l'ADN viral
Antisens 1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			
Antisens 2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATAGCGTCGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			
Antisens 3	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGAAGAAGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			
Antisens 4	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTAGGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			
Antisens 5	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTTACCACTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			
Antisens 6	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCTCTGATGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			
Antisens 7	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTACGCACGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			
Antisens 8	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGTAATAGGTACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA			

Antisens 9 CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCCTTGGTGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA
 Antisens 10 CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACAGGTATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA
 Antisens 11 CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGGTAAGGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA
 Antisens 12 CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAACAATGGGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCGACTCGGTGCCACTTTTCAA

Les produits de PCR ont été purifiés sur billes AMPure (ref. A63881 ; Beckman Coulter).

NGS et analyse statistique

Le séquençage des produits de PCR a été réalisé par la plateforme de séquençage ADN haut débit de l'Institut Curie, Paris, France. Les échantillons ont été supplémentés de 20% d'ADN de phage Phi X et ont été analysés avec un système NovaSeq 6000 (Illumina) sur deux lignes (une ligne par mélange de 12 échantillons), fournissant théoriquement 640.10^6 *reads* par échantillon. Le nettoyage de la banque théorique (retrait des doublons et des ARN guides qui ne s'alignent pas ou s'alignent à plusieurs endroits sur le génome), les indexations des *reads* sur la banque théorique et les contrôles qualités du séquençages ont été réalisés par Marc Deloger (plateforme de bio-informatique de l'Institut Curie, Paris, France). L'analyse statistique des séquençages et le calcul des valeurs *p* ont été réalisés par Pierre Gestraud (plateforme de bio-informatique de l'Institut Curie, Paris, France). Pour ce faire, les nombres de *reads* par ARN guides pour chaque échantillon +Dox ont été comparés à ceux des échantillons équivalents -Dox (+ Dox LAMP1*High* vs - Dox LAMP1*High* ; +Dox LAMP1*Low* vs - Dox LAMP1*Low* ; +Dox NonTrié vs -Dox NonTrié) grâce à l'outil logiciel Limma-Voom. Les données statistiques ainsi obtenues pour chaque ARN guide ont été agrégées par la méthode RRA (*Robust Rank Aggregation*) pour calculer des valeurs *p* générales, les valeurs *p* d'enrichissement et les valeurs *p* de déplétion par gène. Pour réaliser la liste finale des gènes d'intérêt, seuls les gènes significativement enrichis (valeurs *p* d'enrichissement < 0,05) dans les populations +Dox ont été conservés, puis ont été exclus :

- 1) les gènes significativement enrichis (valeurs *p* d'enrichissement < 0,09) dans +Dox NonTrié ;
- 2) les gènes significativement enrichis (valeur *p* d'enrichissement < 0,09) dans les deux populations triés (enrichis dans +Dox LAMP1*Low* et +Dox LAMP1*High*) ;
- 3) les gènes dont moins de 20% des ARN guides ciblant le gène supportent la valeur *p* d'enrichissement ;
- 4) les gènes qui présentent, pour un même échantillon, une valeur *p* de déplétion plus petite que sa valeur *p* d'enrichissement.

Remerciements

Nous remercions Christophe Marcireau (Centre de Recherche de Sanofi, Vitry-sur-Seine, France) pour sa participation à nos réunions, pour tous ses conseils et le partage de son expertise.

Merci à Karine Berthelot (Centre de Recherche de Sanofi, Vitry-sur-Seine, France), qui a généré les lignées T47D doublement infectées pour la Cas9 et la banque. Merci à elle d'avoir partagé ses cellules avec nous, sans quoi la réalisation de ce crible aurait été d'une toute autre dimension.

Merci aussi à Hélène Erasimus (Centre de Recherche de Sanofi, Vitry-sur-Seine, France) d'avoir partagé son expertise sur l'édition du génome, le séquençage et l'analyse.

Nous remercions aussi grandement la plateforme NGS de l'Institut Curie (Paris, France) pour la réalisation des séquençages, et plus particulièrement Sonia Lameiras (plateforme NGS, Institut Curie, Paris, France) pour le partage de son expertise.

Merci aussi à Marc Deloger (plateforme de bioinformatique, Institut Curie, Paris, France) pour l'analyse des *reads* et pour ses réponses à nos questions.

Un très grand merci à Pierre Gestraud (plateforme de bioinformatique, Institut Curie, Paris, France) la réalisation de l'analyse statistique ainsi que pour ses conseils.

DISCUSSION

Les LMP dans le système RUSH

Pour plusieurs LMP, mais surtout pour LAMP1, la nature de leur voie de transport vers les endosomes, directe ou indirecte, a fait l'objet d'intenses débats. Les premières études s'intéressant à la dynamique de LAMP1 ont observé la présence et l'endocytose de LAMP1 à la membrane cellulaire par des techniques de marquages immunofluorescents ou par l'endocytose d'anticorps anti-LAMP1 (Lippincott-Schwartz et Fambrough, 1986, 1987). Cependant, avec le recul actuel, nous savons qu'il n'est pas possible de conclure sur la voie de transport suivi par LAMP1 via la simple observation de sa présence à la surface cellulaire. En effet, les LMP peuvent accéder à la membrane plasmique par d'autres voies que la voie de sécrétion, telles que par fusion des endosomes tardifs ou des lysosomes avec la membrane plasmique. De même, une voie de trafic directe vers les endosomes précoces suivie d'un recyclage vers la membrane plasmique est aussi envisageable. Par la suite, des marquages métaboliques radioactifs des protéines néosynthétisées a permis des mesures cinétiques de l'accumulation de LAMP1 dans les endosomes relativement précises (Green *et al.*, 1987). En utilisant cette même technique de marquage, l'apparition de LAMP1 à la surface cellulaire au cours de son transport n'était observée qu'en cas de forte expression (Green *et al.*, 1987; Harter et Mellman, 1992). De cette observation est née l'hypothèse que LAMP1, selon son niveau d'expression, peut emprunter une voie de trafic directe ou indirecte. Cependant, il est aussi possible que les techniques utilisées ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter le passage de LAMP1 à la surface lorsque celui-ci n'est que faiblement exprimé. L'utilisation de techniques de synchronisation du trafic permet de répondre à ces défauts. De plus, l'étiquetage des protéines synchronisées avec une protéine fluorescente permet alors d'observer directement les voies de transport suivies par ces protéines.

Nous confirmons, avec d'autres (Chen *et al.*, 2017), que le système RUSH est applicable à l'étude des voies de trafic directe et indirecte vers les endosomes et qu'il constitue un outil puissant pour étudier la séparation de ces voies au niveau de l'appareil de Golgi. Bien sûr, le système RUSH vient avec les défauts inhérents au phénomène de synchronisation. Même avec une expression faible, voire endogène, les protéines RUSH sont transportées en vague et sont

donc transitoirement anormalement surabondantes dans les compartiments qu'elles traversent. Des phénomènes de saturation des régulateurs du trafic pourraient donc avoir lieu. Cependant, de tels phénomènes tendraient à homogénéiser les voies de trafic observées. Nous montrons que LAMP1 et LAMP2 synchronisés par l'outil RUSH sont triés au niveau de l'appareil de Golgi et que des intermédiaires de transport positifs uniquement pour l'une ou l'autre de ces LMP sont générés. Cela suggère que, dans nos conditions, les voies de trafic observées ne sont pas artéfactuelles.

La voie de trafic des LAMP et de LAP

Il a été proposé que LAMP1 puisse être capable de suivre à la fois une voie directe et indirecte vers les endosomes (Harter et Mellman, 1992). En 2013, Pols *et al.* ont observé par microscopie électronique que LAMP1 et LAMP2 pouvaient se localiser sur des compartiments positifs pour TGN46 et présents à la fois à proximité de l'appareil de Golgi et des endosomes tardifs. Ils proposent que ces compartiments, aussi positifs pour Vps41 et VAMP7, transportent LAMP1 et LAMP2 de l'appareil de Golgi jusqu'aux endosomes de façon directe.

Dans notre étude, nous montrons, comme d'autres avant nous (Chen *et al.*, 2017), que LAMP1 RUSH suit une voie de transport indirecte dans les cellules HeLa. De plus, LAMP1 RUSH muté dans son signal GYXXΦ colocalise pleinement avec LAMP1 RUSH sauvage, que ce soit au niveau des compartiments émergents de l'appareil de Golgi ou de ceux fusionnant avec la membrane plasmique. Ces données montrent que le signal GYXXΦ de LAMP1 ne joue pas de rôle au niveau de l'appareil de Golgi dans l'adressage de LAMP1 vers les endosomes ou la membrane plasmique dans nos conditions mais que ce signal est mis en jeu dans l'endocytose de LAMP1.

Il a été montré que LAMP2 et LAP passent par la membrane plasmique avant d'atteindre les endosomes (Braun, Waheed et von Figura, 1989; Nabi *et al.*, 1991; Obermüller *et al.*, 2002). En accord avec ces données, nous montrons que ces deux LMP quittent l'appareil de Golgi dans les mêmes intermédiaires de transport que LAMP1. Les données de Chen *et al.* montrent que les intermédiaires de transport contenant LAMP1 permettent aussi le transport du récepteur à la transferrine et du VSV-G vers la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2017). De plus, nous avons montré que les compartiments transportant LAMP1 vers la membrane plasmique portent sur leur membrane la petite GTPase Rab6, impliquée dans le transport des protéines depuis l'appareil de Golgi vers la surface cellulaire (Grigoriev *et al.*, 2007, 2011;

Patwardhan *et al.*, 2017; Fourriere *et al.*, 2019). De même, les résultats préliminaires de notre crible d'inactivation de gènes suggèrent que Rab8A joue un rôle dans le transport de LAMP1, bien que ces données doivent être confirmées. Ensemble, ces données suggèrent fortement que la voie empruntée par LAMP1, LAMP2 et LAP n'est pas différente de la voie de sécrétion constitutive.

À la membrane plasmique, LAMP1 est enrichie dans les puits à clathrine (Lippincott-Schwartz et Fambrough, 1987; Furuno, Ishikawa, *et al.*, 1989). En plus de la clathrine, son endocytose dépend aussi de AP2 et de la dynamine (Janvier et Bonifacino, 2005). Ici, nous montrons que l'inclusion de LAMP1 dans les puits à clathrine après la fusion des compartiments post-Golgi est quasi-immédiate. Une telle efficacité de capture de LAMP1 pourrait être la raison pour laquelle cette LMP n'est pas observable à la surface de certaines cellules. LAMP1 est capable de recruter AP2 via son signal GYXXΦ (Höning *et al.*, 1996), et cet adaptateur a été impliqué dans son endocytose (Janvier et Bonifacino, 2005; Chen *et al.*, 2017). En accord avec cela, la mutation du signal GYXXΦ dans LAMP1 RUSH empêche son incorporation dans les puits à clathrine et son endocytose.

La transformation tumorale des cellules s'accompagne d'altérations dans les processus de glycosylation, notamment en raison de la surexpression ou la perte d'enzymes golgiennes (Pinho et Reis, 2015). Or, il a été suggéré que la nature des glycosylations portées par LAMP1 puisse influencer son trafic (Agarwal et Kalraiya, 2014). Notre étude ayant été réalisée avec des cellules HeLa, il sera important d'observer si LAMP1 RUSH se comporte différemment dans d'autres lignées cellulaires, et notamment dans des cellules non transformées ou dont les mécanismes de glycosylation ont été altérés. Étant donné le rôle de LAMP1 à la surface cellulaire dans l'agressivité tumorale et de l'implication de ses glycosylations dans ces rôles (voir **4.4 Les LMP à la surface cellulaire : rôles dans les cancers**), ces questions sont essentielles.

La voie de trafic de LIMP2

Nos données montrent qu'au niveau de l'appareil de Golgi, LIMP2 RUSH est séparée de LAMP1, LAMP2 et LAP. La voie de transport de LIMP2 avait été définie comme directe du fait de l'impossibilité d'observer LIMP2 à la surface cellulaire au cours de son transport (Vega *et al.*, 1991; Obermüller *et al.*, 2002). La démonstration que LIMP2 et LAMP1 sont triés au niveau de l'appareil de Golgi renforce encore cette idée. Cela est cohérent avec les données publiées

montrant que LIMP2 ne semble pas capable de recruter AP2 (Höning, Sandoval et Von Figura, 1998; Janvier *et al.*, 2003).

L'étude du trafic du CD-MPR inséré dans le système RUSH par Chen *et al.* avait aussi montré une ségrégation de cette protéine par rapport aux cargos dirigés vers la membrane plasmique (Chen *et al.*, 2017). Ils ont montré que le CD-MPR quitte l'appareil de Golgi dans des intermédiaires de transport différents de ceux contenant LAMP1 ou le récepteur à la transferrine. Cependant, ils ont aussi montré que le CD-MPR et le récepteur à la transferrine présentent aussi une localisation différente au sein de l'appareil de Golgi (Chen *et al.*, 2017). Le cas de LIMP2 semble différent. LIMP2 colocalise pleinement avec LAMP1 au niveau de l'appareil de Golgi et la ségrégation n'est visible qu'au niveau des intermédiaires de transport. Cela suggère que la voie empruntée par LIMP2 est différente de celle des MPR. De plus, l'apparition des structures ponctiformes dans lesquelles se concentre LIMP2 est indépendante de son signal (D/E)XXXL(L/I) ou même de sa queue cytoplasmique. En accord avec cela, ces structures ne colocalisent pas avec la chaîne légère de la clathrine exprimée de façon exogène. Cela contraste avec le mode d'export des MPR de l'appareil de Golgi qui dépend de la clathrine et des GGA (Puertollano *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Doray, Bruns, *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2017).

Dans leur étude, Chen *et al.* ont montré que la ségrégation du CD-MPR au niveau de l'appareil de Golgi n'est pas médiée par son domaine cytoplasmique mais dépend de la présence du domaine luminal et du domaine transmembranaire (Chen *et al.*, 2017). De façon intéressante, nous montrons de la même manière que le déterminisme de l'insertion de LIMP2 dans ces intermédiaires de transport caractéristiques n'est pas codé dans la queue cytoplasmique de LIMP2. La possibilité que la β GC puisse jouer un rôle dans le mode d'export de LIMP2 à l'appareil de Golgi n'a pas été examinée. L'association de β GC à LIMP2 est supposée se produire au niveau du réticulum endoplasmique (Reczek *et al.*, 2007). Il n'est donc que peu probable que la formation du complexe LIMP2- β GC soit le facteur déclencheur de la concentration de LIMP2 dans ces structures ponctiformes, bien qu'il ne soit pas exclu que la β GC soit nécessaire. LIMP2 a aussi la capacité d'homodimériser et de se lier à des lipides (Conrad *et al.*, 2017), ce qui pourrait aussi jouer un rôle déterminant dans son transport. Ces interrogations représentent des points clefs à élucider dans les études futures du transport de LIMP2.

Fait intéressant, bien que la mutation du signal (D/E)XXXL(L/I) de LIMP2 ou le retrait de sa queue cytoplasmique n'empêche pas la protéine d'atteindre les endosomes, ils induisent la présence de LIMP2 à la membrane plasmique. Il est possible d'interpréter cela en imaginant qu'une proportion de la population de la protéine LIMP2 RUSH suit une voie indirecte. Cette proportion passerait alors par la membrane plasmique et, si le signal de LIMP2 est absent, y resterait bloquée, à l'image de LAMP1. Malgré l'absence d'interaction avec AP2, le signal (D/E)XXXL(L/I) de LIMP2 pourrait en effet tout de même être impliqué dans son endocytose en recrutant d'autres adaptateurs. Une autre interprétation, plus crédible, implique AP3. AP3 localise au niveau des tubules émergeant des endosomes précoces et est nécessaire pour éviter le recyclage vers la membrane plasmique de plusieurs LMP, dont LAMP1 et CD63 (Dell'Angelica *et al.*, 1999; Peden *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que la déplétion d'AP3 par ARN interférent relocalise partiellement LIMP2 à la surface cellulaire (Le Borgne *et al.*, 1998). La présence à la surface cellulaire de ces mutants de LIMP2 est donc potentiellement imputable à la perte de l'interaction avec AP3, plutôt qu'à un effet lié à l'endocytose.

Les rôles de AP1 dans le trafic de LAMP1 et LIMP2

LIMP2 est capable de s'associer à AP1 grâce à son motif (D/E)XXXL(L/I) (Höning, Sandoval et Von Figura, 1998; Fujita *et al.*, 1999). Il a été postulé que AP1 permette l'incorporation de LIMP2 dans des vésicules recouvertes de clathrine au niveau du TGN (Fujita *et al.*, 1999). Cependant, nous montrons que le signal (D/E)XXXL(L/I) de LIMP2 n'est pas impliqué dans son export de l'appareil de Golgi. De plus, les intermédiaires de transport post-golgiens de LIMP2 semblent dépourvus de clathrine. Ces résultats soulèvent la question du rôle de AP1 dans le transport de LIMP2. AP1 est aussi recruté par les MPR (Höning *et al.*, 1997; Ghosh et Kornfeld, 2003, 2004a; Stöckli, Höning et Rohrer, 2004). De la même manière, ce résultat a aussi mené à l'hypothèse que ce complexe adaptateur fonctionne dans l'incorporation des MPR dans les vésicules à clathrine au niveau du TGN (Doray, Ghosh, *et al.*, 2002). Cependant, la déplétion d'AP1 n'empêche pas l'export du CD-MPR de l'appareil de Golgi (Chen *et al.*, 2017). De plus, la déplétion de sous-unités d'AP1 de même que la délocalisation de AP1 sur les membranes mitochondriales déplacent les MPR vers les endosomes (Meyer *et al.*, 2000; Robinson, Sahlender et Foster, 2009). À la vue de ces résultats, il a donc été proposé que AP1 puisse fonctionner dans le transport rétrograde des MPR, pour le retour de ceux-ci à l'appareil de Golgi (Meyer *et al.*, 2000; Robinson, Sahlender et Foster, 2009). LIMP2 fonctionnant comme

récepteur de la β GC, l'existence d'une telle voie rétrograde impliquant AP1 et permettant le retour de LAMP2 à l'appareil de Golgi est une hypothèse attractive.

LAMP1 est, lui aussi, capable de lier AP1 via son signal GYXX Φ (Höning *et al.*, 1996). Mais la déplétion de AP1 ne modifie pas son trafic post-Golgi ni sa capacité à atteindre les endosomes tardifs et lysosomes (Meyer *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2017). Pourtant, LAMP1 a été observé, par microscopie électronique, dans des vésicules à clathrine à proximité de l'appareil de Golgi et positives pour la sous-unité γ de AP1 (Höning *et al.*, 1996). Si LAMP1 est capable de suivre une voie rétrograde dépendante de AP1, et, le cas échéant, quelle est la nécessité de cette voie pour la cellule, sont des questions intrigantes.

Crible d'inactivation génétique pour l'identification de régulateurs du transport de LAMP1

LAMP1 se voit surexposée à la surface cellulaire dans plusieurs cancers (Mane *et al.*, 1989; Saitoh *et al.*, 1992; Sarafian *et al.*, 1998). Cette exposition de LAMP1 à la surface cellulaire joue plusieurs rôles dans la survie des cellules cancéreuses et est intimement liée à l'agressivité tumorale (voir **4.4 Les LMP à la surface cellulaire : rôles dans les cancers**). Dans l'espoir d'identifier, d'une part, des régulateurs et/ou des voies de signalisation impliquées dans la surexposition de LAMP1 à la surface cellulaire, mais aussi des régulateurs plus généraux du trafic de LAMP1, nous avons réalisé un criblage génétique d'inactivation de gènes basé sur la technologie CRISPR-Cas9. La méthode utilisée, adaptée d'autres criblages (Parnas *et al.*, 2016; Potting *et al.*, 2018; Pusapati *et al.*, 2018), comprenait 1) l'inactivation de gènes par édition du génome dans une population de cellules grâce à une banque d'ARN guides, et 2) le tri des cellules éditées surexposant ou sous-exposant LAMP1 à la surface cellulaire par cytométrie en flux.

Nous avons démontré que cette méthode permet bien d'identifier des gènes impliqués dans la localisation à la surface cellulaire de LAMP1. Cependant, les résultats obtenus sont toujours en cours d'analyse et demandent une validation indépendante du crible. En conséquence, ceux-ci ne doivent être interprétés qu'avec précaution. Les listes des gènes dont les ARN guides sont significativement enrichis dans les populations triées présentent une forte abondance de protéines impliquées dans le trafic intracellulaire. Cela suggère qu'il sera possible d'identifier des régulateurs du trafic de LAMP1. De même, ces listes comptent un grand nombre de gènes impliqués dans des voies de signalisation. Il sera intéressant d'étudier

si certaines de ces voies sont en relation avec les niveaux de LAMP1 à la surface cellulaire et/ou avec l'agressivité tumorale. De façon intéressante, les résultats du crible suggèrent un lien inattendu entre le système ubiquitine/protéasome et les niveaux de LAMP1 en surface. Ce lien fera l'objet d'une étude plus approfondie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abumrad, N. A., El-Maghrabi, M. R., Amri, E.-Z., Lopez, E. et Grimaldi, P. A. (1993) « Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36 », *Journal of Biological Chemistry*, 268(24), p. 17665-17668.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H. et Kriegert, M. (1996) « Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor », *Science*, 271(5248), p. 518-520. doi: 10.1126/science.271.5248.518.
- Adli, M. (2018) « The CRISPR tool kit for genome editing and beyond », *Nature Communications*. Springer US, 9(1). doi: 10.1038/s41467-018-04252-2.
- Agarraberes, F. A. et Dice, J. F. (2001) « A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. », *Journal of cell science*, 114(Pt 13), p. 2491-9. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559757>.
- Agarraberes, F. A., Terlecky, S. R. et Dice, J. F. (1997) « An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation », *Journal of Cell Biology*, 137(4), p. 825-834. doi: 10.1083/jcb.137.4.825.
- Agarwal, A. K., Gude, R. P. et Kalraiya, R. D. (2014) « Regulation of melanoma metastasis to lungs by cell surface Lysosome Associated Membrane Protein-1 (LAMP1) via galectin-3 », *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 449(3), p. 332-337. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.028.
- Agarwal, A. K., Srinivasan, N., Godbole, R., More, S. K., Budnar, S., Gude, R. P. et Kalraiya, R. D. (2015) « Role of tumor cell surface lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP1) and its associated carbohydrates in lung metastasis », *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Springer Berlin Heidelberg, 141(9), p. 1563-1574. doi: 10.1007/s00432-015-1917-2.
- Agarwal, A. et Kalraiya, R. D. (2014) « Glycosylation regulates the expression of Lysosome Associated Membrane Protein-1 (LAMP1) on the cell surface », *Journal of Bioscience And Technology*, 1(MAY 2014), p. 556-563.
- Aizawa, S., Contu, V. R., Fujiwara, Y., Hase, K., Kikuchi, H., Kabuta, C., Wada, K. et Kabuta, T. (2017) « Lysosomal membrane protein SIDT2 mediates the direct uptake of DNA by lysosomes », *Autophagy*. Taylor & Francis, 13(1), p. 218-222. doi: 10.1080/15548627.2016.1248019.
- Aizawa, S., Fujiwara, Y., Contu, V. R., Hase, K., Takahashi, M., Kikuchi, H., Kabuta, C., Wada, K. et Kabuta, T. (2016) « Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes », *Autophagy*. Taylor & Francis, 12(3), p. 565-578. doi: 10.1080/15548627.2016.1145325.
- Akamine, A., Tsukuba, T., Kimura, R., Maeda, K., Tanaka, Y., Kato, K. et Yamamoto, K. (1993) « Increased synthesis and specific localization of a major lysosomal membrane sialoglycoprotein (LGP107) at the ruffled border membrane of active osteoclasts », *Histochemistry*, 100(2), p. 101-108. doi: 10.1007/BF00572895.
- Akasaki, K., Kinoshita, H., Fukuzawa, M., Maeda, M., Yamaguchi, Y., Furuno, K. et Tsuji, H. (1992) « Isolation and Characterization of a Novel Membrane Glycoprotein of 85000 Molecular Weight from Rat Liver Lysosomes », *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(1), p. 170-173.
- Akasaki, K., Michihara, A., Mibuka, K., Fujiwara, Y. et Tsuji, H. (1995) « Biosynthetic transport of a major lysosomal membrane glycoprotein, lamp- 1: Convergence of biosynthetic and endocytic pathways occurs at three distinctive points », *Experimental Cell Research*, p. 464-473. doi: 10.1006/excr.1995.1338.
- Akasaki, K., Shiotsu, K., Michihara, A., Ide, N. et Wada, I. (2014) « Constitutive expression of a COOH-terminal leucine mutant of lysosome-associated membrane protein-1 causes its exclusive localization in low density intracellular vesicles », *The Journal of Biochemistry*, 156(1), p. 39-49. doi: 10.1093/jb/mvu020.
- Akasaki, K., Suenobu, M., Mukaida, M., Michihara, A. et Wada, I. (2010) « COOH-terminal isoleucine of lysosome-associated membrane protein-1 is optimal for its efficient targeting to dense secondary lysosomes », *Journal of Biochemistry*, 148(6), p. 669-679. doi: 10.1093/jb/mvq101.

- Allan, B. B., Moyer, B. D. et Balch, W. E. (2000) « Rab1 Recruitment of p115 into a cis-SNARE Complex : Programming Budding COPII Vesicles for Fusion », *Science*, 289(July), p. 444-449.
- Almeida-Souza, L., Frank, R. A. W., García-Nafría, J., Colussi, A., Gunawardana, N., Johnson, C. M., Yu, M., Howard, G., Andrews, B., Vallis, Y. et McMahon, H. T. (2018) « A Flat BAR Protein Promotes Actin Polymerization at the Base of Clathrin-Coated Pits », *Cell*, 174(2), p. 325-337.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.020.
- Alter, G., Malenfant, J. M. et Altfeld, M. (2004) « CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity », *Journal of Immunological Methods*, 294(1-2), p. 15-22. doi: 10.1016/j.jim.2004.08.008.
- Andrejewski, N., Punnonen, E., Guhde, G., Tanaka, Y., Hartmann, D., Von, K., Saftig, P. et Figura, K. Von (1999) « Normal Lysosomal Morphology and Function in LAMP-1-deficient Mice Normal Lysosomal Morphology and Function in LAMP-1-deficient Mice * », *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18), p. 12692-12701.
- Andrews, N. W., Almeida, P. E. et Corrotte, M. (2014) « Damage control: Cellular mechanisms of plasma membrane repair », *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 24(12), p. 734-742. doi: 10.1016/j.tcb.2014.07.008.
- Ang, A. L., Fölsch, H., Koivisto, U. M., Pypaert, M. et Mellman, I. (2003) « The Rab8 GTPase selectively regulates AP-1B-dependent basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells », *Journal of Cell Biology*, 163(2), p. 339-350. doi: 10.1083/jcb.200307046.
- Antonescu, C. N., Aguet, F., Danuser, G. et Schmid, S. L. (2011) « Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size », *Molecular Biology of the Cell*, 22(14), p. 2588-2600. doi: 10.1091/mbc.e11-04-0362.
- Arighi, C. N., Harmell, L. M., Aguilar, R. C., Haft, C. R. et Bonifacino, J. S. (2004) « Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor », *Journal of Cell Biology*, 165(1), p. 123-133. doi: 10.1083/jcb.200312055.
- Arvan, P. et Castle, D. (1998) « Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward », *Biochemical Journal*, 332(3), p. 593-610. doi: 10.1042/bj3320593.
- Atkinson, B., Ernst, C. S., Christ, B. F. D., Herlyn, M., Blaszczyk, M., Ross, A. H., Steplewski, Z. et Koprowski, H. (1984) « Identification of Melanoma-associated Antigens Using Fixed Tissue Screening of Antibodies 1 », *Cancer Research*, (JUNE), p. 2577-2581.
- Atkinson, B., Ernst, C. S., Christ, B. F. D., Ross, A. H., Clark, W. H., Herlyn, M., Herlyn, D., Maul, G., Steplewski, Z. et Koprowski, H. (1985) « Monoclonal Antibody to a Highly Glycosylated Protein Reacts in Fixed Tissue With Melanoma and Other Tumors », *Hybridoma*, 4(3).
- Bananas, E. (2003) « Regulation of early endocytic vesicle motility and fission in a reconstituted system », *Journal of Cell Science*, 116(13), p. 2749-2761. doi: 10.1242/jcs.00478.
- Bannykh, S. I., Rowe, T. et Balch, W. E. (1996) « The Organization of Endoplasmic Reticulum Export Complexes », *The Journal of Cell Biology*, 135(1), p. 19-35.
- Barbero, P., Bittova, L. et Pfeffer, S. R. (2002) « Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells », *Journal of Cell Biology*, 156(3), p. 511-518. doi: 10.1083/jcb.200109030.
- Barlowe, C. et Schekman, R. (1993) « SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER », *Nature*, 365(September), p. 347-349.
- Barr, F. A. et Short, B. (2003) « Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus », *Current Opinion in Cell Biology*, 15(4), p. 405-413. doi: 10.1016/S0955-0674(03)00054-1.
- Barrette-Ng, I. H., Wu, S. C., Tjia, W. M., Wong, S. L. et Ng, K. K. S. (2013) « The structure of the SBP-Tag-streptavidin complex reveals a novel helical scaffold bridging binding pockets on separate subunits », *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 69(5), p. 879-887. doi: 10.1107/S0907444913002576.
- Barrowman, J., Bhandari, D., Reinisch, K. et Ferro-Novick, S. (2010) « TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab », *Nature Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(11), p. 759-763. doi: 10.1038/nrm2999.
- Baudat, Y., Blanche, F., Cameron, B., Dabdoubi, T., Lefebvre, A.-M., Mathieu, M., Merino-Trigo, A. et Nunes, M. (2014) « ANTI-LAMP1 ANTIBODIES AND ANTIBODY DRUG CONJUGATES, AND USES THEREOF ».

- Beekman, J. M. et Coffey, P. J. (2008) « The ins and outs of syntenin, a multifunctional intracellular adaptor protein », *Journal of Cell Science*, 121(9), p. 1349-1355. doi: 10.1242/jcs.026401.
- Behnia, R. et Munro, S. (2005) « Organelle identity and the signposts for membrane traffic », *Nature*, 438. doi: 10.1038/nature04397.
- Bennett, E. J., Bence, N. F., Jayakumar, R. et Kopito, R. R. (2005) « Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation », *Molecular Cell*, 17(3), p. 351-365. doi: 10.1016/j.molcel.2004.12.021.
- Bergmann, J. E. (2004) « Immunoelectron microscopic studies of the intracellular transport of the membrane glycoprotein (G) of vesicular stomatitis virus in infected Chinese hamster ovary cells », *The Journal of Cell Biology*, 97(6), p. 1777-1787. doi: 10.1083/jcb.97.6.1777.
- Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M. et Koup, R. A. (2003) « Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. », *Journal of immunological methods*, 281(1-2), p. 65-78. doi: 10.1016/S0022-1759(03)00265-5.
- Bezoussenko, G. V., Parashuraman, S., Rizzo, R., Polishchuk, R., Martella, O., Giandomenico, D. Di, Fusella, A., Spaar, A., Sallese, M., Capestrano, M. G., Pavelka, M., Vos, M. R., Rikers, Y. G. M., Helms, V., Mironov, A. A. et Luini, A. (2014) « Transport of soluble proteins through the Golgi occurs by diffusion via continuities across cisternae », *eLife*, 2014(3), p. 1-27. doi: 10.7554/eLife.02009.
- Bissig, C. et Gruenberg, J. (2014) « ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland », *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 24(1), p. 19-25. doi: 10.1016/j.tcb.2013.10.009.
- Bissig, C., Hurbain, I., Raposo, G. et van Niel, G. (2017) « PIKfyve activity regulates reformation of terminal storage lysosomes from endolysosomes », *Traffic*, 18(11), p. 747-757. doi: 10.1111/tra.12525.
- Blagoveshchenskaya, A. D., Hewitt, E. W. et Cutler, D. F. (1999) « Di-Leucine Signals Mediate Targeting of Tyrosinase and Synaptotagmin to Synaptic-like Microvesicles within PC12 Cells », *Molecular Biology of the Cell*, 10(November), p. 3979-3990.
- Blanz, J., Zunke, F., Markmann, S., Damme, M., Bräulke, T., Saftig, P. et Schwake, M. (2015) « Mannose 6-phosphate-independent Lysosomal Sorting of LIMP-2 », *Traffic*, 16(10), p. 1127-1136. doi: 10.1111/tra.12313.
- Boehm, M., Aguilar, R. et Bonifacio, J. S. (2001) « Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs) », *EMBO Journal*, 20(22), p. 6265-6276. doi: 10.1093/emboj/20.22.6265.
- Bonazzi, M., Spanò, S., Turacchio, G., Cericola, C., Valente, C., Colanzi, A., Kweon, H. S., Hsu, V. W., Polishchuk, E. V., Polishchuk, R. S., Sallese, M., Pulvirenti, T., Corda, D. et Luini, A. (2005) « CtBP3/BARS drives membrane fission in dynamin-independent transport pathways », *Nature Cell Biology*, 7(6), p. 570-580. doi: 10.1038/ncb1260.
- Boncompain, G., Divoux, S., Gareil, N., De Forges, H., Lescure, A., Latreche, L., Mercanti, V., Jollivet, F., Raposo, G. et Perez, F. (2012) « Synchronization of secretory protein traffic in populations of cells », *Nature Methods*, 9(5), p. 493-498. doi: 10.1038/nmeth.1928.
- Boncompain, G. et Perez, F. (2013a) « Fluorescence-Based Analysis of Trafficking in Mammalian Cells », in *Methods in Cell Biology*, p. 179-194. doi: 10.1016/B978-0-12-417164-0.00011-2.
- Boncompain, G. et Perez, F. (2013b) « The many routes of Golgi-dependent trafficking. », *Histochemistry and cell biology*, 140(3), p. 251-60. doi: 10.1007/s00418-013-1124-7.
- Boncompain, G. et Weigel, A. V. (2018) « Transport and sorting in the Golgi complex: multiple mechanisms sort diverse cargo », *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 50, p. 94-101. doi: 10.1016/j.ccb.2018.03.002.
- Bonfanti, L., Mironov, A. A., Martínez-Menárguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A. et Luini, A. (1998) « Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: Evidence for cisternal maturation », *Cell*, 95(7), p. 993-1003. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81723-7.
- Bonifacio, J. S. et Traub, L. M. (2003) « Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and

- Lysosomes », *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), p. 395-447. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161800.
- Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U. et Hoflack, B. (1998) « The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins », *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), p. 29451-29461. doi: 10.1074/jbc.273.45.29451.
- Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J. C., Ubelmann, F. et Kirchhausen, T. (2011) « Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis », *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(9), p. 1124-1132. doi: 10.1038/ncb2307.
- Braakman, I. et Hebert, D. N. (2013) « Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Braell, W. A., Schlossman, D. M., Schmid, S. L. et Rothman, J. E. (1984) « Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: Role of an uncoating ATPase », *Journal of Cell Biology*, 99(2), p. 735-741.
- Braulke, T. et Bonifacino, J. S. (2009) « Sorting of lysosomal proteins », *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1793(4), p. 605-614. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.
- Braulke, T., Gartung, C., Hasilik, A. et von Figura, K. (1987) « Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes? », *Journal of Cell Biology*, 104(6), p. 1735-1742. doi: 10.1083/jcb.104.6.1735.
- Braulkesii, T. (1993) « Phosphorylation of the Cytoplasmic Tail of the 300-kDa Mannose 6-Phosphate Receptor Is Required for the Interaction with a Cytosolic Protein », *The Journal of Biochemistry*, p. 21470-21473.
- Braun, A., Pinyol, R., Dahlhaus, R., Koch, D., Fonarev, P., Grant, B. D., Kessels, M. M. et Qualmann, B. (2005) « EHD Proteins Associate with Syndapin I and II and Such Interactions Play a Crucial Role in Endosomal Recycling », *Molecular Biology of the Cell*, 16, p. 3642-3658.
- Braun, M., Waheed, A. et von Figura, K. (1989) « Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. », *The EMBO Journal*, 8(12), p. 3633-3640. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08537.x.
- Breuer, P., Korner, C., Boker, C., Herzog, A., Pohlmann, R. et Braulke, T. (1997) « Serine phosphorylation site of the 46-kDa mannose 6-phosphate receptor is required for transport to the plasma membrane in Madin-Darby canine kidney and mouse fibroblast cells. », *Molecular Biology of the Cell*, 8(4), p. 567-576. doi: 10.1091/mbc.8.4.567.
- Bright, N. A., Davis, L. J. et Luzio, J. P. (2016) « Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity », *Current Biology*. The Author(s), 26(17), p. 2233-2245. doi: 10.1016/j.cub.2016.06.046.
- Bright, N. A., Gratian, M. J. et Luzio, J. P. (2005) « Endocytic Delivery to Lysosomes Mediated by Concurrent Fusion and Kissing Events in Living Cells », *Current Biology*, 15, p. 360-365. doi: 10.1016/j.
- Brown, D. A. et Rose, J. K. (1992) « Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface », *Cell*, 68(3), p. 533-544. doi: 10.1016/0092-8674(92)90189-J.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H.-G. et Long, E. O. (2005) « Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells », *The Journal of Experimental Medicine*, 202(7), p. 1001-1012. doi: 10.1084/jem.20051143.
- Bugarcic, A., Zhe, Y., Kerr, M. C., Griffin, J., Collins, B. M. et Teasdale, R. D. (2011) « Vps26A and Vps26B Subunits Define Distinct Retromer Complexes », *Traffic*, 12(12), p. 1759-1773. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01284.x.
- Burgos, P. V., Mardones, G. A., Rojas, A. L., daSilva, L. L. P., Prabhu, Y., Hurley, J. H. et Bonifacino, J. S. (2010) « Sorting of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein Mediated by the AP-4 Complex », *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 18(3), p. 425-436. doi: 10.1016/j.devcel.2010.01.015.
- Buschow, S. I., Nolte-t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M. et Stoorvogel, W. (2009) « MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways », *Traffic*, 10(10), p. 1528-1542. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x.

- Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J. C. et Ferro-Novick, S. (2007) « TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat », *Nature*, 445(February), p. 941-944. doi: 10.1038/nature05527.
- Calvo, P. A., Frank, D. W., Bieler, B. M., Berson, J. F. et Marks, M. S. (1999) « A Cytoplasmic Sequence in Human Tyrosinase Defines a Second Class of Di-leucine-based Sorting Signals for Late Endosomal and Lysosomal Delivery * », *The Journal of Biological Chemistry*, 274(18), p. 12780-12789.
- Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K. et Morales, C. R. (2008) « Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(2), p. 292-297. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.021.
- Carlsson, S. R. et Fukuda, M. (1989) « Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1 », *Journal of Biological Chemistry*, 264(34), p. 20526-20531. doi: 2584229.
- Carlsson, S. R. et Fukuda, M. (1990) « The Polylactosaminoglycans of Human Glycoproteins Lysosomal Membrane », *Biochemistry*, 265(33), p. 20488-20495.
- Carlsson, S. R., Lycksell, P.-O. et Fukuda, M. (1993) « Assignment of O-Glycan Attachment sites to the Hinge-like Regions of Human Lysosomal Membrane Glycoproteins Lamp-1 and Lamp-2 », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 304(1), p. 65-73.
- Carlsson, S. R., Roth, J., Piller, F. et Fukuda, M. (1988) « Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylactosaminoglycan », *Journal of Biological Chemistry*, 263(35), p. 18911-18919.
- Carlton, J., Bujny, M., Peter, B. J., Oorschot, V. M. J., Rutherford, A., Mellor, H., Klumperman, J., McMahon, H. T. et Cullen, P. J. (2004) « Sorting Nexin-1 Mediates Tubular Endosome-to-TGN Transport through Coincidence Sensing of High- Curvature Membranes and 3-Phosphoinositides », *Current Biology*, 14, p. 1791-1800. doi: 10.1016/j.
- Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P., Suzanne, R. et Pfeffert, S. R. (2001) « Facilitating Receptor Recruitment by TIP47 », *Science*, 292(5520), p. 1373-1376. Disponible sur: <http://www.sciencemag.org/content/292/5520/1373.long>.
- Castro-Gomes, T., Corrotte, M., Tam, C. et Andrews, N. W. (2016) « Plasma membrane repair is regulated extracellularly by proteases released from lysosomes », *PLoS ONE*, 11(3), p. 1-26. doi: 10.1371/journal.pone.0152583.
- Catarino, S., Pereira, P. et Girao, H. (2017) « Molecular control of chaperone-mediated autophagy », *Essays in biochemistry*, p. 663-674.
- Cauvin, C., Rosendale, M., Gupta-Rossi, N., Rocancourt, M., Larraufie, P., Salomon, R., Perrais, D. et Echard, A. (2016) « Rab35 GTPase Triggers Switch-like Recruitment of the Lowe Syndrome Lipid Phosphatase OCRL on Newborn Endosomes », *Current Biology*, 26(1), p. 120-128. doi: 10.1016/j.cub.2015.11.040.
- Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F., Settegrana, C., Drechou, A., Durand, G. et Pous, C. (2001) « The Golgi Complex Is a Microtubule-organizing Organelle », *Molecular Biology of the Cell*, 12(7), p. 2047-2060. doi: 10.1091/mbc.12.7.2047.
- Chaineau, M., Ioannou, M. S. et Mcpherson, P. S. (2013) « Rab35: GEFs, GAPs and Effectors », *Traffic*, 14(11), p. 1109-1117. doi: 10.1111/tra.12096.
- Charrin, S., Manié, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C. et Rubinstein, E. (2002) « Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: Role of palmitoylation », *FEBS Letters*, 516(1-3), p. 139-144. doi: 10.1016/S0014-5793(02)02522-X.
- Chen, D., Gibson, E. S. et Kennedy, M. J. (2013) « A light-triggered protein secretion system », *Journal of Cell Biology*, 201(4), p. 631-640. doi: 10.1083/jcb.201210119.
- Chen, H. J., Remmlers, J., Delaney, J. C., Messner, D. J. et Lobel, P. (1993) « Mutational Analysis of the Cation-independent Mannose 6-Phosphate / Insulin-like Growth Factor I1 Receptor », *The Journal of Biological Chemistry*, 268(30), p. 22338-22346.
- Chen, H. J., Yuan, J. et Lobel, P. (1997) « Systematic mutational analysis of the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor cytoplasmic domain. An acidic cluster containing a key aspartate is important for function in lysosomal enzyme sorting », *Journal of Biological Chemistry*, 272(11),

- p. 7003-7012. doi: 10.1074/jbc.272.11.7003.
- Chen, J. W., Pan, W., D'souza, M. P. et August, J. T. (1985) « Lysosome-associated membrane proteins: Characterization of LAMP-1 of macrophage P388 and mouse embryo 3T3 cultured cells », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 239(2), p. 574-586. doi: 10.1016/0003-9861(85)90727-1.
- Chen, Y., Gershlick, D. C., Park, S. Y. et Bonifacio, J. S. (2017) « Segregation in the Golgi complex precedes export of endolysosomal proteins in distinct transport carriers », *Journal of Cell Biology*, 216(12), p. 4141-4151. doi: 10.1083/jcb.201707172.
- Cheng, J., Grassart, A. et Drubin, D. G. (2012) « Myosin 1E coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis », *Molecular Biology of the Cell*, 23(15), p. 2891-2904. doi: 10.1091/mbc.e11-04-0383.
- Cheng, X. T., Xie, Y. X., Zhou, B., Huang, N., Farfel-Becker, T. et Sheng, Z. H. (2018) « Characterization of LAMP1-labeled nondegradative lysosomal and endocytic compartments in neurons », *Journal of Cell Biology*, 217(9), p. 3127-3139. doi: 10.1083/jcb.201711083.
- Cherfils, J. et Zeghouf, M. (2013) « Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs », *Physiol Rev*, p. 269-309. doi: 10.1152/physrev.00003.2012.
- Chhangani, D., Upadhyay, A., Amanullah, A., Joshi, V. et Mishra, A. (2014) « Ubiquitin ligase ITCH recruitment suppresses the aggregation and cellular toxicity of cytoplasmic misfolded proteins », *Scientific Reports*, 4, p. 1-12. doi: 10.1038/srep05077.
- Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C. et Stenmark, H. (2017) « Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery », *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 42(1), p. 42-56. doi: 10.1016/j.tibs.2016.08.016.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. et Zerial, M. (1999) « The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking », *Nature*, 397(6720), p. 621-625. doi: 10.1038/17618.
- Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S.-C., Waterfield, M. D., Backer, J. M. et Zerial, M. (1999) « Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors », *Nature Cell Biology*, 1(4), p. 249-252. doi: 10.1038/12075.
- Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L. W., Hatada, M., Amara, J. F., Rollins, C. T., Stevenson, L. F., Magari, S. R., Wood, S. A., Courage, N. L., Lu, X., Cerasoli, F., Gilman, M. et Holt, D. A. (1998) « Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), p. 10437-10442. doi: 10.1073/pnas.95.18.10437.
- Clapham, D. E. (2007) « Calcium Signaling », *Cell*, p. 1047-1058. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.028.
- Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S. et Kirchhausen, T. (2012) « The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. », *Cell*, 150(3), p. 495-507. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.047.
- Cohnen, A., Chiang, S. C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janßen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y. T. et Watzl, C. (2013) « Surface CD107a / LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage », *Immunobiology*, 122(8), p. 1411-1418. doi: 10.1182/blood-2012-07-441832.
- Collawn, J. F., Stangel, M., Kuhn, L. A., Esekogwu, V., Jing, S., Trowbridge, I. S. et Tainer, J. A. (1990) « Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis », *Cell*, 63(5), p. 1061-1072. doi: 10.1016/0092-8674(90)90509-D.
- Collins, B. M., Watson, P. J. et Owen, D. J. (2003) « The structure of the GGA1-GAT domain reveals the molecular basis for ARF binding and membrane association of GGAs », *Developmental Cell*, 4(3), p. 321-332. doi: 10.1016/S1534-5807(03)00037-6.
- Conrad, K. S., Cheng, T. W., Ysselstein, D., Heybrock, S., Hoth, L. R., Chrnyk, B. A., Am Ende, C. W., Krainc, D., Schwake, M., Saftig, P., Liu, S., Qiu, X. et Ehlers, M. D. (2017) « Lysosomal integral membrane protein-2 as a phospholipid receptor revealed by biophysical and cellular studies », *Nature Communications*. Springer US, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-02044-8.
- Cook, N. R., Row, P. E. et Davidson, H. W. (2004) « Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes », *Traffic*, 5(9), p. 685-699. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00212.x.

- Coombs, G. S., Yu, J., Canning, C. A., Veltri, C. A., Covey, T. M., Cheong, J. K., Utomo, V., Banerjee, N., Zhang, Z. H., Jadulco, R. C., Concepcion, G. P., Bugni, T. S., Harper, M. K., Mihalek, I., Jones, C. M., Ireland, C. M. et Virshup, D. M. (2010) « WLS-dependent secretion of WNT3A requires Ser209 acylation and vacuolar acidification », *Journal of Cell Science*, 123(19), p. 3357-3367. doi: 10.1242/jcs.072132.
- Cuervo, A. et Dice, J. (2000a) « Regulation of Lamp2a levels in the lysosomal membrane », *Traffic*, 1(7), p. 570-583. doi: 10.1034/j.1600-0854.2000.010707.x.
- Cuervo, A. et Dice, J. (2000b) « Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. », *Journal of cell science*, 113 Pt 24, p. 4441-50. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082038>.
- Cuervo, A. M. et Dice, J. F. (1996) « A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes », *Science*, 273(July), p. 501.
- Cuervo, A. M., Dice, J. F. et Knecht, E. (1997) « A lysosomal population responsible for the hsc73-mediated degradation of cytosolic proteins in lysosomes », *J Biol Chem*, 272(9), p. 5606-5615. doi: 10.1074/jbc.272.9.5606.
- Cuervo, A. M., Mann, L., Bonten, E. J., D'Azzo, A. et Dice, J. F. (2003) « Cathepsin a regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor », *EMBO Journal*, 22(1), p. 47-59. doi: 10.1093/emboj/cdg002.
- Cui, Y., Carosi, J. M., Yang, Z., Ariotti, N., Kerr, M. C., Parton, R. G., Sargeant, T. J. et Teasdale, R. D. (2019) « Retromer has a selective function in cargo sorting via endosome transport carriers », *Journal of Cell Biology*, 218(2), p. 615-631.
- Cui, Y., Yang, Z. et Teasdale, R. D. (2019) « A role of GCC88 in the retrograde transport of CI-M6PR and the maintenance of lysosomal activity », *Cell Biology International*, (February 2019), p. 1-25. doi: 10.1002/cbin.11118.
- Cullen, P. J. et Steinberg, F. (2018) « To degrade or not to degrade: mechanisms and significance of endocytic recycling », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US, 19(november). doi: 10.1038/s41580-018-0053-7.
- Dai, J., Li, J., Bos, E., Porcionatto, M., Premont, R. T., Bourgoïn, S., Peters, P. J. et Hsu, V. W. (2004) « ACAP1 promotes endocytic recycling by recognizing recycling sorting signals », *Developmental Cell*, 7(5), p. 771-776. doi: 10.1016/j.devcel.2004.10.002.
- Damaghi, M., Tafreshi, N. K., Lloyd, M. C., Sprung, R., Estrella, V., Wojtkowiak, J. W., Morse, D. L., Koomen, J. M., Bui, M. M., Gatenby, R. A. et Gillies, R. J. (2015) « Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane », *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6, p. 1-13. doi: 10.1038/ncomms9752.
- Dambournet, D., MacHicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Formstecher, E., Salomon, R., Goud, B. et Echard, A. (2011) « Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis », *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(8), p. 981-988. doi: 10.1038/ncb2279.
- Dange, M. C., Agarwal, A. K. et Kalraiya, R. D. (2015) « Extracellular galectin-3 induces MMP9 expression by activating p38 MAPK pathway via lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP1) », *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer US, 404(1-2), p. 79-86. doi: 10.1007/s11010-015-2367-5.
- Dange, M. C., Srinivasan, N., More, S. K., Bane, S. M., Upadhyay, A., Ingle, A. D., Gude, R. P., Mukhopadhyaya, R. et Kalraiya, R. D. (2014) « Galectin-3 expressed on different lung compartments promotes organ specific metastasis by facilitating arrest, extravasation and organ colonization via high affinity ligands on melanoma cells », *Clinical and Experimental Metastasis*, 31(6), p. 661-673. doi: 10.1007/s10585-014-9657-2.
- Danglot, L., Zylbersztejn, K., Petkovic, M., Gauberti, M., Meziane, H., Combe, R., Champy, M.-F., Birling, M.-C., Pavlovic, G., Bizot, J.-C., Trovero, F., Della Ragione, F., Proux-Gillardeaux, V., Sorg, T., Vivien, D., D'Esposito, M. et Galli, T. (2012) « Absence of TI-VAMP/Vamp7 Leads to Increased Anxiety in Mice », *Journal of Neuroscience*, 32(6), p. 1962-1968. doi: 10.1523/jneurosci.4436-11.2012.
- Das, S., Yu, S., Sakamori, R., Stypulkowski, E. et Gao, N. (2008) « Wntless in Wnt secretion: molecular, cellular and

- genetic aspects », *Bone*, 23(1), p. 1-7. doi: 10.1038/jid.2014.371.
- Davidson, S. M. et Heiden, M. G. Vander (2017) « Critical Functions of the Lysosome in Cancer Biology », *Annual review of pharmacology and toxicology*, p. 481-510. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103101.
- Defays, A., David, A., De Gassart, A., Rigotti, F. D. A., Wenger, T., Camossetto, V., Brousset, P., Petrella, T., Dalod, M., Gatti, E. et Pierre, P. (2011) « BAD-LAMP is a novel biomarker of nonactivated human plasmacytoid dendritic cells », *Blood*, 118(3), p. 609-617. doi: 10.1182/blood-2010-11-319699.
- Delacour, D., Cramm-Behrens, C. I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H. Y. et Jacob, R. (2006) « Requirement for galectin-3 in apical protein sorting », *Current Biology*, 16(4), p. 408-414. doi: 10.1016/j.cub.2005.12.046.
- Delevoye, C., Marks, M. S. et Raposo, G. (2019) « Lysosome-related organelles as functional adaptations of the endolysosomal system », *Current Opinion in Cell Biology*, 59, p. 147-158. doi: 10.1016/j.ceb.2019.05.003.
- Delevoye, C., Miserey-Lenkei, S., Montagnac, G., Gilles-Marsens, F., Paul-Gilloteaux, P., Giordano, F., Waharte, F., Marks, M. S., Goud, B. et Raposo, G. (2014) « Recycling endosome tubule morphogenesis from sorting endosomes requires the kinesin motor KIF13A », *Cell Reports*, 6(3), p. 445-454. doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.002.
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C. et Bonifacino, J. S. (1999) « AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors », *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), p. 7278-7285. doi: 10.1074/jbc.274.11.7278.
- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M. et Bonifacino, J. S. (2000) « GGAs: A family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex », *Journal of Cell Biology*, 149(1), p. 81-93. doi: 10.1083/jcb.149.1.81.
- Dell'Angelica, E. C., Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A. et Bonifacino, J. S. (1999) « Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the β 3A subunit of the AP-3 adaptor », *Molecular Cell*, 3(1), p. 11-21. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80170-7.
- Demirel, O., Jan, I., Wolters, D., Blanz, J., Saftig, P., Tampe, R. et Abele, R. (2012) « The lysosomal polypeptide transporter TAPL is stabilized by interaction with LAMP-1 and LAMP-2 », *Journal of Cell Science*, 125(18), p. 4230-4240. doi: 10.1242/jcs.087346.
- Deng, Y., Pakdel, M., Blank, B., Sundberg, E. L., Burd, C. G., Blume, J. Von, Deng, Y., Pakdel, M., Blank, B., Sundberg, E. L. et Burd, C. G. (2018) « Activity of the SPCA1 Calcium Pump Couples Sphingomyelin Synthesis to Sorting of Secretory Proteins in the Trans -Golgi Network Article Activity of the SPCA1 Calcium Pump Couples Sphingomyelin Synthesis to Sorting of Secretory Proteins in the Trans -Golgi », *Developmental Cell*. Elsevier Inc., p. 1-15. doi: 10.1016/j.devcel.2018.10.012.
- Dennis, J. W., Laferte, S., Waghorne, C., Breitman, M. L. et Kerbel, R. S. (1987) « β 1-6 Branching of Asn-Linked Oligosaccharides Is Directly Associated with Metastasis », *Science*, 205(1981), p. 2-6.
- Denzer, K., Weber, B., Hille-Rehfeld, A., von Figura, K. et Pohlmann, R. (1997) « Identification of three internalization sequences in the cytoplasmic tail of the 46 kDa mannose 6-phosphate receptor », *Biochemical Journal*, 326(2), p. 497-505. doi: 10.1042/bj3260497.
- Derby, M. C., Lieu, Z. Z., Brown, D., Stow, J. L., Goud, B. et Gleeson, P. A. (2007) « The trans -Golgi Network Golgin , GCC185 , is Required for Endosome-to-Golgi Transport and Maintenance of Golgi Structure », *Traffic*, p. 758-773. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00563.x.
- Derivery, E., Helfer, E., Henriot, V. et Gautreau, A. (2012) « Actin polymerization controls the organization of WASH domains at the surface of endosomes », *PLoS ONE*, 7(6). doi: 10.1371/journal.pone.0039774.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J. J., Lombard, B., Loew, D. et Gautreau, A. (2009) « The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex », *Developmental Cell*, 17(5), p. 712-723. doi: 10.1016/j.devcel.2009.09.010.
- Díaz, E. et Pfeffer, S. R. (1998) « Tip47: A cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking », *Cell*, 93(3), p. 433-443. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81171-X.
- Dice, F. (1990) « Peptidic sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis », *Trends in Biochemical Sciences*, p. 305-309.
- Dmitrieff, S. et Nédélec, F. (2015) « Membrane Mechanics of Endocytosis in Cells with Turgor », *PLoS*

- Computational Biology*, 11(10), p. 1-15. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004538.
- Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P. et Kornfeld, S. (2002) « Interaction of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor with GGA proteins », *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), p. 18477-18482. doi: 10.1074/jbc.M201879200.
- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J. et Kornfeld, S. (2002) « Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network », *Science*, 297(5587), p. 1700-1703. doi: 10.1126/science.1075327.
- Dores, M. R., Chen, B., Lin, H., Soh, U. J. K., Paing, M. M., Montagne, W. A., Meerloo, T. et Trejo, J. A. (2012) « ALIX binds a YPX 3L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting », *Journal of Cell Biology*, 197(3), p. 407-419. doi: 10.1083/jcb.201110031.
- Dores, M. R., Grimsey, N. J., Mendez, F. et Trejo, J. A. (2016) « ALIX regulates the ubiquitin-independent lysosomal sorting of the P2Y1 purinergic receptor via a YPX3 L motif », *PLoS ONE*, 11(6), p. 1-20. doi: 10.1371/journal.pone.0157587.
- Du, W., Su, Q. P., Chen, Y., Zhu, Y., Jiang, D., Rong, Y., Zhang, S., Zhang, Y., Ren, H., Zhang, C., Wang, X., Gao, N., Wang, Y., Sun, L., Sun, Y. et Yu, L. (2016) « Kinesin 1 Drives Autolysosome Tubulation », *Developmental Cell*, 37(4), p. 326-336. doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.014.
- Duffield, A., Kamsteeg, E.-J., Brown, A. N., Pagel, P. et Caplan, M. J. (2003) « The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase -subunit », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), p. 15560-15565. doi: 10.1073/pnas.2536699100.
- Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C. et Benaroch, P. (2005) « AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes », *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), p. 19656-19664. doi: 10.1074/jbc.M501357200.
- Dunphy, W. G. et Rothman, J. E. (1985) « Compartmental organization of the golgi stack », *Cell*, 42(1), p. 13-21. doi: 10.1016/S0092-8674(85)80097-0.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Rousselet, A., Janoueix-lerosey, I. et Goud, B. (2013) « Interaction of a Golgi-Associated Kinesin-Like Protein with Rab6 Interaction of a Golgi-Associated Kinesin-Like Protein with Rab6 », *Science*, 580(1998). doi: 10.1126/science.279.5350.580.
- Eden, E. R. (2016) « The formation and function of ER-endosome membrane contact sites », *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. The Author, 1861(8), p. 874-879. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.01.020.
- Edgar, J. R., Eden, E. R. et Futter, C. E. (2014) « Hrs- and CD63-Dependent Competing Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles », *Traffic*. doi: 10.1111/tra.12139.
- Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P. M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A. R. R., McLeod, I. X., Yates, J. R., Maiato, H., Khodjakov, A., Akhmanova, A. et Kaverina, I. (2007) « Asymmetric CLASP-Dependent Nucleation of Noncentrosomal Microtubules at the trans-Golgi Network », *Developmental Cell*, 12(6), p. 917-930. doi: 10.1016/j.devcel.2007.04.002.
- Engqvist-Goldstein, A. E. Y., Zhang, C. X., Carreno, S., Barroso, C., Heuser, J. E. et Drubin, D. G. (2004) « RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery », *Molecular biology of the cell*, 15(April), p. 3751-3737. doi: 10.1091/mbc.E03.
- Escola, J.-M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O. et Geuze, H. J. (1998) « Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes », *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), p. 20121. Disponible sur: <http://www.jbc.org/content/273/32/20121.short>.
- Eskelinen, E.-L., Schmidt, C. K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., von Figura, K., Knecht, E. et Saftig, P. (2004) « Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts », *Molecular Biology of the Cell*, 15(July), p. 3132-3145.
- Eskelinen, E., Cuervo, A. M., Taylor, M. R. G., Nishino, I., Blum, S., Dice, J. F., Sandoval, I. V., Lippincott-schwartz, J., Thomas, J. et Saftig, P. (2005) « Unifying Nomenclature for the Isoforms of the Lysosomal Membrane Protein LAMP-2 », *Traffic*, (July), p. 1058-1061. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00337.x.

- Eskelinen, E., Illert, A. L., Tanaka, Y., Blanz, J., Figura, K. Von, Saftig, P. et Kiel, D.- (2002) « Role of LAMP-2 in Lysosome Biogenesis and Autophagy », *Molecular Biology of the Cell*, 13(September), p. 3355-3368. doi: 10.1091/mbc.E02.
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J. C. et Gould, S. J. (2007) « Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV Gag to exosomes », *PLoS Biology*, 5(6), p. 1267-1283. doi: 10.1371/journal.pbio.0050158.
- Foret, L., Dawson, J. E., Villaseñor, R., Collinet, C., Deutsch, A., Brusch, L., Zerial, M., Kalaidzidis, Y. et Jülicher, F. (2012) « A general theoretical framework to infer endosomal network dynamics from quantitative image analysis », *Current Biology*, 22(15), p. 1381-1390. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.021.
- Forterre, P. (2016) « To be or not to be alive: How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life », *Studies in History and Philosophy of Science Part C :Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*. Elsevier Ltd, 59, p. 100-108. doi: 10.1016/j.shpsc.2016.02.013.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N. et Stephen, C. (2004) « Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy Harrison , Tomas Kirchhausen and Thomas Walz », *Nature*, 579(December), p. 573-579.
- Fourriere, L., Kasri, A., Gareil, N., Bardin, S., Boulanger, J., Sikora, R., Boncompain, G., Miserey-Lenkei, S., Perez, F. et Goud, B. (2019) « RAB6 and microtubules restrict protein secretion to focal adhesions », *Journal of Cell*, 218(7), p. 2215-2231. doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.201805002>.
- Frémont, S., Hammich, H., Bai, J., Wioland, H., Klinkert, K., Rocancourt, M., Kikuti, C., Stroebel, D., Romet-lemonne, G., Pylypenko, O., Houdusse, A. et Echard, A. (2017) « Oxidation of F-actin controls the terminal steps of cytokinesis », *Nature Communications*, p. 1-16. doi: 10.1038/ncomms14528.
- Friedman, J. R., DiBenedetto, J. R., West, M., Rowland, A. A. et Voeltz, G. K. (2013) « Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature », *Molecular Biology of the Cell*, 24(7), p. 1030-1040. doi: 10.1091/mbc.E12-10-0733.
- Fujita, H., Saeki, M., Yasunaga, K., Ueda, T., Imoto, T. et Himeno, M. (1999) « In vitro binding study of adaptor protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-motif) », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255(1), p. 54-58. doi: 10.1006/bbrc.1998.0140.
- Fujiwara, Y., Furuta, A., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Yoshimura, A., Tamai, Y., Wada, K. et Kabuta, T. (2013) « Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA », *Autophagy*, 9(3), p. 403-409. doi: 10.4161/auto.23002.
- Fujiwara, Y., Hase, K., Wada, K. et Kabuta, T. (2015) « An RNautophagy/DNautophagy receptor, LAMP2C, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding », *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 460(2), p. 281-286. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.025.
- Fujiwara, Y., Kikuchi, H., Aizawa, S., Furuta, A., Hatanaka, Y., Konya, C., Uchida, K., Wada, K. et Kabuta, T. (2013) « Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes », *Autophagy*, 9(8), p. 1167-1171. doi: 10.4161/auto.24880.
- Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J. et Carlsson, S. R. (1988) « Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-2 and h-lamp 2. Comparison of their deduced amino acid sequences », *Journal of Biological Chemistry*, 263(35), p. 18920-18928.
- Furuno, K., Ishikawa, T., Kenji, A., Shinji, Y., Yoshitaka, T., Yasunori, Y., Hiroshi, T., Masaru, H. et Keitaro, K. (1989) « Morphological Glycoprotein Localization in the Endocytic of a Major Lysosomal », *The Journal of Biochemistry*, 716, p. 708-716.
- Furuno, K., Shinji, Y., Kenji, A., Yoshitaka, T., Yasunori, Y., Hiroshi, T., Masaru, H. et Keitaro, K. (1989) « Biochemical Analysis of the Movement of a Major Lysosomal Membrane Glycoprotein in the Endocytic Membrane System », *The Journal of Biochemistry*, 106(4), p. 717-722.
- Futerman, A. H. et Riezman, H. (2005) « The ins and outs of sphingolipid synthesis », *Trends in Cell Biology*, 15(6), p. 312-318. doi: 10.1016/j.tcb.2005.04.006.
- Gallon, M., Clairfeuille, T., Steinberg, F., Mas, C., Ghai, R., Sessions, R. B., Teasdale, R. D., Collins, B. M. et Cullen, P. J. (2014) « A unique PDZ domain and arrestin-like fold interaction reveals mechanistic details of

- endocytic recycling by SNX27-retromer », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), p. E3604-E3613. doi: 10.1073/pnas.1410552111.
- Ganley, I. G., Espinosa, E. et Pfeffer, S. R. (2008) « A syntaxin 10 – SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells », *The Journal of Cell Biology*, 180(1), p. 159-172. doi: 10.1083/jcb.200707136.
- Gassart, A. De, Ge, C., Fe, B. et Vidal, M. (2015) « Lipid raft-associated protein sorting in exosomes », *Blood*, 102(13), p. 4336-4345. doi: 10.1182/blood-2003-03-0871.Supported.
- Gerdes, H. H. et Glombik, M. M. (1999) « Signal-mediated sorting to the regulated pathway of protein secretion », *Annals of Anatomy*. Urban & Fischer Verlag, 181(5), p. 447-453. doi: 10.1016/S0940-9602(99)80021-1.
- Geuze, H. J., Stoorvogel, W., Strous, G. J., Slot, J. W., Bleekemolen, J. E. et Mellman, I. (1988) « Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytic vesicles », *Journal of Cell Biology*, 107(6 II), p. 2491-2501. doi: 10.1083/jcb.107.6.2491.
- Ghai, R., Bugarcic, A., Liu, H., Norwood, S. J., Skeldal, S., Coulson, E. J., Li, S. S.-C., Teasdale, R. D. et Collins, B. M. (2013) « Structural basis for endosomal trafficking of diverse transmembrane cargos by PX-FERM proteins », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), p. E643-E652. doi: 10.1073/pnas.1216229110.
- Ghai, R., Mobli, M., Norwood, S. J., Bugarcic, A., Teasdale, R. D., King, G. F. et Collins, B. M. (2011) « Phox homology band 4.1/ezrin/radixin/moesin-like proteins function as molecular scaffolds that interact with cargo receptors and Ras GTPases », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19), p. 7763-7768. doi: 10.1073/pnas.1017110108.
- Ghosh, P., Dahms, N. M. et Kornfeld, S. (2003) « Mannose 6-phosphate receptors: New twists in the tale », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(3), p. 202-212. doi: 10.1038/nrm1050.
- Ghosh, P. et Kornfeld, S. (2003) « AP-1 binding to sorting signals and release from clathrin-coated vesicles is regulated by phosphorylation », *Journal of Cell Biology*, 160(5), p. 699-708. doi: 10.1083/jcb.200211080.
- Ghosh, P. et Kornfeld, S. (2004a) « The cytoplasmic tail of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor contains four binding sites for AP-1 », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 426(2), p. 225-230. doi: 10.1016/j.abb.2004.02.011.
- Ghosh, P. et Kornfeld, S. (2004b) « The GGA proteins: Key players in protein sorting at the trans-Golgi network », *European Journal of Cell Biology*, 83(6), p. 257-262. doi: 10.1078/0171-9335-00374.
- Ghossoub, R., Lembo, F., Rubio, A., Gaillard, C. B., Bouchet, J., Vitale, N., Slavík, J., Machala, M. et Zimmermann, P. (2014) « Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2 », *Nature Communications*, 5. doi: 10.1038/ncomms4477.
- Gillingham, A. K. et Munro, S. (2016) « Finding the Golgi: Golgin Coiled-Coil Proteins Show the Way », *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 26(6), p. 399-408. doi: 10.1016/j.tcb.2016.02.005.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J. C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L. M., Lord, J. M., Nilsson, T. et Pepperkok, R. (1999) « Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. », *Nature Cell Biology*, 1(7), p. 423-430. doi: 10.1038/15658.
- Glick, B. S. et Nakano, A. (2009) « Membrane Traffic Within the Golgi Apparatus », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25(1), p. 113-132. doi: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175421.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J. M. et De Matteis, M. A. (2004) « FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P », *Nature Cell Biology*, 6(5), p. 393-404. doi: 10.1038/ncb1119.
- Gomez, T. S., Gorman, J. A., Artal-Martinez de Narvajas, A., Koenig, A. O. et Billadeau, D. D. (2012) « Trafficking defects in WASH-knockout fibroblasts originate from collapsed endosomal and lysosomal networks », *Molecular Biology of the Cell*, 23(16), p. 3215-3228. doi: 10.1091/mbc.e12-02-0101.
- Gomi, H., Mizutani, S., Kasai, K., Itohara, S. et Izumi, T. (2005) « Granuphilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery », *The Journal of Cell Biology*, p. 99-109. doi: 10.1083/jcb.200505179.
- Gonzalez-Polo, R.-A. (2005) « The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic

- death », *Journal of Cell Science*, 118(14), p. 3091-3102. doi: 10.1242/jcs.02447.
- Gonzalez, A., Valeiras, M., Sidransky, E. et Tayebi, N. (2014) « Lysosomal integral membrane protein-2: A new player in lysosome-related pathology », *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(2), p. 84-91. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.12.005.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. et Gruenberg, J. (1991) « Rab5 Controls Early Endosome Fusion in Vitro », *Cell*, 64(5), p. 915-925. doi: 10.1016/0092-8674(91)90316-Q.
- Gough, N. R. et Fambrough, D. M. (1997) « Different Steady State Subcellular Distributions of the Three Splice Variants of Lysosome-associated Membrane Protein LAMP-2 Are Determined Largely by the COOH-terminal Amino Acid Residue », *The Journal of Cell Biology*, 137(5), p. 1161-1169.
- Granger, B. L., Green, S. A., Gabel, C. A., Howe, C. L., Mellman, I. et Helenius, A. (1990) « Characterization and cloning of Igpl10, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells », *Journal of Biological Chemistry*, 265(20), p. 12036-12043.
- Green, S. A., Zimmer, K. P., Griffiths, G. et Mellman, I. (1987) « Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins », *Journal of Cell Biology*, 105(3), p. 1227-1240. doi: 10.1083/jcb.105.3.1227.
- Griffiths, G., Pfeiffer, S., Simons, K. et Matlin, K. (1985) « Exit of newly synthesized membrane proteins from the trans cisterna of the golgi complex to the plasma membrane », *Journal of Cell Biology*, 101(3), p. 949-964. doi: 10.1083/jcb.101.3.949.
- Grigoriev, I., Gouveia, S. M., van der Vaart, B., Demmers, J., Smyth, J. T., Honnappa, S., Splinter, D., Steinmetz, M. O., Putney, J. W., Hoogenraad, C. C. et Akhmanova, A. (2008) « STIM1 Is a MT-Plus-End-Tracking Protein Involved in Remodeling of the ER », *Current Biology*, 18(3), p. 177-182. doi: 10.1016/j.cub.2007.12.050.
- Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P. S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I. V., Grosveld, F., Hoogenraad, C. C. et Akhmanova, A. (2007) « Rab6 Regulates Transport and Targeting of Exocytotic Carriers », *Developmental Cell*, 13(2), p. 305-314. doi: 10.1016/j.devcel.2007.06.010.
- Grigoriev, I., Yu, K. Lou, Martinez-Sanchez, E., Serra-Marques, A., Smal, I., Meijering, E., Demmers, J., Peränen, J., Pasterkamp, R. J., Van Der Sluijs, P., Hoogenraad, C. C. et Akhmanova, A. (2011) « Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers », *Current Biology*, 21(11), p. 967-974. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.030.
- Gruenberg, J. (2001) « The endocytic pathway: a mosaic of domains », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(October), p. 1-10.
- Guarnieri, F. G., Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y. et August, J. T. (1993) « The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1 », *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), p. 1941-1946.
- Hara, S., Kiyokawa, E., Iemura, S., Tatsume, T., Wassmer, T., Cullen, P. J., Hiai, H. et Matsuda, M. (2008) « The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent mannose-6-phosphate receptor transport », *Molecular Biology of the Cell*, 19, p. 3823-3835. doi: 10.1091/mbc.E08.
- Harbour, M. E., Breusegem, S. Y. et Seaman, M. N. J. (2012) « Recruitment of the endosomal WASH complex is mediated by the extended 'tail' of Fam21 binding to the retromer protein Vps35 », *Biochemical Journal*, 442(1), p. 209-220. doi: 10.1042/bj20111761.
- Harrison, M. S., Hung, C.-S., Liu, T. -t., Christiano, R., Walther, T. C. et Burd, C. G. (2014) « A mechanism for retromer endosomal coat complex assembly with cargo », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), p. 267-272. doi: 10.1073/pnas.1316482111.
- Harter, C. et Mellman, I. (1992) « Transport of the Lysosomal Membrane Glycoprotein Igpl20 (IgpA) to Lysosomes Does Not Require Appearance on the Plasma Membrane », *The Journal of Cell Biology*, 120.
- Harterink, M., Port, F., Lorenowicz, M. J., McGough, I. J., Silhankova, M., Betist, M. C., Van Weering, J. R. T., Van Heesbeen, R. G. H. P., Middelkoop, T. C., Basler, K., Cullen, P. J. et Korswagen, H. C. (2011) « A SNX3-dependent retromer pathway mediates retrograde transport of the Wnt sorting receptor Wntless and is required for Wnt secretion », *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(8), p. 914-923. doi: 10.1038/ncb2281.

- Hasanagic, M., Waheed, A. et Eissenberg, J. C. (2015) *Different Pathways to the Lysosome: Sorting out Alternatives*, *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/bs.ircmb.2015.07.008.
- Hasegawa, J., Strunk, B. S. et Weisman, L. S. (2017) « PI5P and PI(3,5)P₂: Minor, but Essential Phosphoinositides », *Cell Structure and Function*, 42(1), p. 49-60. doi: 10.1247/csf.17003.
- Hashim, A. I., Zhang, X., Wojtkowiak, J. W. et Gillies, R. J. (2013) « Imaging pH and Metastasis », *NMR in Biomedicine*, 24(6), p. 582-591. doi: 10.1002/nbm.1644.Imaging.
- Hattula, K., Furuhielm, J., Arffman, A. et Peränen, J. (2002) « A Rab8-specific GDP-GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport », *Molecular biology of the cell*, 13(September), p. 3268-3280.
- Hattula, K., Furuhielm, J., Tikkanen, J., Tanhuanpaa, K., Laakkonen, P. et Peranen, J. (2006) « Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation », *Journal of Cell Science*, 119(23), p. 4866-4877. doi: 10.1242/jcs.03275.
- von Heijne, G. (2006) « Membrane-protein topology », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(December), p. 909-918. doi: 10.1038/nrm2063.
- Hellström, I., Horn, D., Linsley, P., Brown, J. P., Brankovan, V. et Hellström, K. E. (1986) « Monoclonal Mouse Antibodies Raised against Human Lung Carcinoma1 », *Cancer Research*, (August), p. 3917-3923.
- Hemalatha, A. et Mayor, S. (2019) « Recent advances in clathrin-independent endocytosis », *F1000Research*, 8(May), p. 1-7. doi: 10.12688/f1000research.16092.1.
- Hemler, M. E. (2003) « Tetraspanin Proteins Mediate Cellular Penetration, Invasion, and Fusion Events and Define a Novel Type of Membrane Microdomain », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1), p. 397-422. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153609.
- Henell, F., Ericsson, J. et Glaumann, H. (1983) « Degradation of phagocytosed lysosomes by Kupffer cell lysosomes. », *Lab Invest.*
- Henne, M. (2019) « And three's a party: lysosomes, lipid droplets, and the ER in lipid trafficking and cell homeostasis », *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 59(Ldl), p. 40-49. doi: 10.1016/j.ceb.2019.02.011.
- Heuser, J. E. (2004) « Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation », *The Journal of Cell Biology*, 108(2), p. 389-400. doi: 10.1083/jcb.108.2.389.
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S. et Charpentier, E. (2018) « The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. », *Cell*, 172(6), p. 1239-1259. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.032.
- Hirst, J., Barlow, L., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N. J., Dacks, J. B. et Robinson, M. S. (2011) « The fifth adaptor protein complex », *PLoS Biology*, 9(10). doi: 10.1371/journal.pbio.1001170.
- Hirst, J., Borner, G. H. H., Edgar, J., Hein, M. Y., Mann, M., Buchholz, F., Antrobus, R. et Robinson, M. S. (2013) « Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15 », *Molecular Biology of the Cell*, 24(16), p. 2558-2569. doi: 10.1091/mbc.e13-03-0170.
- Hirst, J., Bright, N. A., Rous, B. et Robinson, M. S. (1999) « Characterization of a Fourth Adaptor-related Protein Complex », *Molecular Biology of the Cell*, 10(8), p. 2787-2802. doi: 10.1091/mbc.10.8.2787.
- Hirst, J., Itzhak, D. N., Antrobus, R., Borner, G. H. H. et Robinson, M. S. (2018) « Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval », *PLoS Biology*, 16(1), p. 1-28. doi: 10.1371/journal.pbio.2004411.
- Höning, S., Griffith, J., Geuze, H. J. et Hunziker, W. (1996) « The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. », *The EMBO journal*, 15(19), p. 5230-9. Disponible sur: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Honing, S. et Hunziker, W. (1995) « Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igpl20 (lamp-I) in MDCK cells », *Journal of Cell Biology*, 128(3), p. 321-332.

doi: 10.1083/jcb.128.3.321.

- Höning, S., Ricotta, D., Krauss, M., Späte, K., Spolaore, B., Motley, A., Robinson, M., Robinson, C., Haucke, V. et Owen, D. J. (2005) « Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates sorting signal recognition by the clathrin-associated adaptor complex AP2 », *Molecular Cell*, 18(5), p. 519-531. doi: 10.1016/j.molcel.2005.04.019.
- Höning, S., Sandoval, I. et Von Figura, K. (1998) « A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3 », *EMBO Journal*, 17(5), p. 1304-1314. doi: 10.1093/emboj/17.5.1304.
- Höning, S., Sosa, M., Hille-Rehfeld, A. et Von Figura, K. (1997) « The 46-kDa mannose 6-phosphate receptor contains multiple binding sites for clathrin adaptors », *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), p. 19884-19890. doi: 10.1074/jbc.272.32.19884.
- Horiuchi, H., Lippé, R., McBride, H. M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M. et Zerial, M. (1997) « A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function », *Cell*, 90(6), p. 1149-1159. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80380-3.
- Hotta, H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Ricciardi, R. P., Tsujimoto, Y., Croce, C. M. et Koprowski, H. (1988) « Molecular Cloning and Characterization of an Antigen Associated with Early Stages of Melanoma Tumor Progression1 », *Cancer Research*, p. 2955-2962.
- Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R. G., Virta, H., Zerial, M. et Simons, K. (1993) « Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane », *Journal of Cell Biology*, 123(1), p. 35-45. doi: 10.1083/jcb.123.1.35.
- Huizing, M., Sarangarajan, R., Strovel, E., Zhao, Y., Gahl, W. A. et Boissy, R. E. (2001) « AP-3 Mediates Tyrosinase but Not TRP-1 Trafficking in Human Melanocytes », *Molecular Biology of the Cell*, 12(July), p. 2075-2085.
- Hunziker, W. et Geuze, H. J. (1996) « Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. », *BioEssays*, 18(5), p. 379-89. doi: 10.1002/bies.950180508.
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K. et Mellman, I. (1991) « Basolateral Sorting in MDCK Cells Requires a Distinct Cytoplasmic Domain Determinant », *Cell*, 66, p. 907-920.
- Huotari, J. et Helenius, A. (2011) « Endosome maturation », *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 30(17), p. 3481-3500. doi: 10.1038/emboj.2011.286.
- Hutchinson, C. R. et Shu-Wen, L. (1983) « Comparative biochemistry of fatty acid and macrolide antibiotic (Brefeldin A) formation in *Penicillium brefeldianum* », *Tetrahedron*, 39(21).
- Huynh, K. K., Eskelinen, E. L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P. et Grinstein, S. (2007) « LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes », *EMBO Journal*, 26(2), p. 313-324. doi: 10.1038/sj.emboj.7601511.
- Hyttinen, J. M. T., Amadio, M., Viiri, J., Pascale, A., Salminen, A. et Kaarniranta, K. (2014) « Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases », *Ageing Research Reviews*. Elsevier B.V., 18, p. 16-28. doi: 10.1016/j.arr.2014.07.002.
- Jadot, M., Canfield, W. M., Gregory, W. et Kornfeld, S. (1992) « Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor », *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), p. 11069-11077.
- Jan, C. H., Williams, C. C. et Weissman, J. S. (2014) « Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity- specific ribosome profiling », *Science*, 346(6210), p. 748-751. doi: 10.1126/science.1257521.
- Jang, H. I. et Lee, H. (2003) « A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells », *Experimental and Molecular Medicine*, 35(4), p. 317-323. doi: 10.1038/emmm.2003.43.
- Janvier, K. et Bonifacino, J. S. (2005) « Role of the Endocytic Machinery in the Sorting of Lysosome-associated Membrane Proteins », *Molecular Biology of the Cell*, (16), p. 4231-4242. doi: 10.1091/mbc.E05.
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J. R., Martina, J. A., Kim, B. Y., Venkatesan, S. et Bonifacino, J. S. (2003)

- « Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 γ - σ 1 and AP-3 δ - σ 3 hemicomplexes », *Journal of Cell Biology*, 163(6), p. 1281-1290. doi: 10.1083/jcb.200307157.
- Jaulin, F., Xue, X., Rodriguez-Boulan, E. et Kreitzer, G. (2007) « Polarization-Dependent Selective Transport to the Apical Membrane by KIF5B in MDCK Cells », *Developmental Cell*, 13(4), p. 511-522. doi: 10.1016/j.devcel.2007.08.001.
- Jia, D., Gomez, T. S., Billadeau, D. D. et Rosen, M. K. (2012) « Multiple repeat elements within the FAM21 tail link the WASH actin regulatory complex to the retromer », *Molecular Biology of the Cell*, 23(12), p. 2352-2361. doi: 10.1091/mbc.e11-12-1059.
- Jimenez, A. J. et Perez, F. (2017) « Plasma membrane repair: the adaptable cell life-insurance. », *Current opinion in cell biology*, 47, p. 99-107. doi: 10.1016/j.ceb.2017.03.011.
- Johannes, L. et Wunder, C. (2011) « Retrograde transport: Two (or more) roads diverged in an endosomal tree? », *Traffic*, 12(8), p. 956-962. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01200.x.
- Johnson, K. F., Chan, W. et Kornfeld, S. (1990) « Cation-dependent mannose 6-phosphate receptor contains two internalization signals in its cytoplasmic domain. », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), p. 10010-10014. doi: 10.1073/pnas.87.24.10010.
- Johnson, K. F. et Kornfeld, S. (1992a) « A His-Leu-Leu sequence near the carboxyl terminus of the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is necessary for the lysosomal enzyme sorting function », *Journal of Biological Chemistry*, 267(24), p. 17110-17115.
- Johnson, K. F. et Kornfeld, S. (1992b) « The cytoplasmic tail of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor has two signals for lysosomal enzyme sorting in the Golgi », *Journal of Cell Biology*, 119(2), p. 249-257. doi: 10.1083/jcb.119.2.249.
- Jordan, M., Schallhorn, A. et Wurm, F. M. (1996) « Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. », *Nucleic Acids Research*, 24(4), p. 596-601. doi: 10.1093/nar/24.4.596.
- Jordens, I., Fernandez-Borja, M., Marsman, M., Dusseljee, S., Janssen, L., Calafat, J., Janssen, H., Wubbolts, R. et Neefjes, J. (2001) « The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors », *Current Biology*, 11(21), p. 1680-1685. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00531-0.
- Junn, E., Lee, S. S., Suhr, U. T. et Mouradian, M. M. (2002) « Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment », *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), p. 47870-47877. doi: 10.1074/jbc.M203159200.
- Kaksonen, M. et Roux, A. (2018) « Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 19(5), p. 313-326. doi: 10.1038/nrm.2017.132.
- van der Kant, R. et Neefjes, J. (2014) « Small regulators , major consequences – Ca²⁺ and cholesterol at the endosome – ER interface », *Journal of Cell Science*, p. 929-938. doi: 10.1242/jcs.137539.
- Karlsson, K. et Carlsson, S. R. (1998) « Sorting of Lysosomal Membrane Glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into Vesicles Distinct from Mannose 6-Phosphate Receptor/ γ -Adaptin Vesicles at the trans -Golgi Network », *The Journal of Biological Chemistry*, 273(30), p. 18966-18973. doi: 10.1074/jbc.273.30.18966.
- Kato, Y., Misra, S., Puertollano, R., Hurley, J. H. et Bonifacino, J. S. (2002) « Phosphoregulation of sorting signal-vhs domain interactions by a direct electrostatic mechanism », *Nature Structural Biology*, 9(7), p. 532-536. doi: 10.1038/nsb807.
- Kaushik, S., Massey, A. C. et Cuervo, A. M. (2006) « Lysosome membrane lipid microdomains: Novel regulators of chaperone-mediated autophagy », *EMBO Journal*, 25(17), p. 3921-3933. doi: 10.1038/sj.emboj.7601283.
- Kerr, M. C., Bennetts, J. S., Simpson, F., Thomas, E. C., Flegg, C., Gleeson, P. A., Wicking, C. et Teasdale, R. D. (2005) « A novel mammalian retromer component, Vps26B », *Traffic*, 6(11), p. 991-1001. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00328.x.
- Kienzle, C. et von Blume, J. (2014) « Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network », *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 24(10), p. 584-593. doi: 10.1016/j.tcb.2014.04.007.

- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E. et Cuervo, A. M. (2004) « Activation of Chaperone-mediated Autophagy during Oxidative Stress », *Molecular Biology of the Cell*, 15(November), p. 4829-4840.
- Kinoshita, T. (2014) « Enzymatic mechanism of GPI anchor attachment clarified », *Cell Cycle*, 13(12), p. 1838-1839. doi: 10.4161/cc.29379.
- Kitajima, Y., Suzuki, N., Tashiro, Y., Warita, H., Kato, M., Tateyama, M., Ando, R., Izumi, R., Yamazaki, M., Abe, M., Sakimura, K., Ito, H., Makoto, U., Nagatomi, R., Takahashi, R. et Aoki, M. (2014) « Proteasome Dysfunction Induces Muscle Growth Defects And Protein Aggregation », *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 46, p. 352. doi: 10.1249/01.mss.0000494232.77546.da.
- Kleene, R. et Berger, E. G. (1993) « The molecular and cell biology of glycosyltransferases », *BBA - Reviews on Biomembranes*, 1154(3-4), p. 283-325. doi: 10.1016/0304-4157(93)90003-7.
- Klumperman, J. (2011) « Architecture of the mammalian Golgi », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), p. 1-19. doi: 10.1101/cshperspect.a005181.
- Klumperman, J., Hille, A., Veenendaal, T., Oorschot, V., Stoorvogel, W., Von Figura, K. et Geuze, H. J. (1993) « Differences in the Endosomal Distributions of the 2 Mannose 6- Phosphate Receptors », *J.Cell Biol.*, 121(5), p. 997-1010. doi: 10.1083/jcb.121.5.997.
- Klumperman, J. et Raposo, G. (2015) « The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, p. 1-22.
- Knapinska, A. M. et Fields, G. B. (2019) « The Expanding Role of MT1-MMP in Cancer Progression », *Pharmaceuticals*, p. 15-20.
- Kondoh, M., Ueda, M., Ichihashi, M. et Mishima, Y. (1993) « Decreased expression of human melanoma-associated antigen ME491 along the progression of melanoma pre-canceroses to invasive and metastatic melanomas. », *Melanoma Research*.
- Korner, C., Herzog, A. et Weber, B. (1994) « In vitro phosphorylation of the 46-kDa Mannose 6-Phosphate Receptor by Casein Kinase II », *The Journal of Biochemistry*.
- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y. et Nakatogawa, H. (2018) « The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), p. 10363-10368. doi: 10.1073/pnas.1806727115.
- Kowal, J., Tkach, M. et Théry, C. (2014) « Biogenesis and secretion of exosomes », *Current Opinion in Cell Biology*, 29(1), p. 116-125. doi: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.
- Kraus, F. et Ryan, M. T. (2017) « The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission », *Journal of Cell Science*, 2, p. 1-8. doi: 10.1242/jcs.199562.
- Kreis, T. E. et Lodish, H. F. (1986) « Oligomerization is essential for transport of vesicular stomatitis viral glycoprotein to the cell surface », *Cell*, 46(6), p. 929-937. doi: 10.1016/0092-8674(86)90075-9.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R. et Rodriguez-Boulan, E. (2000) « Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein », *Nature Cell Biology*, 2(2), p. 125-127. doi: 10.1038/35000081.
- Krise, J. P., Sincok, P. M., Orsel, J. G. et Pfeffer, S. R. (2000) « Quantitative Analysis of TIP47-Receptor Cytoplasmic Domain Interactions », *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), p. 25188-25193. doi: 10.1074/jbc.m001138200.
- Krishnan, V., Bane, S. M., Kawle, P. D., Nares, K. N. et Kalraiya, R. D. (2005) « Altered melanoma cell surface glycosylation mediates organ specific adhesion and metastasis via lectin receptors on the lung vascular endothelium », *Clinical and Experimental Metastasis*, 22(1), p. 11-24. doi: 10.1007/s10585-005-2036-2.
- Krzewski, K., Gil-krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G., Coligan, J. E., Dc, W., Krzewski, K., Gil-krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G. et Coligan, J. E. (2013) « LAMP1 / CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity », *Immunobiology*, 121(23), p. 4672-4683. doi: 10.1182/blood-2012-08-453738.
- Kucera, A., Distefano, M. B., Berg-larsen, A., Skjeldal, F., Repnik, U., Bakke, O. et Progida, C. (2015) « Spatiotemporal Resolution of Rab9 and CI-MPR Dynamics in the Endocytic Pathway », *Traffic*, p. 211-229.

doi: 10.1111/tra.12357.

- Kundra, R. et Kornfeld, S. (1999) « Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis », *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), p. 31039-31046. doi: 10.1074/jbc.274.43.31039.
- Kurokawa, K., Osakada, H., Kojidani, T., Waga, M., Suda, Y., Asakawa, H., Haraguchi, T. et Nakano, A. (2019) « Visualization of secretory cargo transport within the Golgi apparatus », *Journal of Cell Biology*, 218(5), p. 1602-1618. doi: 10.1083/jcb.201807194.
- Kuronita, T., Eskelinen, E., Fujita, H., Saftig, P. et Himeno, M. (2002) « A role for the lysosomal membrane protein LAMP2 in the biogenesis and maintenance of endosomal and lysosomal morphology », *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs.00075.
- Kvainickas, A., Jimenez-Organ, A., Nägele, H., Hu, Z., Dengjel, J. et Steinberg, F. (2017) « Cargo-selective SNX-BAR proteins mediate retromer trimer independent retrograde transport », *Journal of Cell Biology*, 216(11), p. 3677-3693. doi: 10.1083/jcb.201702137.
- Kwon, M. S., Shin, S. H., Yim, S. H., Lee, K. Y., Kang, H. M., Kim, T. M. et Chung, Y. J. (2007) « CD63 as a biomarker for predicting the clinical outcomes in adenocarcinoma of lung », *Lung Cancer*, 57(1), p. 46-53. doi: 10.1016/j.lungcan.2007.01.032.
- Kyttälä, A., Ihrke, G., Vesa, J., Schell, M. J. et Luzio, P. J. (2004) « Two Motifs Target Batten Disease Protein CLN3 to Lysosomes in Transfected Nonneuronal and Neuronal Cells », *Molecular biology of the cell*, 15(March), p. 1313-1323.
- Lafay, F. (1974) « Envelope proteins of vesicular stomatitis virus: effect of temperature sensitive mutations in complementation groups III and V », *Journal of Virology*, 14(5), p. 1220-1228.
- Laferte, S. et Dennist, J. W. (1989) « Purification of two glycoproteins expressing / 1-6 branched Asn-linked oligosaccharides from metastatic tumour cells », *Biochemical Journal*, 259, p. 569-576.
- Lansbergen, G., Grigoriev, I., Mimori-Kiyosue, Y., Ohtsuka, T., Higa, S., Kitajima, I., Demmers, J., Galjart, N., Houtsmuller, A. B., Grosveld, F. et Akhmanova, A. (2006) « CLASPs Attach Microtubule Plus Ends to the Cell Cortex through a Complex with LL5β », *Developmental Cell*, 11(1), p. 21-32. doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.012.
- Latysheva, N., Muratov, G., Rajesh, S., Padgett, M., Hotchin, N. A., Overduin, M. et Berditchevski, F. (2006) « Syntenin-1 Is a New Component of Tetraspanin-Enriched Microdomains: Mechanisms and Consequences of the Interaction of Syntenin-1 with CD63 », *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), p. 7707-7718. doi: 10.1128/mcb.00849-06.
- Lauffer, B. E. L., Melero, C., Temkin, P., Lei, C., Hong, W., Kortemme, T. et Von Zastrow, M. (2010) « SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane », *Journal of Cell Biology*, 190(4), p. 565-574. doi: 10.1083/jcb.201004060.
- Lee, I., Doray, B., Govero, J. et Kornfeld, S. (2008) « Binding of cargo sorting signals to AP-1 enhances its association with ADP ribosylation factor 1-GTP », *Journal of Cell Biology*, 180(3), p. 467-472. doi: 10.1083/jcb.200709037.
- Lefrançois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M. et Morales, C. R. (2003) « The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin », *EMBO Journal*, 22(24), p. 6430-6437. doi: 10.1093/emboj/cdg629.
- Lehmann, L. E., Eberle, W., Krull, S., Prill, V., Schmidt, B., Sander, C., von Figura, K. et Peters, C. (1992) « The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHH. », *The EMBO journal*, 11(12), p. 4391-4399.
- Lekishvili, T., Fromm, E., Mujoomdar, M. et Berditchevski, F. (2008) « The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility », *Journal of Cell Science*, 121(5), p. 685-694. doi: 10.1242/jcs.020347.
- Letourneur, F. et Klausner, R. D. (1992) « A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains », *Cell*, 69(7), p. 1143-1157. doi: 10.1016/0092-8674(92)90636-Q.

- Levy, S. et Shoham, T. (2005) « The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes », *Nature Reviews Immunology*, 5(2), p. 136-148. doi: 10.1038/nri1548.
- Li, W. W., Li, J. et Bao, J. K. (2012) « Microautophagy: Lesser-known self-eating », *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7), p. 1125-1136. doi: 10.1007/s00018-011-0865-5.
- Lindwasser, O. W., Smith, W. J., Chaudhuri, R., Yang, P., Hurley, J. H. et Bonifacio, J. S. (2008) « A Diacidic Motif in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Is a Novel Determinant of Binding to AP-2 », *Journal of Virology*, 82(3), p. 1166-1174. doi: 10.1128/jvi.01874-07.
- Lippe, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A. et Zerial, M. (2001) « Functional Synergy between Rab5 Effector Rabaptin-5 and Exchange Factor Rabex-5 When Physically Associated in a Complex », *Molecular Biology of the Cell*, 12(7), p. 2219-2228. doi: 10.1091/mbc.12.7.2219.
- Lippincott-Schwartz, J. et Fambrough, D. M. (1986) « Lysosomal Membrane Dynamics : Structure and Interorganellar Movement of a Major Lysosomal Membrane Glycoprotein », *The Journal of Cell Biology*, 102(May), p. 1593-1605.
- Lippincott-Schwartz, J. et Fambrough, D. M. (1987) « Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: Kinetic and morphological analysis », *Cell*, 49(5), p. 669-677. doi: 10.1016/0092-8674(87)90543-5.
- Lippincott-schwartz, J., Roberts, T. H. et Hirschberg, K. (2000) « Secretory Protein Trafficking and Organelle Dynamics in Living Cells », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
- Liu, P., Zhao, L., Loos, F., Iribarren, K., Lachkar, S., Zhou, H., Gomes-da-Silva, L. C., Chen, G., Bezu, L., Boncompain, G., Perez, F., Zitvogel, L., Kepp, O. et Kroemer, G. (2017) « Identification of pharmacological agents that induce HMGB1 release. », *Scientific reports*, 7(1), p. 14915. doi: 10.1038/s41598-017-14848-1.
- Lord, C., Ferro-Novick, S. et Miller, E. A. (2013) « The Highly Conserved COPII Coat Complex Sorts Cargo from the Endoplasmic Reticulum and Targets It to the Golgi », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a013367.
- Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J. et Glick, B. S. (2006) « Golgi maturation visualized in living yeast », *Nature*, 441(7096), p. 1002-1006. doi: 10.1038/nature04717.
- Lowe, M. (2011) « Structural organization of the Golgi apparatus », *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 23(1), p. 85-93. doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.004.
- Lucas, M., Gershlick, D. C., Vidaurrazaga, A., Rojas, A. L., Bonifacio, J. S. et Hierro, A. (2016) « Structural Mechanism for Cargo Recognition by the Retromer Complex », *Cell*, 167(6), p. 1623-1635.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.056.
- Luini, A. et Parashuraman, S. (2015) « Golgi and TGN », *Encyclopedia of Cell Biology*, 2, p. 183-191. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.20014-X.
- Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M. G. et Griffiths, G. M. (2017) « The Biogenesis of Lysosomes and Lysosome-Related Organelles », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9), p. 25183830. doi: 10.1101/cshperspect.a016840.The.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R. et Bright, N. A. (2007) « Lysosomes: Fusion and function », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), p. 622-632. doi: 10.1038/nrm2217.
- Maecker, T., Todd, C. et Levy, S. (1997) « The tetraspanin superfamily: molecular facilitators », *The FASEB Journal*, 11(6), p. 428-442.
- Malhotra, V. et Erismann, P. (2011) « Protein export at the ER : loading big collagens into COPII carriers », *The EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 30(17), p. 3475-3480. doi: 10.1038/emboj.2011.255.
- Malini, E., Zampieri, S., Deganuto, M., Romanello, M., Sechi, A., Bembi, B. et Dardis, A. (2015) « Role of LIMP-2 in the intracellular trafficking of β -glucosidase in different human cellular models », *FASEB Journal*, 29(9), p. 3839-3852. doi: 10.1096/fj.15-271148.
- Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. et Johannes, L. (2002) « Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform », *Journal of Cell Biology*, 156(4), p. 653-664. doi: 10.1083/jcb.200110081.

- Mancias, J. D. et Goldberg, J. (2008) « Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery », *The EMBO journal*, 27(21), p. 2918-2928. doi: 10.1038/emboj.2008.208.
- Mane, S. M., Marzella, L., Bainton, D. F., Holt, V. K., Cha, Y., Hildreth, J. E. K. et August, J. T. (1989) « Purification and Characterization of Human Lysosomal Membrane Glycoproteins », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 268(1), p. 360-378.
- Mari, M., Bujny, M. V., Zeuschner, D., Geerts, W. J. C., Griffith, J., Petersen, C. M., Cullen, P. J., Klumperman, J. et Geuze, H. J. (2008) « SNX1 defines an early endosomal recycling exit for sortilin and mannose 6-phosphate receptors », *Traffic*, 9(3), p. 380-393. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00686.x.
- Marks, M. S., Heijnen, H. F. G. et Raposo, G. (2014) « Lysosome-related organelles: Unusual compartments become mainstream », *Current Opinion in Cell Biology*, 25(4), p. 495-505. doi: 10.1016/j.ceb.2013.04.008.Lysosome-related.
- Marks, M. S., Woodruff, L., Ohno, H. et Bonifacino, J. S. (1996) « Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: Evidence for distinct saturable components », *Journal of Cell Biology*, 135(2), p. 341-354. doi: 10.1083/jcb.135.2.341.
- Massol, R. H., Boll, W., Griffin, A. M. et Kirchhausen, T. (2006) « A burst of auxilin recruitment determines the onset of clathrin-coated vesicle uncoating », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27), p. 10265-10270. doi: 10.1073/pnas.0603369103.
- Mathews, P. M., Martinie, J. B. et Fambrough, D. M. (1992) « The pathway and targeting signal for delivery of the integral membrane glycoprotein LEP100 to lysosomes », *Journal of Cell Biology*, 118(5), p. 1027-1040.
- Matlin, K. S. et Simons, K. (1983) « Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation », *Cell*, 34(1), p. 233-243. doi: 10.1016/0092-8674(83)90154-X.
- Matsuda, S., Miura, E., Matsuda, K., Kakegawa, W., Kohda, K., Watanabe, M. et Yuzaki, M. (2008) « Accumulation of AMPA Receptors in Autophagosomes in Neuronal Axons Lacking Adaptor Protein AP-4 », *Neuron*, 57(5), p. 730-745. doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.012.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. et Nakano, A. (2006) « Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation », *Nature*, 441(7096), p. 1007-1010. doi: 10.1038/nature04737.
- De Matteis, M. A. et Godi, A. (2004) « PI-loting membrane traffic », *Nature Cell Biology*, 6(6), p. 487-492. doi: 10.1038/ncb0604-487.
- De Matteis, M. A. et Luini, A. (2008) « Exiting the Golgi complex », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), p. 273-284. doi: 10.1038/nrm2378.
- Mattera, R., Park, S. Y., De Pace, R., Guardia, C. M. et Bonifacino, J. S. (2017) « AP-4 mediates export of ATG9A from the trans -Golgi network to promote autophagosome formation », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(50), p. E10697-E10706. doi: 10.1073/pnas.1717327114.
- Mayor, S. et Pagano, R. E. (2007) « Pathways of clathrin-independent endocytosis », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), p. 603-612. doi: 10.1038/nrm2216.
- Mcbride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Rohan Teasdale et Zerial, M. (1999) « Oligomeric Complexes Link Rab5 Effectors with NSF and Drive Membrane Fusion via Interactions between EEA1 and Syntaxin 13 », *Cell*, 98, p. 377-386.
- Mccartney, A. J., Zhang, Y. et Weisman, L. S. (2014) « Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: Low abundance, high significance », *BioEssays*, 36(1), p. 52-64. doi: 10.1002/bies.201300012.
- McCormick, P. J., Finneran, A. et Bonventre, E. J. (1998) « LAMP-1/ESGp appears on the cell surface of single celled mouse embryos subsequent to fertilization », *In Vitro Cell. Dev. Biol.*
- McCormick, P. J., Martina, J. A. et Bonifacino, J. S. (2005) « Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(22), p. 7910-7915. doi: 10.1073/pnas.0502206102.
- McNally, K. E., Faulkner, R., Steinberg, F., Gallon, M., Ghai, R., Pim, D., Langton, P., Pearson, N., Danson, C. M., Nägele, H., Morris, L. L., Singla, A., Overlee, B. L., Heesom, K. J., Sessions, R., Banks, L., Collins, B. M., Berger,

- I., Billadeau, D. D., Burstein, E. et Cullen, P. J. (2017) « Retriever is a multiprotein complex for retromer-independent endosomal cargo recycling », *Nature Cell Biology*, 19(10), p. 1214-1225. doi: 10.1038/ncb3610.
- Van Meel, E. et Klumperman, J. (2008) « Imaging and imagination: Understanding the endo-lysosomal system », *Histochemistry and Cell Biology*, 129(3), p. 253-266. doi: 10.1007/s00418-008-0384-0.
- Mellman, I., Fuchs, R. et Helenius, A. (1986) « Acidification of the endocytic and exocytic pathways », *Annual Review of Biochemistry*.
- Mentlik, A. N., Sanborn, K. B., Holzbaur, E. L. et Orange, J. S. (2010) « Rapid Lytic Granule Convergence to the MTOC in Natural Killer Cells Is Dependent on Dynein But Not Cytolytic Commitment », *Molecular biology of the cell*, 21, p. 2241-2256.
- Mercanti, V., Marchetti, A., Lelong, E., Perez, F., Orci, L. et Cosson, P. (2010) « Transmembrane domains control exclusion of membrane proteins from clathrin-coated pits », *Journal of Cell Science*, 123(19), p. 3329-3335. doi: 10.1242/jcs.073031.
- Méresse, S., Ludwig, T., Frank, R. et Hoflack, B. (1990) « Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate receptor. », *J. Biol. Chem.*, 265(31), p. 18833-18842.
- Merrifield, C. J., Qualmann, B., Kessels, M. M. et Almers, W. (2004) « Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp 2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts », *European Journal of Cell Biology*, 83(1), p. 13-18. doi: 10.1078/0171-9335-00356.
- Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N. et Takei, K. (2011) « Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement », *PLoS ONE*, 6(5). doi: 10.1371/journal.pone.0019764.
- Messa, M., Fernández-Busnadiego, R., Sun, E. W., Chen, H., Czaplá, H., Wrasman, K., Wu, Y., Ko, G., Ross, T., Wendland, B. et De Camilli, P. (2014) « Epsin deficiency impairs endocytosis by stalling the actin-dependent invagination of endocytic clathrin-coated pits », *eLife*, 3, p. 1-25. doi: 10.7554/elife.03311.
- Metzelaars, M. J., Wijngaard, P. L. J., Peters, P. J., Sixma, J. J., Nieuwenhuys, H. K. et Clevers, H. C. (1991) « CD63 Antigen A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells », *J Biol Chem*, 266(5), p. 3239-45. Disponible sur: <http://www.jbc.org/content/266/5/3239.short>.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. et Schu, P. (2000) « μ 1A-adaptin-deficient mice: Lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors », *EMBO Journal*, 19(10), p. 2193-2203. doi: 10.1093/emboj/19.10.2193.
- Miedel, M. T., Weixel, K. M., Bruns, J. R., Traub, L. M. et Weisz, O. A. (2006) « Posttranslational cleavage and adaptor protein complex-dependent trafficking of mucopolipin-1 », *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), p. 12751-12759. doi: 10.1074/jbc.M511104200.
- Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C. S., Hamamoto, S., Orci, L. et Schekman, R. (2003) « Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles », *Cell*, 114, p. 497-509.
- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S. et Schekman, R. (2002) « Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit », *The EMBO Journal*, 21(22), p. 6105-6113.
- Miller, S. E., Sahlender, D. A., Graham, S. C., Höning, S., Robinson, M. S., Peden, A. A. et Owen, D. J. (2011) « The molecular basis for the endocytosis of small R-SNAREs by the clathrin adaptor CALM », *Cell*, 147(5), p. 1118-1131. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.038.
- Mironov, A. A., Bezoussenko, G. V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H. S., Giandomenico, D. Di, Polishchuk, R. S., Fusella, A., Lupetti, P., Berger, E. G., Geerts, W. J. C., Koster, A. J., Burger, K. N. J. et Luini, A. (2001) « Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae », *Journal of Cell Biology*, 155(7), p. 1225-1238. doi: 10.1083/jcb.200108073.
- Miserey-Lenkei, S., Bousquet, H., Pylypenko, O., Bardin, S., Dimitrov, A., Bressanelli, G., Bonifay, R., Fraissier, V., Guillou, C., Bougeret, C., Houdusse, A., Echard, A. et Goud, B. (2017) « Coupling fission and exit of RAB6 vesicles at Golgi hotspots through kinesin-myosin interactions », *Nature Communications*. Springer US,

8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01266-0.

- Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B. et Echard, A. (2010) « Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the golgi complex », *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(7), p. 645-654. doi: 10.1038/ncb2067.
- Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J. S. et Hurley, J. H. (2002) « Structural basis for acidic-cluster dileucine sorting-signal recognition by VHS domains », *Nature*, 415(6874), p. 933-937. doi: 10.1038/415933a.
- Monier, S., Jollivet, F., Janoueix-Lerosey, I., Johannes, L. et Goud, B. (2002) « Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport », *Traffic*, 3(4), p. 289-297. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.030406.x.
- Mony, V. K., Benjamin, S. et O'Rourke, E. J. (2016) « A lysosome-centered view of nutrient homeostasis », *Autophagy*. Taylor & Francis, 12(4), p. 619-631. doi: 10.1080/15548627.2016.1147671.
- Mossessova, E., Bickford, L. C. et Goldberg, J. (2003) « SNARE Selectivity of the COPII Coat », *Cell*, 114, p. 483-495.
- Moyer, B. D., Allan, B. B., Balch, W. E. et Balch, W. E. (2001) « Rab1 Interaction with a GM130 Effector Complex Regulates COPII Vesicle cis -Golgi Tethering », *Traffic*, (stage I), p. 268-276.
- Mullock, B. M., Bright, N. A., Fearon, C. W., Gray, S. R. et Luzio, J. P. (1998) « Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent », *Journal of Cell Biology*, 140(3), p. 591-601. doi: 10.1083/jcb.140.3.591.
- Munro, S. (2013) « The Golgin Coiled-Coil Proteins of the Golgi Apparatus », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, (Paris 6). doi: 10.1101/cshperspect.a005256.
- Murk, J. L. A. N., Humbel, B. M., Ziese, U., Griffith, J. M., Posthuma, G., Slot, J. W., Koster, A. J., Verkleij, A. J., Geuze, H. J. et Kleijmeer, M. J. (2003) « Endosomal compartmentalization in three dimensions: Implications for membrane fusion », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), p. 13332-13337. doi: 10.1073/pnas.2232379100.
- Murray, D. H., Jahnel, M., Lauer, J., Avellaneda, M. J., Brouilly, N., Cezanne, A., Morales-Navarrete, H., Perini, E. D., Ferguson, C., Lupas, A. N., Kalaidzidis, Y., Parton, R. G., Grill, S. W. et Zerial, M. (2016) « An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together », *Nature*. Nature Publishing Group, 537(7618), p. 107-111. doi: 10.1038/nature19326.
- Nabi, I. R., Bivic, A. Le, Fambrough, D. et Rodriguez-boulant, E. (1991) « An Endogenous MDCK Lysosomal Membrane Glycoprotein Is Targeted Basolaterally before Delivery to Lysosomes », *The Journal of Cell Biology*, 115(6).
- Nag, S., Rani, S., Mahanty, S., Bissig, C., Arora, P., Azevedo, C., Saiardi, A., van der Sluijs, P., Delevoye, C., van Niel, G., Raposo, G. et Setty, S. R. G. (2018) « Rab4A organizes endosomal domains for sorting cargo to lysosome-related organelles », *Journal of Cell Science*, 131(18), p. jcs216226. doi: 10.1242/jcs.216226.
- Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T. P., Rabouille, C. et Warren, G. (1997) « The Vesicle Docking Protein p115 Binds GM130 , a cis -Golgi Matrix Protein , in a Mitotically Regulated Manner », *Cell*, 89, p. 445-455.
- Nakano, A., Brada, D. et Schekman, R. (1988) « A Membrane Glycoprotein, Sec12p, Required for Protein Transport from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Apparatus in Yeast », *The Journal of Cell Biology*, 107(September), p. 851-863.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A. et Chandu, D. (2006) « The ubiquitin-proteasome system », *J Biosci*, 31(March), p. 137-155. Disponible sur: <https://www.ias.ac.in/article/fulltext/jbsc/031/01/0137-0155>.
- Napolitano, G. et Ballabio, A. (2016) « TFEB at a glance », *Journal of Cell Science*, 129(13), p. 2475-2481. doi: 10.1242/jcs.146365.
- Ni, X. et Morales, C. R. (2006) « The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor », *Traffic*, 7(7), p. 889-902. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00429.x.
- van Niel, G., Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E. et Raposo, G. (2011) « The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis », *Developmental Cell*, 21(4), p. 708-721. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.

- Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B. et Zerial, M. (2000) « Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain », *Journal of Cell Biology*, 151(3), p. 601-612. doi: 10.1083/jcb.151.3.601.
- Nielsen, M. S., Gustafsen, C., Madsen, P., Nyengaard, J. R., Hermey, G., Bakke, O., Mari, M., Schu, P., Pohlmann, R., Dennes, A. et Petersen, C. M. (2007) « Sorting by the Cytoplasmic Domain of the Amyloid Precursor Protein Binding Receptor SorLA », *Molecular and Cellular Biology*, 27(19), p. 6842-6851. doi: 10.1128/mcb.00815-07.
- Nielsen, M. S., Madsen, P. et Petersen, C. M. (2001) « The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi – endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein Results Expression of chimeric receptors Endocytosis of chimeric receptors », *The EMBO Journal*, 20(9).
- Nishino, I. (2014) « Autophagic Vacuolar Myopathies », *Seminars in pediatric neurology*, (May). doi: 10.1007/s11910-003-0040-y.
- Nishino, I., Fu, J., Tanji, K., Yamada, T., Shimojo, S., Koori, T., Mora, M., Riggs, J. E., Oh, S. J., Koga, Y., Sue, C. M., Yamamoto, A., Murakami, N., Shanske, S., Byrne, E., Bonilla, E., Nonaka, I., Dimauro, S. et Hirano, M. (2000) « Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease) », *Nature*, 406(August), p. 462-465.
- Niu, T.-K., Pfeifer, A. C., Lippincott-Schwartz, J. et Jackson, C. L. (2005) « Dynamics of GBF1, a Brefeldint A-Sensitive Arf1 Exchange Factor at the Golgi », *Molecular Biology of the Cell*. doi: 10.1091/mbc.E04.
- Niwa, K., Tanaka, R., Murase, H., Ishikawa, T., Fujita, H., Himeno, M. et Tanaka, Y. (2003) « Two lysosomal membrane proteins, LGP85 and LGP107, are delivered to late endosomes/lysosomes through different intracellular routes after exiting from the trans-Golgi network », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(4), p. 833-840. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00046-9.
- Nixon-Abell, J., Obara, C. J., Weigel, A. V., Li, D., Legant, W. R., Xu, C. S., Pasolli, H. A., Harvey, K., Hess, H. F., Betzig, E., Blackstone, C. et Lippincott-Schwartz, J. (2016) « Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER », *Science*, 354(6311). doi: 10.1126/science.aaf3928.
- Obermüller, S., Kiecke, C., von Figura, K. et Höning, S. (2002) « The tyrosine motifs of Lamp 1 and LAP determine their direct and indirect targeting to lysosomes. », *Journal of cell science*, 115(Pt 1), p. 185-94. doi: 10.1074/jbc.m010591200.
- Ogata, S. et Fukuda, M. (1994) « Lysosomal targeting of limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu- Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail », *Journal of Biological Chemistry*, 269(7), p. 5210-5217.
- Orsel, J. G., Sincock, P. M., Krise, J. P. et Pfeffer, S. R. (2000) « Recognition of the 300-kDa mannose 6-phosphate receptor cytoplasmic domain by 47-kDa tail-interacting protein », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), p. 9047-9051. doi: 10.1073/pnas.160251397.
- De Pace, R., Skirzewski, M., Damme, M., Mattera, R., Mercurio, J., Foster, A. M., Cuitino, L., Jarnik, M., Hoffmann, V., Morris, H. D., Han, T. U., Mancini, G. M. S., Buonanno, A. et Bonifacino, J. S. (2018) « Altered distribution of ATG9A and accumulation of axonal aggregates in neurons from a mouse model of AP-4 deficiency syndrome », *PLoS Genetics*, 14(4), p. 1-30. doi: 10.1371/journal.pgen.1007363.
- Pak, Y., Glowacka, W. K., Bruce, M. C., Pham, N. et Rotin, D. (2006) « Transport of LAPTM5 to lysosomes requires association with the ubiquitin ligase Nedd4, but not LAPTM5 ubiquitination », *Journal of Cell Biology*, 175(4), p. 631-645. doi: 10.1083/jcb.200603001.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M. et Ballabio, A. (2011) « Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways », *Human Molecular Genetics*, 20(19), p. 3852-3866. doi: 10.1093/hmg/ddr306.
- Parnas, O., Jovanovic, M., Eisenhaure, T. M., Herbst, R. H., Dixit, A., Ye, C. J., Przybylski, D., Platt, R. J., Tirosh, I., Sanjana, N. E., Shalem, O., Satija, R., Raychowdhury, R., Mertins, P., Carr, S. A., Zhang, F., Hacohen, N. et Regev, A. (2016) « A genome-wide CRISPR screen in primary immune cells to dissect regulatory networks », *Cell*, 162(3), p. 675-686. doi: 10.1016/j.cell.2015.06.059.A.
- Patel, S. (2019) « Getting close. Lysosome-ER contact sites tailor Ca²⁺ signals », *Cell Calcium*. Elsevier, (February), p. 0-1. doi: 10.1016/j.ceca.2019.02.003.

- Patki, V., Virbasius, J., Lane, W. S., Toh, B.-H., Shpetner, H. S. et Corvera, S. (1997) « Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14), p. 7326-7330. doi: 10.1073/pnas.94.14.7326.
- Patterson, G. H., Hirschberg, K., Polishchuk, R. S., Gerlich, D. et Phair, R. D. (2008) « Transport through the Golgi Apparatus by Rapid Partitioning within a Two-Phase Membrane System », *Cell*, p. 1055-1067. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.044.
- Patwardhan, A., Bardin, S., Miserey-Lenkei, S., Larue, L., Goud, B., Raposo, G. et Delevoye, C. (2017) « Routing of the RAB6 secretory pathway towards the lysosome related organelle of melanocytes », *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/ncomms15835.
- Paul-Gilloteaux, P., Heiligenstein, X., Belle, M., Domart, M.-C., Larijani, B., Collinson, L., Raposo, G. et Samamero, J. (2017) « eC-CLEM : flexible multidimensional registration software for correlative microscopies », *Nat Methods*. doi: 10.1038/nmeth.4170.
- Peden, A. A., Oorschot, V., Hesser, B. A., Austin, C. D., Scheller, R. H. et Klumperman, J. (2004) « Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins », *Journal of Cell Biology*, 164(7), p. 1065-1076. doi: 10.1083/jcb.200311064.
- Perera, R. M. et Zoncu, R. (2016) « The Lysosome as a Regulatory Hub », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), p. 223-253. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125125.
- Perrimon, N., Kadowaki, T., Tanaka, K., Okabayashi, K. et Asashima, M. (2000) « The evolutionarily conserved porcupine family is involved in the processing of the Wnt family », *European Journal of Biochemistry*, 267(13), p. 4300-4311. doi: 10.1046/j.1432-1033.2000.01478.x.
- Perrin, L., Lacas-Gervais, S., Gilleron, J., Ceppo, F., Prodon, F., Benmerah, A., Tanti, J.-F. et Cormont, M. (2014) « Rab4b controls an early endosome sorting event by interacting with the β -subunit of the clathrin adaptor complex 1 », *Journal of Cell Science*, 127(1), p. 258-258. doi: 10.1242/jcs.145946.
- Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A. et von Figura, K. (1990) « Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes », *The EMBO Journal*, 9(1), p. 3497-3506.
- Petkovic, M., Jemaiel, A., Daste, F., Specht, C. G., Izeddin, I., Vorkel, D., Verbavatz, J. M., Darzacq, X., Triller, A., Pfenninger, K. H., Tareste, D., Jackson, C. L. et Galli, T. (2014) « The SNARE Sec22b has a non-fusogenic function in plasma membrane expansion », *Nature Cell Biology*, 16(5), p. 434-444. doi: 10.1038/ncb2937.
- Pfeffer, S. R. (2013) « Rab GTPase regulation of membrane identity », *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 25(4), p. 414-419. doi: 10.1016/j.ceb.2013.04.002.
- Pfeffer, S. R. et Rothman, J. E. (1987) « Biosynthetic Protein Transport and Sorting by the Endoplasmic Reticulum and Golgi », *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), p. 829-852. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004145.
- Phan, T. K., Williams, S. A., Bindra, G. K., Lay, F. T., Poon, I. K. H. et Hulett, M. D. (2019) « Phosphoinositides: multipurpose cellular lipids with emerging roles in cell death », *Cell Death and Differentiation*. Springer US, 26(5), p. 781-793. doi: 10.1038/s41418-018-0269-2.
- Pinho, S. S. et Reis, C. A. (2015) « Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications », *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 15(9), p. 540-555. doi: 10.1038/nrc3982.
- Podrez, E. A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R. L., Hajjar, D. P., Cohen, P. A., Frazier, W. A., Hoff, H. F. et Hazen, S. L. (2000) « Erratum: Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species (Journal of Clinical Investigation (2000) 105 (1095-1108)) », *Journal of Clinical Investigation*, 105(10), p. 1483.
- Pohlmann, R., Boeker, M. W. C. et von Figure, K. (1995) « The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins », *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), p. 27311-27318. doi: 10.1074/jbc.270.45.27311.
- Pols, M. S., Ten Brink, C., Gosavi, P., Oorschot, V. et Klumperman, J. (2013) « The HOPS Proteins hVps41 and hVps39 Are Required for Homotypic and Heterotypic Late Endosome Fusion », *Traffic*, 14(2), p. 219-232.

doi: 10.1111/tra.12027.

- Pols, M. S. et Klumperman, J. (2009) « Trafficking and function of the tetraspanin CD63 », *Experimental Cell Research*. Elsevier Inc., 315(9), p. 1584-1592. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020.
- Pols, M. S., van Meel, E., Oorschot, V., ten Brink, C., Fukuda, M., Swetha, M. G., Mayor, S. et Klumperman, J. (2013) « HVps41 and VAMP7 function in direct TGN to late endosome transport of lysosomal membrane proteins », *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4, p. 1312-1361. doi: 10.1038/ncomms2360.
- Pond, L., Kuhn, L. A., Teyton, L., Shutze, M.-P., Tainer, J. A., Jackson, M. R. et Peterson, P. A. (1995) « A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway », *The Journal of Biological Chemistry*, 270(August 25), p. 19989-19997.
- Posor, Y., Eichhorn-Gruenig, M., Puchkov, D., Schöneberg, J., Ullrich, A., Lampe, A., Müller, R., Zerbakhsh, S., Gulluni, F., Hirsch, E., Krauss, M., Schultz, C., Schmoranz, J., Noé, F. et Haucke, V. (2013) « Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4- bisphosphate », *Nature*, 499(7457), p. 233-237. doi: 10.1038/nature12360.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. et Spang, A. (2010) « Identification of the switch in early-to-late endosome transition », *Cell*. Elsevier Ltd, 141(3), p. 497-508. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.011.
- Potting, C., Crochemore, C., Moretti, F., Nigsch, F., Schmidt, I., Manneville, C., Carbone, W., Knehr, J., DeJesus, R., Lindeman, A., Maher, R., Russ, C., McAllister, G., Reece-Hoyes, J. S., Hoffman, G. R., Roma, G., Müller, M., Sailer, A. W. et Helliwell, S. B. (2018) « Genome-wide CRISPR screen for PARKIN regulators reveals transcriptional repression as a determinant of mitophagy », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(2), p. E180-E189. doi: 10.1073/pnas.1711023115.
- Pryor, P. R., Mullock, B. M., Bright, N. A., Gray, S. R. et Luzio, J. P. (2000) « The Role of Intraorganellar Ca²⁺ In Late Endosome–Lysosome Heterotypic Fusion and in the Reformation of Lysosomes from Hybrid Organelles », *The Journal of Cell Biology*, 149(5), p. 1053-1062. doi: 10.1083/jcb.149.5.1053.
- Pryor, P. R., Mullock, B. M., Bright, N. A., Lindsay, M. R., Gray, S. R., Richardson, S. C. W., Stewart, A., James, D. E., Piper, R. C. et Luzio, J. P. (2004) « Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events », *EMBO Reports*, 5(6), p. 590-595. doi: 10.1038/sj.embor.7400150.
- Przybyło, M., Martuszevska, D., Pocheć, E., Hoja-Łukowicz, D. et Lityńska, A. (2007) « Identification of proteins bearing β 1-6 branched N-glycans in human melanoma cell lines from different progression stages by tandem mass spectrometry analysis », *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(9), p. 1427-1435. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.05.006.
- Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J. et Bonifacio, J. S. (2001) « Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs », *Science*, 292(5522), p. 1712-1716. doi: 10.1126/science.1060750.
- Pusapati, G. V., Kong, J. H., Patel, B. B., Krishnan, A., Sagner, A., Kinnebrew, M., Briscoe, J., Aravind, L. et Rohatgi, R. (2018) « CRISPR Screens Uncover Genes that Regulate Target Cell Sensitivity to the Morphogen Sonic Hedgehog », *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 44(1), p. 113-129.e8. doi: 10.1016/j.devcel.2017.12.003.
- Qian, M., Sleat, D. E., Zheng, H., Moore, D. et Lobel, P. (2008) « Proteomics Analysis of Serum from Mutant Mice Reveals Lysosomal Proteins Selectively Transported by Each of the Two Mannose 6-Phosphate Receptors », *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(1), p. 58-70. doi: 10.1074/mcp.m700217-mcp200.
- Rabinowitz, B. S. S. et Gordon, S. (1991) « Macrosialin, a Macrophage-restricted Membrane Sialoprotein Differentially Glycosylated in Response to Inflammatory Stimuli », *J. Exp. Med.*, 174(October), p. 827-36.
- Rabouille, C. (2017) « Pathways of Unconventional Protein Secretion », *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 27(3), p. 230-240. doi: 10.1016/j.tcb.2016.11.007.
- Rabouille, C. et Linstedt, A. D. (2016) « GRASP: A Multitasking Tether », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(January), p. 1-8. doi: 10.3389/fcell.2016.00001.
- Radford, K. J., Thome, R. et Hersey, P. (1997) « Regulation of tumour cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line », *Melanoma Research*, 7(Supplement 1), p. S28. doi: 10.1097/00008390-199706001-00095.

- Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madhus, I. H., Stang, E. et Stenmark, H. (2002) « Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes », *Nature Cell Biology*, 4(5), p. 394-398. doi: 10.1038/ncb791.
- Raiborg, C., Grønvold Bache, K., Mehlum, A., Stang, E. et Stenmark, H. (2001) « Hrs recruits clathrin to early endosomes », *EMBO Journal*, 20(17), p. 5008-5021. doi: 10.1093/emboj/20.17.5008.
- Raiborg, C., Wenzel, E. M., Pedersen, N. M., Olsvik, H., Schink, K. O., Schultz, S. W., Vietri, M., Nisi, V., Bucci, C., Brech, A., Johansen, T. et Stenmark, H. (2015) « Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth », *Nature*, 520(7546), p. 234-238. doi: 10.1038/nature14359.
- Rao, S. K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T. et Andrews, N. W. (2004) « Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis », *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), p. 20471-20479. doi: 10.1074/jbc.M400798200.
- Rapoport, T. A. (2007) « Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes », *Nature*, 450(November), p. 663-669. doi: 10.1038/nature06384.
- Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S. et Goldstein, J. L. (1997) « Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs », *Molecular Cell*, 1(1), p. 47-57. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80006-4.
- Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Brondyk, W., Van Patten, S., Edmunds, T. et Saftig, P. (2007) « LIMP-2 Is a Receptor for Lysosomal Mannose-6-Phosphate-Independent Targeting of β -Glucocerebrosidase », *Cell*, 131(4), p. 770-783. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.018.
- Reddy, J. V., Burguee, A. S., Sridevi, K., Ganley, I. G., Nottingham, R. M. et Pfeffer, S. R. (2006) « A functional Role for the GCC185 Golgin in Mannose 6-Phosphate Receptor Recycling », *Molecular biology of the cell*, 17, p. 4353-4363.
- Rigotti, A., Acton, S. L. et Krieger, M. (1995) « The Class B Scavenger Receptors SR-BI and CD36 Are Receptors for Anionic Phospholipids », *The Journal of Biological Chemistry*, 270, p. 16221-16224.
- Ringstad, N., Gad, H., Löw, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O. et De Camilli, P. (1999) « Endophilin/sh3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis », *Neuron*, 24(1), p. 143-154. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80828-4.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. et Zerial, M. (2005) « Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes », *Cell*, 122(5), p. 735-749. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.043.
- Rivera, V. M., Wang, X., Wardwell, S., Courage, N. L., Volchuk, A., Keenan, T., Holt, D. A., Gilman, M., Orci, L., Cerasoli, F., Rothman, J. E. et Clackson, T. (2000) « Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum », *Science*, 287(5454), p. 826-830. doi: 10.1126/science.287.5454.826.
- Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M. et Rios, R. M. (2009) « Microtubule nucleation at the cis-side of the golgi apparatus requires AKAP450 and GM130 », *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 28(8), p. 1016-1028. doi: 10.1038/emboj.2009.47.
- Rizo, J. et Südhof, T. C. (2012) *The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices—Guilty as Charged?*, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155818.
- Robinson, M. S. (2004) « Adaptable adaptors for coated vesicles », *Trends in Cell Biology*, 14(4), p. 167-174. doi: 10.1016/j.tcb.2004.02.002.
- Robinson, M. S., Sahlender, D. A. et Foster, S. D. (2009) « Rapid Inactivation of Proteins by Rapamycin-Induced Rerouting to Mitochondria », *Developmental Cell*. Elsevier, 18(2), p. 324-331. doi: 10.1016/j.devcel.2009.12.015.
- Rojas, A. M., Fuentes, G., Rausell, A. et Valencia, A. (2012) « The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids », *Journal of Cell Biology*, 196(2), p. 189-201. doi: 10.1083/jcb.201103008.
- Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A., Prabhu, Y., Rojas, A. L., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Raposo, G., Van Der Sluijs, P. et Bonifacio, J. S. (2008) « Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential

- action of Rab5 and Rab7 », *Journal of Cell Biology*, 183(3), p. 513-526. doi: 10.1083/jcb.200804048.
- Rong, Y., Liu, M., Ma, L., Du, W., Zhang, H., Tian, Y., Cao, Z., Li, Y., Ren, H., Zhang, C., Li, L., Chen, S., Xi, J. et Yu, L. (2012) « Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation », *Nature Cell Biology*, 14(9), p. 924-934. doi: 10.1038/ncb2557.
- Ross, B. H., Lin, Y., Corales, E. A., Burgos, P. V. et Mardones, G. A. (2014) « Structural and functional characterization of cargo-binding sites on the μ 4-subunit of adaptor protein complex 4 », *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0088147.
- Roth, S. et Heintzmann, R. (2016) « Optical photon reassignment with increased axial resolution by structured illumination », *Methods and Applications in Fluorescence*. IOP Publishing, 4(4), p. 045005. doi: 10.1088/2050-6120/4/4/045005.
- Rous, B. A., Reaves, B. J., Ihrke, G., Briggs, J. A. G., Gray, S. R., Stephens, D. J., Banting, G. et Luzio, J. P. (2002) « Role of Adaptor Complex AP-3 in Targeting Wild- Type and Mutated CD63 to Lysosomes », *Molecular Biology of the Cell*, 13(March), p. 1071-1082. doi: 10.1091/mbc.01.
- Rubinstein, E., Naour, F. Le, Lagaudrière-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H. et Boucheix, C. (1996) « CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins », *European Journal of Immunology*, 26(11), p. 2657-2665. doi: 10.1002/eji.1830261117.
- Ruggiano, A., Foresti, O. et Carvalho, P. (2014) « ER-associated degradation : Protein quality control and beyond », *The Journal of Cell Biology*, 204(6), p. 869-879. doi: 10.1083/jcb.201312042.
- Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M. C., Goody, R. et Zerial, M. (1996) « GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion », *Nature*.
- Sachse, M., Ramm, G., Strous, G. et Klumperman, J. (2002) « Endosomes: Multipurpose designs for integrating housekeeping and specialized tasks », *Histochemistry and Cell Biology*, 117(2), p. 91-104. doi: 10.1007/s00418-001-0348-0.
- Sachse, M., Urbé, S., Oorschot, V., Strous, G. J. et Klumperman, J. (2002) « Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes », *Molecular Biology of the Cell*, 13(April), p. 1313-1328.
- Saftig, P. et Klumperman, J. (2009) « Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10(9), p. 623-635. doi: 10.1038/nrm2745.
- de Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Aït-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M. G., Banchereau, J., Zurawski, S., Davoust, J., Caux, C. et Lebecque, S. (1998) « A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment », *Immunity*, 9(3), p. 325-336. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80615-9.
- Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R. et Malhotra, V. (2009) « TANGO1 Facilitates Cargo Loading at Endoplasmic Reticulum Exit Sites », *Cell*. Elsevier Ltd, 136(5), p. 891-902. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.025.
- Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K. et Malhotra, V. (2011) « cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites », *Molecular Biology of the Cell*, 22. doi: 10.1091/mbc.E11-02-0143.
- Saitoh, O., Wang, W. C., Lotan, R. et Fukuda, M. (1992) « Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials », *Journal of Biological Chemistry*, 267(8), p. 5700-5707.
- Salaun, B., de Saint-Vis, B., Pacheco, N., Pacheco, Y., Riesler, A., Isaac, S., Leroux, C., Clair-Moninot, V., Pin, J. J., Griffith, J., Treilleux, I., Goddard, S., Davoust, J., Kleijmeer, M. et Lebecque, S. (2004) « CD208/Dendritic Cell-Lysosomal Associated Membrane Protein Is a Marker of Normal and Transformed Type II Pneumocytes », *American Journal of Pathology*, 164(3), p. 861-871. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63174-4.
- Salvador, N., Aguado, C., Horst, M. et Knecht, E. (2000) « Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state », *Journal of Biological Chemistry*, 275(35),

- p. 27447-27456. doi: 10.1074/jbc.M001394200.
- Salvarezza, S. B., Deborde, S., Schreiner, R., Campagne, F., Kessels, M. M., Qualmann, B., Caceres, A., Kreitzer, G. et Rodriguez-Boulán, E. (2009) « LIM Kinase 1 and Cofilin Regulate Actin Filament Population Required for Dynamin-dependent Apical Carrier Fission from the Trans-Golgi Network », *Molecular Biology of the Cell*, 20, p. 3533-3542. doi: 10.1091/mbc.E08.
- San Pietro, E., Capestrano, M., Polishchuk, E. V., DiPentima, A., Trucco, A., Zizza, P., Mariggì, S., Pulvirenti, T., Sallese, M., Tete, S., Mironov, A. A., Leslie, C. C., Corda, D., Luini, A. et Polishchuk, R. S. (2009) « Group IV phospholipase A2 α controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-golgi transport », *PLoS Biology*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pbio.1000194.
- Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., Noriega, A. G., Vandekerckhove, J., Jimenez, M. A. et Rico, M. (1994) « The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes », *Journal of Biological Chemistry*, 269(9), p. 6622-6631.
- Sandoval, I. V., Martínez-Arca, S., Valdueza, J., Palacios, S. et Holman, G. D. (2000) « Distinct reading of different structural determinants modulates the dileucine-mediated transport steps of the lysosomal membrane protein LIMP II and the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4 », *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), p. 39874-39885. doi: 10.1074/jbc.M006261200.
- Sarafian, V., Jadot, M., Foidart, J. M., Letesson, J. J., Van den Brùle, F., Castrunovo, V., Wattiaux, R. et Wattiaux De Coninck, S. (1998) « Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells », *International Journal of Cancer*, 75(1), p. 105-111. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980105)75:1<105::AID-IJC16>3.0.CO;2-F.
- Saraste, J. et Kuismanen, E. (1984) « Pre- and Post-Golgi Vacuoles Operate in the Transport of Semliki Forest Virus Membrane Glycoproteins to the Cell Surface », *Cell*.
- Sato, M., Yoshimura, S., Hirai, R., Goto, A., Kunii, M., Atik, N., Sato, T., Sato, K., Harada, R., Shimada, J., Hatabu, T., Yorifuji, H. et Harada, A. (2011) « The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo », *Traffic*, 12(10), p. 1383-1393. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01247.x.
- Sato, T., Mushiaki, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R. et Harada, A. (2007) « The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells », *Nature*, 448(7151), p. 366-369. doi: 10.1038/nature05929.
- Sauer, G., Kurzeder, C., Grundmann, R., Kreienberg, R., Zeillinger, R. et Deissler, H. (2003) « Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells », *Oncol Rep*.
- Sawada, R., Lowe, J. B. et Fukuda, M. (1993) « E-selectin-dependent adhesion efficiency of colonic carcinoma cells is increased by genetic manipulation of their cell-surface lamp-1 expression levels », *The Journal of Biological Chemistry*, 268, p. 12676-126821.
- Sawada, R., Tsuboi, S. et Fukuda, M. (1994) « Differential E-selectin-dependent adhesion efficiency in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials », *Journal of Biological Chemistry*, 269(2), p. 1425-1431.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. et Cardona, A. (2012) « Fiji: an open-source platform for biological-image analysis », *Nature Methods*, 9(7). doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schink, K. O., Tan, K.-W. et Stenmark, H. (2016) « Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics », *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), p. 143-171. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125349.
- Schmoll, M., Dattenböck, C., Carreras-Villaseñor, N., Mendoza-Mendoza, A., Tisch, D., Alemán, M. I., Baker, S. E., Brown, C., Cervantes-Badillo, M. G., Cetz-Chel, J., Cristobal-Mondragon, G. R., Delaye, L., Esquivel-Naranjo, E. U., Frischmann, A., Gallardo-Negrete, J. D. J., García-Esquivel, M., Gomez-Rodriguez, E. Y., Greenwood, D. R., Hernández-Oñate, M., Kruszewska, J. S., Lawry, R., Mora-Montes, H. M., Muñoz-Centeno, T., Nieto-Jacobo, M. F., Lopez, N., Olmedo-Monfil, V., Osorio-Concepcion, M., Piłsyk, S., Pomraning, K. R., Rodriguez-

- Iglesias, A., Rosales-Saavedra, M. T., Sánchez-Arreguín, J. A., Seidl-Seiboth, V., Stewart, A., Uresti-Rivera, E. E., Wang, C., Wang, T., Zeilinger, S., Casas-Flores, S. et Herrera-Estrella, A. (2016) « The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), p. 205-327. doi: 10.1128/MMBR.00040-15.Address.
- Schöneberg, J., Lee, I. H., Iwasa, J. H. et Hurley, J. H. (2016) « Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 18(1), p. 5-17. doi: 10.1038/nrm.2016.121.
- Schöneberg, J., Lehmann, M., Ullrich, A., Posor, Y., Lo, W.-T., Lichtner, G., Schmoranzner, J., Haucke, V. et Noé, F. (2017) « Lipid-mediated PX-BAR domain recruitment couples local membrane constriction to endocytic vesicle fission. », *Nature communications*, 8(May), p. 15873. doi: 10.1038/ncomms15873.
- Schröder, B. A., Wrocklage, C., Hasilik, A. et Saftig, P. (2010) « The proteome of lysosomes », *Proteomics*, 10(22), p. 4053-4076. doi: 10.1002/pmic.201000196.
- Schröder, B., Wrocklage, C., Pan, C., Jäger, R., Kösters, B., Schäfer, H., Elsässer, H. P., Mann, M. et Hasilik, A. (2007) « Integral and associated lysosomal membrane proteins », *Traffic*, 8(12), p. 1676-1686. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00643.x.
- Schwake, M., Schröder, B. et Saftig, P. (2013) « Lysosomal Membrane Proteins and Their Central Role in Physiology », *Traffic*, 14(7), p. 739-748. doi: 10.1111/tra.12056.
- Schwarz, D. S. et Blower, M. D. (2016) « The endoplasmic reticulum : structure, function and response to cellular signaling », *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer Basel, 73(1), p. 79-94. doi: 10.1007/s00018-015-2052-6.
- Scott, C. C., Vacca, F. et Gruenberg, J. (2014) « Endosome maturation, transport and functions », *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 31, p. 2-10. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.034.
- Seachrist, J. L., Anborgh, P. H. et Ferguson, S. S. G. (2000) « β 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by Rab GTPases », *Journal of Biological Chemistry*, 275(35), p. 27221-27228. doi: 10.1074/jbc.M003657200.
- Seaman, M. N. J. (2004) « Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer », *Journal of Cell Biology*, 165(1), p. 111-122. doi: 10.1083/jcb.200312034.
- Seaman, M. N. J. (2007) « Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval », *Journal of Cell Science*, 120(14), p. 2378-2389. doi: 10.1242/jcs.009654.
- Seaman, M. N. J. (2012) « The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond », *Journal of Cell Science*, 125(20), p. 4693-4702. doi: 10.1242/jcs.103440.
- Seaman, M. N. J., Harbour, M. E., Tattersall, D., Read, E. et Bright, N. (2009) « Membrane recruitment of the cargo-selective retromer subcomplex is catalysed by the small GTPase Rab7 and inhibited by the Rab-GAP TBC1D5 », *Journal of Cell Science*, 122(14), p. 2371-2382. doi: 10.1242/jcs.048686.
- Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Toure, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.-C., Lazure, C., Murphy, R. A., Chretien, M. et Marcinkiewicz, M. (1999) « Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), p. 1321-1326. doi: 10.1073/pnas.96.4.1321.
- Seong, E., Wainer, B., Hughes, E., Saunders, T., Burmeister, M. et Faundez, V. (2005) « Genetic Analysis of the Neuronal and Ubiquitous AP-3 Adaptor Complexes Reveals Divergent Functions in Brain », *Molecular Biology of the Cell*.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Arcimbini, M. G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C. et Ballabio, A. (2011) « TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis », *Science*, 332(6036), p. 1429-1433. doi: 10.1126/science.1204592.
- Settembre, C. et Medina, D. L. (2015) *TFEB and the CLEAR network*, *Methods in Cell Biology*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/bs.mcb.2014.11.011.
- Sheff, D. R., Daro, E. a, Hull, M. et Mellman, I. (1999) « The Receptor Contains Two Distinct of Recycling Pathway Populations with Different Functions Early Endosomes Sorting », *The Journal of Cell Biology*, 145, p.

- Shiba, T., Kametaka, S., Kawasaki, M., Shibata, M., Waguri, S., Uchiyama, Y. et Wakatsuki, S. (2004) « Insights into the phosphoregulation of β -secretase sorting signal by the VHS domain of GGA1 », *Traffic*, 5(6), p. 437-448. doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00188.x.
- Shiba, T., Nogi, T., Matsugaki, N., Kawasaki, M., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Wakatsuki, S., Takatsu, H., Nakayama, K. et Earnest, T. (2002) « Structural basis for recognition of acidic-cluster dileucine sequence by GGA1 », *Nature*, 415(6874), p. 937-941. doi: 10.1038/415937a.
- Shinozaki-Narikawa, N., Kodama, T. et Shibasaki, Y. (2006) « Cooperation of phosphoinositides and BAR domain proteins in endosomal tubulation », *Traffic*, 7(11), p. 1539-1550. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00480.x.
- Shorter, J., Beard, M. B., Seemann, J., Dirac-svejstrup, A. B. et Warren, G. (2002) « Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115 », *Journal of Cell Biology*, p. 45-62. doi: 10.1083/jcb.200112127.
- Simmen, T., Schmidt, A., Hunziker, W. et Beermann, F. (1999) « The tyrosinase tail mediates sorting to the lysosomal compartment in MDCK cells via a di-leucine and a tyrosine-based signal », *Journal of Cell Science*, 53, p. 45-53.
- Simonetti, B., Danson, C. M., Heesom, K. J. et Cullen, P. J. (2017) « Sequence-dependent cargo recognition by SNX-BARs mediates retromer-independent transport of CI-MPR », *Journal of Cell Biology*, 216(11), p. 3695-3712. doi: 10.1083/jcb.201703015.
- Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.-M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.-H., Murphy, C., Zerial, M. et Stenmark, H. (1998) « EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion », *Nature*, 392(April), p. 941-945.
- Skrzyny, M., Brach, T., Ciuffa, R., Rybina, S., Wachsmuth, M. et Kaksonen, M. (2012) « Molecular basis for coupling the plasma membrane to the actin cytoskeleton during clathrin-mediated endocytosis », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(38), p. E2533-E2542. doi: 10.1073/pnas.1207011109.
- Skubitz, N. (2019) « CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. », *The Journal of Immunology*.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Mâle, P., Goud, B. et Mellman, I. (1992) « The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway », *Cell*, 70(5), p. 729-740. doi: 10.1016/0092-8674(92)90307-X.
- Sohar, I., Sleat, D., Liu, C.-G., Ludwig, T. et Lobel, P. (1998) « Mouse mutants lacking the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor are impaired in lysosomal enzyme transport: comparison of cation-independent and cation-dependent mannose 6-phosphate receptor-deficient mice », *Biochemical Journal*, 330(2), p. 903-908. doi: 10.1042/bj3300903.
- Sönnichsen, B., Rietdorf, J., de Renzis, S., Nielsen, E. et Zerial, M. (2000) « Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11 », *The Journal of Cell Biology*, 149(4), p. 901-914. doi: 10.1083/jcb.149.4.901.
- Sordat, I., Decraene, C., Silvestre, T., Petermann, O., Auffray, C., Piétu, G. et Sordat, B. (2002) « Complementary DNA arrays identify CD63 tetraspanin and $\alpha 3$ integrin chain as differentially expressed in low and high metastatic human colon carcinoma cells », *Laboratory Investigation*, 82(12), p. 1715-1724. doi: 10.1097/01.LAB.0000044350.18215.0D.
- Sosa, M. a, Schmidt, B., von Figura, K. et Hille-Rehfeld, A. (1993) « In vitro binding of plasma membrane-coated vesicles adaptators to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. », *J. Biol. Chem.*, 268, p. 12537-12543.
- Spang, A. (2016) « Membrane Tethering Complexes in the Endosomal System », *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(May), p. 1-7. doi: 10.3389/fcell.2016.00035.
- Sprangers, J. et Rabouille, C. (2015) « SEC16 in COPII coat dynamics at ER exit sites », *The Dynamic Cell*, p. 97-103. doi: 10.1042/BST20140283.
- Stanley, P. (2011) « Golgi glycosylation », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), p. 1-13. doi: 10.1101/cshperspect.a005199.

- Starcevic, M., Nazarian, R. et Dell'Angelica, E. C. (2002) « The molecular machinery for the biogenesis of lysosome-related organelles: lessons from Hermansky-Pudlak syndrome », *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 13(3), p. 243–249. doi: 10.1016/S1084.
- Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas, E. C., Bell, A. J., Heesom, K. J., Tavaré, J. M. et Cullen, P. J. (2013) « A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport », *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(5), p. 461-471. doi: 10.1038/ncb2721.
- Stenmark, H. (2009) « Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic », *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 10(8), p. 513-525. doi: 10.1038/nrm2728.
- Stick, R. V et Williams, S. J. (2009) *Carbohydrates: the Essential Molecules of Life*. 2nd Editio. Édité par Elsevier. doi: 10.1071/ch09202_br.
- Stinchcombe, J., Bossi, G. et Griffiths, G. M. (2004) « Linking Albinism and Immunity : The Secrets of », *Science*, 305(July), p. 55-59.
- Stöckli, J., Höning, S. et Rohrer, J. (2004) « The acidic cluster of the CK2 site of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor (CD-MPR) but not its phosphorylation is required for GGA1 and AP-1 binding », *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), p. 23542-23549. doi: 10.1074/jbc.M313525200.
- Stoorvogel, W., Strous, G. J., Geuze, H. J., Oorschot, V. et Schwartz, A. L. (1991) « Late endosomes derive from early endosomes by maturation », *Cell*, 65(3), p. 417-427. doi: 10.1016/0092-8674(91)90459-C.
- Storch, S. et Bräulke, T. (2001) « Multiple C-terminal Motifs of the 46-kDa Mannose 6-Phosphate Receptor Tail Contribute to Efficient Binding of Medium Chains of AP-2 and AP-3 », *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), p. 4298-4303. doi: 10.1074/jbc.M005548200.
- Storch, S., Pohl, S. et Bräulke, T. (2004) « A dileucine motif and a cluster of acidic amino acids in the second cytoplasmic domain of the batten disease-related CLN3 protein are required for efficient lysosomal targeting », *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), p. 53625-53634. doi: 10.1074/jbc.M410930200.
- Tabuchi, M., Yanatori, I., Kawai, Y. et Kishi, F. (2010) « Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1 », *Journal of Cell Science*, 123(5), p. 756-766. doi: 10.1242/jcs.060574.
- Tabuchi, N., Akasaki, K. et Tsuji, H. (2000) « Two acidic amino acid residues, Asp(470) and Glu(471), contained in the carboxyl cytoplasmic tail of a major lysosomal membrane protein, LAMP2/LIMP II, are important for its accumulation in secondary lysosomes », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(2), p. 557-563. doi: 10.1006/bbrc.2000.2448.
- Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. et Nakayama, K. (2002) « GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors », *Biochemical Journal*, 365(2), p. 369-378. doi: 10.1042/bj20020428.
- Takei, K., Slepnev, V. I., Haucke, V. et De Camilli, P. (1999) « Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis », *Nature Cell Biology*, 1(1), p. 33-39. doi: 10.1038/9004.
- Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M. et Sato, H. (2003) « Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(1), p. 160-166. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00544-8.
- Tanaka, K., Kitagawa, Y. et Kadowaki, T. (2002) « Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum », *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), p. 12816-12823. doi: 10.1074/jbc.M200187200.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E., Hartmann, D., Lu, R., Janssen, P. M. L., Blanz, J., von Figura, K. et Saftig, P. (2000) « Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice », *Nature*, 406(August), p. 2-6.
- Temkin, P., Lauffer, B., Jäger, S., Cimermancic, P., Krogan, N. J. et von Zastrow, M. (2011) « SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors », *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(6), p. 715-723. doi: 10.1038/ncb2252.
- Terasawa, K., Tomabechi, Y., Ikeda, M., Ehara, H., Kukimoto-Niino, M., Wakiyama, M., Podyma-Inoue, K. A.,

- Rajapakshe, A. R., Watabe, T., Shirouzu, M. et Hara-Yokoyama, M. (2016) « Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes », *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 479(3), p. 489-495. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.093.
- Theos, A. C., Martina, A., Hurbain, I., Peden, A. A., Sviderskaya, E. V., Stewart, A., Robinson, M. S., Bennett, D. C., Cutler, D. F., Bonifacino, J. S. et Marks, M. S. (2005) « Functions of Adaptor Protein (AP) -3 and AP-1 in Tyrosinase Sorting from Endosomes to Melanosomes □ », *Molecular biology of the cell*, 16(November), p. 5356-5372. doi: 10.1091/mbc.E05.
- Theos, A. C., Truschel, S. T., Tenza, D., Hurbain, I., Harper, D. C., Berson, J. F., Thomas, P. C., Raposo, G. et Marks, M. S. (2006) « A luminal domain-dependent pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis », *Developmental Cell*, 10(3), p. 343-354. doi: 10.1016/j.devcel.2006.01.012.
- Tie, H. C., Ludwig, A., Sandin, S. et Lu, L. (2018) « The spatial separation of processing and transport functions to the interior and periphery of the Golgi stack », *eLife*, 7, p. 1-26. doi: 10.7554/elife.41301.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B. et Simons, M. (2008) « Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes », *Science*, 319(5867), p. 1244-1247. doi: 10.1126/science.1153124.
- Traub, L. M. et Bonifacino, J. S. (2013) « Cargo recognition in clathrin-mediated endocytosis », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), p. 1-23. doi: 10.1101/cshperspect.a016790.
- Traub, L. M., Kornfeld, S. et Ungewickell, E. (1995) « Different Domains of AP-1 Adaptor Complex Are Required for Golgi Membrane Binding and Clathrin Recruitment », *The Journal of Biological Chemistry*.
- Trucco, A., Polischuck, R. S., Martella, O., Di Pentima, A., Fusella, A., Di Giandomenico, D., San Pietro, E., Beznoussenko, G. V., Polischuk, E. V., Baldassarre, M., Buccione, R., Geerts, W. J. C., Koster, A. J., Burger, K. N. J., Mironov, A. A. et Luini, A. (2004) « Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments », *Nature Cell Biology*, 6(11), p. 1071-1081. doi: 10.1038/ncb1180.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M. et Parton, R. G. (1996) « Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome », *Journal of Cell Biology*, 135(4), p. 913-924. doi: 10.1083/jcb.135.4.913.
- Ungewickell, E. (1985) « The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles. », *The EMBO journal*, 4(13A), p. 3385-91. doi: 10.1002/j.1460-2075.1985.tb04094.x.
- Urbe, S., Sachse, M., Row, P. E., Preisinger, C., Barr, F. A., Strous, G., Klumperman, J. et Clague, M. J. (2003) « The UIM domain of Hrs couples receptor sorting to vesicle formation », *Journal of Cell Science*, 116(20), p. 4169-4179. doi: 10.1242/jcs.00723.
- Vanlandingham, P. A. et Ceresa, B. P. (2009) « Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration », *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), p. 12110-12124. doi: 10.1074/jbc.M809277200.
- Vedrenne, C., Klopfenstein, D. R. et Hauri, H.-P. (2005) « Phosphorylation Controls CLIMP-63-mediated Anchoring of the Endoplasmic Reticulum to Microtubules », *Molecular Biology of the Cell*, 16(April), p. 1928-1937. doi: 10.1091/mbc.E04.
- Vega, M. A., Rodriguez, F., Segui, B., Calés, C., Alcalde, J. et Sandoval, I. V (1991) « Targeting of Lysosomal Integral Membrane Protein LIMP II », *The Journal of Biological Chemistry*, p. 16269-16272.
- Vergarajauregui, S. et Puertollano, R. (2006) « Two di-leucine motifs regulate trafficking of mucolipin-1 to lysosomes », *Traffic*, 7(3), p. 337-353. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00387.x.
- Vonderheit, A. et Helenius, A. (2005) « Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes », *PLoS Biology*, 3(7), p. 1225-1238. doi: 10.1371/journal.pbio.0030233.
- Voorhees, P., Deignan, E., van Donselaar, E., Humphrey, J., Marks, M. S., Peters, P. J. et Bonifacino, J. S. (1995) « An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of trans-Golgi network localization and internalization from the cell surface. », *The EMBO Journal*, 14(20), p. 4961-4975.

doi: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00179.x.

- Waheed, A., Gottschalk, S., Hille, A., Krentler, C., Pohlmann, R., Braulke, T., Hauser, H., Geuze, H. et von Figura, K. (1988) « Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. », *The EMBO Journal*, 7(8), p. 2351-2358. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03079.x.
- Wakana, Y., Van Galen, J., Meissner, F., Scarpa, M., Polishchuk, R. S., Mann, M. et Malhotra, V. (2012) « A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface », *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 31(20), p. 3976-3990. doi: 10.1038/emboj.2012.235.
- Wandinger-Ness, A. et Zerial, M. (2014) « Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal system », *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(11), p. 1-25. doi: 10.1101/cshperspect.a016162.
- Wang, H., Lo, W. T. et Haucke, V. (2019) « Phosphoinositide switches in endocytosis and in the endolysosomal system », *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 59, p. 50-57. doi: 10.1016/j.ceb.2019.03.011.
- Wang, Q., Navarro, M. V. A. S., Peng, G., Molinelli, E., Lin Goh, S., Judson, B. L., Rajashankar, K. R. et Sonderrmann, H. (2009) « Molecular mechanism of membrane constriction and tubulation mediated by the F-BAR protein Pacsin/Syndapin », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), p. 12700-12705. doi: 10.1073/pnas.0902974106.
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G. et Yin, H. L. (2003) « Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi », *Cell*, 114(3), p. 299-310. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00603-2.
- Ward, D. M., Pevsner, J., Scullion, M. A., Vaughn, M. et Kaplan, J. (2000) « Syntaxin 7 and VAMP-7 are Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Factor Attachment Protein Receptors Required for Late Endosome-Lysosome and Homotypic Lysosome Fusion in Alveolar Macrophages », *Molecular Biology of the Cell*, 11(7), p. 2327-2333. doi: 10.1091/mbc.11.7.2327.
- Wassmer, T., Attar, N., Bujny, M. V., Oakley, J., Traer, C. J. et Cullen, P. J. (2006) « A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer », *Journal of Cell Science*, 120(1), p. 45-54. doi: 10.1242/jcs.03302.
- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. et Stelzer, E. H. (1999) « Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells.[erratum appears in J Cell Biol 2000 Jan 10;148(1):followi] », *Journal of Cell Biology*, 147(4), p. 743-760.
- Wilke, S., Krausze, J. et Büssow, K. (2012) « Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: Implications for the lysosomal glycocalyx », *BMC Biology*, 10. doi: 10.1186/1741-7007-10-62.
- Williams, M. A. et Fukuda, M. (1990) « Accumulation of Membrane Glycoproteins in Lysosomes Requires a Tyrosine Residue at a Particular Position in The Cytoplasmic Tail », *The Journal of Cell Biology*, 111(September), p. 955-966.
- Wilson, D. S., Keefe, A. D. et Szostak, J. W. (2001) « The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), p. 3750-3755. doi: 10.1073/pnas.061028198.
- Wise, R. J., Barrt, P. J., Wongt, P. A., Kiefert, M. C., Braket, A. J. et Kaufman, R. J. (1990) « Expression of a human proprotein processing enzyme: Correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site (paired basic amino acid cleaving enzyme/furin/propeptide cleavage/endopeptidase/COS cell expression) », *Biochemistry*, 87(December), p. 9378-9382.
- Wong, M. et Munro, S. (2014) « The specificity of vesicle traffic to the Golgi is encoded in the golgin coiled-coil proteins », *Science*, 346(6209). doi: 10.1126/science.1256898.
- Wu, B. et Guo, W. (2015) « The Exocyst at a Glance », *Journal of Cell Science*, 128(16), p. 2957-2964. doi: 10.1242/jcs.156398.
- Wurmser, A. E., Sato, T. K., Emr, S. D. et Vam, V. (2000) « New Component of the Vacuolar Class C-Vps Complex Couples Nucleotide Exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent Docking and Fusion », *The Journal*

of *Cell Biology*, 151(3), p. 551-562.

- Yamamoto, H., Awada, C., Hanaki, H., Sakane, H., Tsujimoto, I., Takahashi, Y., Takao, T. et Kikuchi, A. (2013) « The apical and basolateral secretion of Wnt11 and Wnt3a in polarized epithelial cells is regulated by different mechanisms », *Journal of Cell Science*, 126(13), p. 2931-2943. doi: 10.1242/jcs.126052.
- Yamayoshi, S., Fujii, K., Koike, S., Iizuka, S., Yamashita, T., Minagawa, H., Mizuta, K., Okamoto, M., Nishimura, H., Sanjoh, K., Katsushima, N., Itagaki, T. et Nagai, Y. (2012) « Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71 », *Journal of Virology*, 86(10), p. 5686-5696. doi: 10.1128/JVI.00020-12.
- Yamayoshi, S., Yamashita, Y., Li, J., Hanagata, N., Minowa, T., Takemura, T. et Koike, S. (2009) « Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71 », *Nature Medicine*, 15(7), p. 798-801. doi: 10.1038/nm.1992.
- Yap, C. C., Murate, M., Kishigami, S., Muto, Y., Kishida, H., Hashikawa, T. et Yano, R. (2003) « Adaptor protein complex-4 (AP-4) is expressed in the central nervous system neurons and interacts with glutamate receptor $\delta 2$ », *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(2), p. 283-295. doi: 10.1016/S1044-7431(03)00164-7.
- Yeaman, C., Ayala, M. I., Wright, J. R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W. J. et Malhotra, V. (2004) « Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network », *Nature Cell Biology*, 6(2), p. 106-112. doi: 10.1038/ncb1090.
- York, S. J., Arneson, L. S., Walter, T., Dahms, N. M., Chem, J. B., Gregory, W. T. et Kornfeld, S. (1999) « The Rate of Internalization of the Mannose 6-Phosphate / Insulin-like Growth Factor II Receptor Is Enhanced by Multivalent Ligand Binding », *The Journal of Biological Chemistry*, 274(2), p. 1164-1171.
- Yoshida, T., Kawano, Y., Sato, K., Ando, Y., Aoki, J., Miura, Y., Komano, J., Tanaka, Y. et Koyanagi, Y. (2008) « A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane », *Traffic*, 9(4), p. 540-558. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00700.x.
- Yoshida, Y., Yasuda, S., Fujita, T., Hamasaki, M., Murakami, A., Kawawaki, J., Iwai, K., Saeki, Y., Yoshimori, T., Matsuda, N. et Tanaka, K. (2017) « Ubiquitination of exposed glycoproteins by SCFFBXO27 directs damaged lysosomes for autophagy », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(32), p. 8574-8579. doi: 10.1073/pnas.1702615114.
- Yoshimura, S., Gerondopoulos, A., Linford, A., Rigden, D. J. et Barr, F. A. (2010) « Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors », *The Journal of Cell Biology*, 191(2), p. 367-381. doi: 10.1083/jcb.201008051.
- Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D. W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E. H. et Lenardo, M. J. (2010) « Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR », *Nature*, 465(7300), p. 942-946. doi: 10.1038/nature09076.
- Yu, S., Satoh, A., Pypaert, M., Mullen, K., Hay, J. C. et Ferro-Novick, S. (2006) « mBet3p is required for homotypic COPII vesicle tethering in mammalian cells », *Journal of Cell Biology*, 174(3), p. 359-368. doi: 10.1083/jcb.200603044.
- Zachos, C., Blanz, J., Saftig, P. et Schwake, M. (2012) « A Critical Histidine Residue Within LIMP-2 Mediates pH Sensitive Binding to Its Ligand β -Glucocerebrosidase », *Traffic*, 13(8), p. 1113-1123. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01372.x.
- Zaremba, S. et Keen, J. H. (1983) « Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats », *Journal of Cell Biology*, 97(5 I), p. 1339-1347. doi: 10.1083/jcb.97.5.1339.
- Zhang, X., Wang, L., Lak, B., Li, J., Jokitalo, E. et Wang, Y. (2018) « GRASP55 Senses Glucose Deprivation through O-GlcNAcylation to Promote Autophagosome-Lysosome Fusion », *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 45(2), p. 245-261.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2018.03.023.
- Zhao, L., Liu, P., Boncompain, G., Loos, F., Lachkar, S., Bezu, L., Chen, G., Zhou, H., Perez, F., Kepp, O. et Kroemer, G. (2018) « Identification of pharmacological inhibitors of conventional protein secretion », *Scientific Reports*. Springer US, 8(1), p. 1-11. doi: 10.1038/s41598-018-33378-y.

- Zhao, Y. G. et Zhang, H. (2019) « Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes », *Journal of Cell Biology*, 218(3), p. 757-770. doi: 10.1083/jcb.201810099.
- Zhao, Y., Ren, J., Padilla-Parra, S., Fry, E. E. et Stuart, D. I. (2014) « Lysosome sorting of β -glucocerebrosidase by LIMP-2 is targeted by the mannose 6-phosphate receptor », *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, p. 1-12. doi: 10.1038/ncomms5321.
- Zheng, L., Zhang, W., Zhou, Y., Li, F., Wei, H. et Peng, J. (2016) « Recent advances in understanding amino acid sensing mechanisms that regulate mTORC1 », *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), p. 1-15. doi: 10.3390/ijms17101636.
- Zhijun, X., Shulan, Z. et Zhuo, Z. (2007) « Expression and significance of the protein and mRNA of metastasis suppressor gene ME491/CD63 and integrin α 5 in ovarian cancer tissues. », *European Journal of Gynaecological Oncology*.
- Zhou, D., Zhao, Y., Kotecha, A., Fry, E. E., Kelly, J. T., Wang, X., Rao, Z., Rowlands, D. J., Ren, J. et Stuart, D. I. (2019) « Unexpected mode of engagement between enterovirus 71 and its receptor SCARB2 », *Nature Microbiology*. Springer US, 4(3), p. 414-419. doi: 10.1038/s41564-018-0319-z.
- Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V.-P. et Kornfeld, S. (2001) « Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor », *Science*, 292(5522), p. 1716-1718. doi: 10.1126/science.1060896.
- Zhu, Y., Drake, M. T. et Kornfeld, S. (1999) « ADP-ribosylation factor 1 dependent clathrin-coat assembly on synthetic liposomes », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), p. 5013-5018. doi: 10.1073/pnas.96.9.5013.
- Zoncu, R., Perera, R. M., Sebastian, R., Nakatsu, F., Chen, H., Balla, T., Ayala, G., Toomre, D. et De Camilli, P. V. (2007) « Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), p. 3793-3798. doi: 10.1073/pnas.0611733104.